

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Lucia Csergeová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Genotypizace nádorových biomarkerů
pomocí nových technologií masivně
paralelního sekvenování
s důrazem na vysoce citlivou typizaci
cirkulující nádorové DNA**

Bakalářská práce

Lucia Csergeová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí Práce: Ing. Rastislav Slavkovský, Ph.D.

Čestne prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením
Ing. Rastislava Slavkovského, PhD. a za použitia uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dne:

SÚHRN

Genotypizácia nádorových biomarkerov je základom personalizovaného prístupu k liečbe onkologických pacientov. Prognostické, prediktívne, diagnostické a terapeutické biomarkery sú aplikované v rôznych krokoch detekcie a liečby nádorov. Pre genotypizáciu biomarkerov sú využívané rýchlo sa rozvíjajúce metódy sekvenovania novej generácie.

V tejto bakalárskej práci sú popísané biomarkery používané pre vybrané typy nádorov. Rozobraná je problematika a najnovšie trendy v detekcii mutácií z cirkulujúcej nádorovej DNA, u ktorých sú pre zlepšenie kvality sekvenovania používané unikátne molekulové indexy. Ďalej sú v tejto práci spracované metódy masívne paralelného sekvenovania s dôrazom na sekvenovanie na platforme Illumina a spracovanie dát s vysokým sekvenačným pokrytím.

V experimentálnej časti tejto bakalárskej práce je popísaný proces optimalizácie jednokrokovej prípravy sekvenačnej knižnice s použitím unikátnych molekulových indexov. K cieľom tejto práce patrila optimalizácia prípravy vzoriek na sekvenovanie na platforme Illumina a následná analýza dát s využitím softvéru MAGERI. V neposlednom rade bol navrhnutý postup validácie tejto metódy.

SUMMARY

Genotyping of tumor biomarkers is the basis for a personalized approach to the treatment of cancer patients. Prognostic, predictive, diagnostic and therapeutic biomarkers are applied in various steps of tumor detection and treatment. For genotyping of biomarkers, rapidly developing methods of Next Generation Sequencing are used.

In this bachelor thesis are described biomarkers used for selected types of tumors. The issue and the latest trends in the detection of mutations from circulating tumor DNA, in which unique molecular indexes are used to improve sequencing quality, is discussed. Furthermore, massive parallel sequencing methods are being developed in this work, with emphasis on Illumina sequencing and processing of data with high sequencing coverage.

In the experimental part of this bachelor thesis is described the process of optimization of one-step sequencing library preparation using unique molecular indexes. The aim of this work was to optimize sample preparation for sequencing on the Illumina platform and the subsequent data analysis using MAGERI software. Last but not least, an approach for validating this method has been proposed.

POĎAKOVANIE

Ďakujem svojmu školiteľovi Ing. Rastislavovi Slavkovskému, Ph.D. za jeho odborný prístup, vedenie a čas, ktorý mi venoval v priebehu spracovania mojej bakalárskej práce. Ďalej by som sa rada poďakovala Ing. Lucii Kotkovej ako aj celému kolektívu Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny za ich ochotu a pomoc. Vďaka patrí aj mojej rodine za umožnenie štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CIELE PRÁCE	2
3	LITERÁRNY PREHLAD	3
3.1	Personalizovaná medicína a biomarkery pre vybrané typy nádorov	3
3.1.1	Mutácie receptora epidermálneho rastového faktoru a liečba tyrozínkinázovými inhibítormi	4
3.1.2	Mikrosatelitová nestabilita u pacientov s nádormi kolorekta	5
3.1.3	Mutácie členov MAPkinázovej signálnej dráhy	6
3.1.4	Tumor-supresorové gény asociované s rakovinou prsníku.....	7
3.1.5	Izocitrát dehydrogenáza	9
3.2	Masívne paralelné sekvenovanie.....	11
3.2.1	Sekvenačné platformy.....	12
3.2.2	Využitie sekvenačných technológií v onkológii a génové panely	13
3.3	Sekvenačná platforma Illumina.....	15
3.3.1	Príprava knižnice a sekvenovanie pomocou syntézy (SBS).....	15
3.3.2	Možnosti spracovania sekvenačných dát	17
3.3.3	Analýza variant založená na unikátnych molekulových indexoch.....	18
3.4	Biomarkery vyšetované z cirkulujúcej nádorovej DNA.....	20
3.4.1	Pôvod a vlastnosti ctDNA.....	20
3.4.2	Využitie ctDNA v detekcii nádorových biomarkerov	21
3.5	Unikátne molekulové indentifikátory a indexy determinujúce vzorku.....	24
3.5.1	Využitie unikátnych molekulových identifikátorov v detekcii variant s nízkou frekvenciou	25
3.6	Trendy v detekcii cirkulujúcej nádorovej DNA.....	28
3.6.1	Metóda BEAMing.....	28
3.6.2	Polymerizácia aktivovaná lýzou pyrofosfátu.....	29

3.6.3	Digitálna polymerázová reťazová reakcia	30
3.6.4	Metódy hlbokého sekvenovania	31
4	MATERIÁL A METÓDY	33
4.1	Biologický materiál	33
4.2	Použité chemikálie súpravy a roztoky.....	33
	Použité chemikálie.....	33
4.3	Zoznam použitých prístrojov a zariadení.....	33
4.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	34
4.4.1	Návrh primerov	34
4.4.2	Príprava vzoriek a prevedenie PCR.....	35
4.4.3	Kapilárová elektroforéza QIAxcel Advanced system	43
4.4.4	Prečistenie PCR produktov pomocou QIAquick PCR Purification Kitu .	45
4.4.5	Meranie koncentrácie DNA pomocou prístroja Qubit 2.0 Fluorometer ...	45
4.4.6	Príprava vzoriek na sekvenovanie	45
4.4.7	Sekvenovanie	46
4.4.8	Spracovanie sekvenačných dát	47
5	VÝSLEDKY	48
5.1	Optimalizácia podmienok PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy	48
5.1.1	Optimalizácia parametrov 1. annelingu programu PCR.....	48
5.1.2	Optimalizácia parametrov 2. annelingu programu PCR.....	50
5.2	Optimalizácia podmienok multiplexovej PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy	51
5.2.1	Optimalizácia kombinácie primerov v reakčnej zmesi.....	51
5.2.2	Optimalizácia koncentrácie primerov v reakčnej zmesi.....	52
5.3	Testovanie schopnosti detekcie mutácií pomocu multiplexovej a singleplexovej PCR	53
5.3.1	Overenie výskytu falošne pozitívnych vzoriek.....	56

5.4	Testovanie navrhnutých primerov pre cielený úsek exónu 20 <i>EGFR</i>	58
5.5	Optimalizácia podmienok PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy.....	59
5.6	Testovanie polymeráz s 3'→5' exonukleázovou aktivitou pre amplifikáciu cieleného úseku exónu 18 <i>EGFR</i>	61
6	DISKUSIA.....	62
7	ZÁVER.....	67
8	LITERATÚRA.....	68
9	PRÍLOHY.....	79

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

BAM	Binary Alignment Map
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BEAMing	Beads, Emulsification, Amplification and Magnetics
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
BRCA1	Breast Cancer Associated 1
BRCA2	Breast Cancer Associated 2
BWA	Burrows-Wheeler Aligner
CAPP-Seq	Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing
cDNA	Complementary DNA (komplementárna DNA)
cfDNA	Cell-Free DNA (nebunková DNA)
Cq	Cycle quantification value
CTCs	Circulating tumor cells (cirkulujúce nádorové bunky)
ctDNA	Circulating tumor DNA (cirkulujúca nádorová DNA)
D-2HG	D-2-hydroxyglutarát
dNTP	Deoxynukleosid trifosfát
EGF	Epidermal growth factor (epidermálny rastový faktor)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (receptor epidermálneho rastového faktoru)
FP	Forward primer (priamy primer)
gDNA	Genomic DNA (genomická DNA)
GSP	Gene specific primer (génovo špecifický primer)
HER1–4	Receptor tyrosine kinases (receptorové tyrozín kinázy)
hMutS β	DNA mismatch repair complex β
hMutS α	DNA mismatch repair complex α
HR	Homologous recombination (homologická rekombinácia)
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1 (izocitrát dehydrogenáza 1)
IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2 (izocitrát dehydrogenáza 2)
IGV	Integrative Genomics Viewer
KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
LOD	Limit of Detection (limit detekcie)
LLOD	Lower Limit of Detection (najnižší limit detekcie)
M	Mutant
MAGERI	Molecular tagged genome re-sequencing pipeline
MAP2K	Mitogen-activated protein kinase kinase (mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza)

MAQ	Mapping and Assembly with Qualities
MIG	Molecular Identifier Group
MLH1	MutL homolog 1
MMR	DNA mismatch repair
MNV	Multi-nucleotide variants (multinukleotidové varianty)
MPS	Massively Parallel Sequencing (masívne paralelné sekvenovanie)
MSI	Microsatellite Instability (mikrosatelitová nestabilita)
NAMPT	Nikotínamid fosforiboziltransferáza
NCI	National Cancer Institute
NGS	New Generation Sequencing (Metódy sekvenovania novej generácie)
NRAS	NRAS Proto-Oncogene, GTPase
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma (nemalobunkový karcinóm pľúc)
PAP	PCR aktivovaná lýzou pyrofosfátu
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PGM	Personal Genome Machine
R1	Read 1
R1SP	Read 1 sequencing primer
R2	Read 2
R2SP	Read 2 sequencing primer
RAD51	DNA repair protein homolog 1
SAM	Sequence Alignment Map
SBS	Sequencing by Synthesis
SI	Sample index
SiMSen-Seq	Simple, Multiplexed, PCR-based barcoding of DNA for Sensitive mutation detection using Sequencing
SIP	Sample index primer
SNP	Single-nucleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfizmus)
SV	Structural variants (štruktúrne varianty)
TKI	Tyrosin kinase inhibitor (tyrozínkinázové inhibítory)
UMI	Unique molecular index (unikátne molekulové indexy)
UP	Universal primer (univerzálny primer)
VCF	VariantCall Format
WES	Whole Exome Sequencing (celoexómové sekvenovanie)
WGS	Whole Genome Sequencing (celogenómové sekvenovanie)

WHO	World Health Organization
WT	Wild type (štandardá alela)
α -KG	α -ketoglutarát

ZOZNAM OBRÁZKOV

- Obrázok 1:** Schéma zobrazujúca mutácie *EGFR* génu spôsobujúce senzitivitu a rezistenciu voči tyrozínkinázovým inhibítorm (TKI) 1. generácie
- Obrázok 2:** Zobrazenie katalytickej aktivity mutovaných (M) a štandardných (WT) génov *IDH*
- Obrázok 3:** Príprava knižnice pomocou QIAseq Target DNA Panels
- Obrázok 4:** Príprava knižnice pre NGS pomocou systému Illumina
- Obrázok 5:** Tvorba klastrov pomocou mostíkovej amplifikácie a sekvenovanie na platforme Illumina
- Obrázok 6:** Schéma časového vývoja jednotlivých generácií tyrozínkinázových inhibítorm (TKI)
- Obrázok 7:** Klonálna evolúcia nádorových buniek u NSCLC zobrazujúca vývoj nádoru pri použití jednotlivých generácií tyrozínkinázových inhibítorm (TKI)
- Obrázok 8:** Príklady adaptérových dizajnov v primeroch pre prípravu sekvenačnej knižnice
- Obrázok 9:** Schematické zobrazenie prípravy knižnice a sekvenovanie vzoriek metódou SiMSen-Seq
- Obrázok 10:** Zobrazenie postupu spracovania a detekcie amplifikovaných fragmentov PCR s použitím metódy BEAMing
- Obrázok 11:** Princíp obojsmernej polymerizácie aktivovanej lýzou pyrofosfátu
- Obrázok 12:** Zásobník pufrov a držiak vzoriek

ZOZNAM TABULIEK

- Tabuľka 1:** Sekvencie primerov navrhnutých pre ciele oblasti exónu 18 a 20 génu *EGFR*
- Tabuľka 2:** Sekvencie primerov pre ciele oblasti exónov 19, 20 a 21 génu *EGFR*
- Tabuľka 3:** Zloženie PCR reakčnej zmesi s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy
- Tabuľka 4:** Teplotný program použitý pre optimalizáciu PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy
- Tabuľka 5:** Zloženie multiplexovej (exón 18, 19, 20, 21 *EGFR*) PCR reakčnej zmesi s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy
- Tabuľka 6:** Kombinácie primerových triplexov pre prípravu reakčnej zmesi s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy
- Tabuľka 7:** Zloženie triplexovej reakčnej zmesi s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy
- Tabuľka 8:** Teplotný program použitý pre multiplexovú a triplexovú PCR
- Tabuľka 9:** Zloženie PCR reakčnej zmesi s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy
- Tabuľka 10:** Teplotný program použitý pre optimalizáciu PCR s použitím Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy
- Tabuľka 11:** Zloženie PCR reakčnej zmesi s použitím a FastStart™ High Fidelity PCR systému
- Tabuľka 12:** Zloženie PCR reakčnej zmesi s použitím pre exón 18 *EGFR* pomocou *Takara Ex Taq* HS polymerázy
- Tabuľka 13:** Teplotný program použitý pre PCR pre exón 18 *EGFR* pomocou GoTaq® MDx Hot Start polymerázy, *Takara Ex Taq* HS polymerázy a FastStart™ High Fidelity PCR systému
- Tabuľka 14:** Parametre analýzy na prístroji QIAxcel Advanced
- Tabuľka 15:** Hodnoty C_q (cycle quantification value) u vzoriek amplifikovaných s použitím teplotného gradientu 1. annealingu teploty (48–68 °C)
- Tabuľka 16:** Hodnoty C_q (cycle quantification value) u vzoriek amplifikovaných cielejších oblastí exónu 20 a 21 *EGFR* s časom pri 1. annealingu 1 min alebo 5 min.
- Tabuľka 17:** Hodnoty C_q (cycle quantification value) u vzoriek amplifikovaných s použitím teplotného gradientu 2. annealingu (50–70 °C)
- Tabuľka 18:** Hodnoty C_q (cycle quantification value) u vzoriek amplifikovaných s použitím jednotlivých variant mastermixu

- Tabuľka 19:** Hodnoty Cq (cycle quantification value) u vzoriek DNA s rôznou koncentráciou amplifikovaných pomocou optimalizovanej PCR
- Tabuľka 20:** Percentuálne zastúpenie mutácií vzoriek z Experimentu 1 a Experimentu 2 detegovaných pomocou sekvenovania a spracovaných pomocou softvéru MAGERI
- Tabuľka 21:** Hodnoty Cq (cycle quantification value) u vzoriek DNA amplifikovaných pomocou optimalizovanej PCR
- Tabuľka 22:** Percentuálne zastúpenie mutácií u amplifikovaných vzoriek DNA izolovaných z krvi a vzoriek referenčných štandardov detegovaných pomocou sekvenovania a spracovaných pomocou softvéru MAGERI
- Tabuľka 23:** Hodnoty Cq (cycle quantification value) pri použití nových primerových párov v porovnaní s primerami používanými v predchádzajúcich experimentoch
- Tabuľka 24:** Porovnanie počtu MIG získaných pomocou programu MAGERI u vzorky DNA 740 amplifikovanej s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy

ZOZNAM PRÍLOH

Príloha 1: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu

1. annealingu v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľené oblasti exónov 18 a 19 *EGFR*

Príloha 2: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu

1. annealingu v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľené oblasti exónov 20 a 21 *EGFR*

Príloha 3: Separované fragmenty vzorky amplifikovanej pri teplote 1. annealingu 68 °C v PCR

s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľenú oblasť exónu 20 *EGFR*

Príloha 4: Separované fragmenty vzorky amplifikovanej pri teplote 1. annealingu 64,6 °C v PCR

s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľnú oblasť exónu 20 *EGFR*

Príloha 5: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu

2. annealingu v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľené oblasti exónov 18 a 19 *EGFR*

Príloha 6: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu

2. annealingu v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľené oblasti exónov 20 a 21 *EGFR*

Príloha 7: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných multiplexovej a triplexovej PCR

s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľené oblasti exónov 18, 19, 20 a 21 *EGFR*

Príloha 8: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých koncentráciách

primerov pre amplifikáciu cieľenej oblasti exónu 21 v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľené oblasti exónov 18, 19 a 21 *EGFR*

Príloha 9: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných v multiplexovej

a singleplexovej PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a rôznych koncentrácií DNA s použitím primerov pre cieľené oblasti exónov 18, 19, 20 a 21 *EGFR*

Príloha 10: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných v PCR s použitím GoTaq® MDx

Hot Start polymerázy a rôznych primerových párov pre cieľenú oblasť exónu 20 *EGFR*

Príloha 11: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu

1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy a primerov pre cieľený úsek exónu 18 *EGFR*

Príloha 12 : Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu

1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy a primerov pre cielený úsek exónu 19 *EGFR*

Príloha 13: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu

1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy a primerov pre cielený úsek exónu 20 *EGFR*

Príloha 14: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu

1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy a primerov pre cielený úsek exónu 21 *EGFR*

Príloha 15: Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pomocou PCR s použitím polymeráz

GoTaq® MDx Hot Start, Takara Ex Taq HS a FastStart™ High Fidelity PCR systému a primerov pre cielený úsek exónu 18 *EGFR*

1 ÚVOD

Genotypizácia biomarkerov s použitím vzoriek cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) z tekutej biopsie prináša presnejšiu reprezentáciu heterogenity nádoru ako vzorky tkaniva. ctDNA je uvoľňovaná z apoptotických a nekrotických buniek nádoru do cirkulácie, kde sa nachádza spolu s voľnou DNA pochádzajúcou z nemalígnych hostiteľských buniek. Výhodou použitia ctDNA je tiež neinvazívnosť tohto vyšetrenia a z nej vyplývajúca možnosť opakovanej detekcie mutácií počas priebehu liečby onkologických pacientov.

Vzhľadom na to, že ctDNA je ideálnym zdrojom genetických informácií u pacientov s nádormi, jej využitím v klinických aplikáciách sa dnes zaoberajú mnohé štúdie. Rozvíjajú sa najmä digitálne genomické technológie ako hlboké sekvenovanie, digitálna PCR alebo BEAMing. Možnosťou ako zvýšiť schopnosť detekcie mutácií s nízkou frekvenciou je aj inkorporácia univerzálnych molekulárnych indexov do sekvenačnej knižnice. Jednou z možností je ligácia adaptérov obsahujúcich indexačnú sekvenciu v priebehu prípravy knižnice určenej pre sekvenačné metódy novej generácie. UMI sú detegované v procese spracovania sekvenačných dát a so zhodných sekvencií je vytvorený konsenzus. Na základe tvorby konsenzu je možné určiť počet molekúl v pôvodnej vzorke DNA, identifikovať PCR duplikáty, artefakty a chyby, ktoré vznikli počas amplifikácie a sekvenovania vzoriek. Na základe toho je možné znížiť limit detekcie mutácií pod 1 %.

V experimentálnej časti tejto bakalárskej práce bola optimalizovaná metóda založená na sekvenovaní pomocou platformy Illumina MiSeq, v ktorej bol použitý postup jednokrokovej prípravy sekvenačnej knižnice.

2 CIELE PRÁCE

Teoretická časť

- Zoznámiť sa s problematikou personalizovanej medicíny a (prediktívnych či prognostických) biomarkerov pre pľúcny karcinóm, pankreatické nádory, gliómy a glioblastómy.
- Spísať rešerš o použití masívne paralelného sekvenovania (MPS) pre typizáciu génov spojených s rozvojom nádorov.
- Zoznámiť sa s témou sekvenovania na platforma Illumina MiSeq a možnostiach spracovania dát s vysokým sekvenačným pokrytím.
- Spísať rešerš o biomarkeroch vyšetrovaných alebo skúmaných z cirkulujúcej nádorovej DNA.
- Zoznámiť sa s témou molekulárnych barkódov pre zlepšenie kvality sekvenovania a citlivosti detekcie mutácií, najmä vo vzorkách cirkulujúcej nádorovej DNA z tekutej biopsie.
- Popísať najnovšie trendy a technológie v oblasti detekcie mutácií v cirkulujúcej nádorovej DNA (napr. hlboké sekvenovanie, digitálna PCR, atď.).

Praktická časť

- Zvládnutie dizajnu špecifických primerov pre biomarkery.
- Zvládnutie metódy prípravy sekvenačnej knižnice pomocou špeciálnej PCR amplifikácie pre detekciu vybraných biomarkerov (napr. *EGFR*, *IDH1*, *IDH2* príp. *KRAS*, *NRAS*) s nízkym limitom detekcie (<1%).
- Optimalizácia parametrov prípravy sekvenačnej knižnice (primery, čas, teplota, atď.).
- Zadanie sekvenačného behu a sekvenovanie vzoriek na platforme Illumina (napr. MiSeq).
- Spracovanie sekvenačných dát pomocou špecifického softvéru (napr. MAGERI).
- Interpretácia a analýza dát.
- Validácia sekvenačnej metódy na sade vzoriek (určenie špecificity, senzitivity, limitu detekcie, robustnosti, opakovateľnosti).

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Personalizovaná medicína a biomarkery pre vybrané typy nádorov

Personalizovaná medicína predstavuje nový prístup zdravotnej starostlivosti a liečby prispôsobenej pacientovi na základe jeho genetických informácií. Individualizáciu nádorovej liečby umožnilo akumulovanie poznatkov o základných mechanizmoch zapojených do rozvoja nádorov, zlepšovanie sekvenačných možností a identifikácia majoritného množstva potenciálnych onkogénov a tumor-supresorových génov. V roku 2004 bol z dostupnej literatúry vytvorený konsenzus, ktorý odhadol počet dovtedy identifikovaných génov spojených s rozvojom nádorov na 291 génov (Futreal *et al.*, 2004; Vogenberg *et al.*, 2010; Wheeler *et Wang*, 2013).

Genomické technológie ukázali, že aj napriek molekulárnej unikátnosti každého nádoru sú opakovane postihované určité signálne dráhy. Tieto poznatky je možné aplikovať pri návrhu a použití nových generácií liečiv cielených na dráhy zapojené v karcinogéze. Produkcia veľkého množstva sekvenačných dát viedla k potrebe vývoja nástrojov umožňujúcich preklad týchto dát do výsledného odporúčania liečby pre pacientov, jej správnej dávky a rozvoja nových cielených liečiv. Pri generovaní modelov progresie ochorenia a terapeutickej odpovede na liečivo zohrávajú rolu hlavne nové bioinformatické metódy schopné zhromažďovať, manažovať a analyzovať veľké množstvo komplexných molekulárnych a klinických dát (Cheng *et al.*, 2019; Lowy *et Collins*, 2016).

National Cancer Institute (NCI) definuje biomarker ako biologickú molekulu detegovanú z krvi, iných telových tekutín a tkanív ako znak normálnych alebo abnormálnych procesov, stavov či chorôb. Biomarkery sú aplikovateľné vo viacerých krokoch celého procesu detekcie a liečby nádorov a môžu byť rozdelené do štyroch kategórií na prognostické, prediktívne, diagnostické a terapeutické. Prognostické biomarkery sú používané na identifikáciu pacientov s agresívnejším priebehom ochorenia. Prediktívne biomarkery sú využívané na predikciu prípadných benefitov súvisiacich so špecifickou liečbou pre daného pacienta. Sú meradlom pravdepodobnosti určitej odpovede na liečbu, čo umožňuje identifikáciu najvhodnejšej terapie v individuálnych prípadoch. Diagnostické biomarkery umožňujú skorú detekciu nádorových ochorení neinvazívnou cestou. Terapeutické biomarkery priamo prispievajúce do rastu nádoru môžu byť použité ako terapeutické ciele. Na základe toho je kladený dôraz nie len na identifikáciu nových

markerov ale aj na pochopenie ich biologického významu za účelom možnosti liečby cielenej proti nim (McShane *et al.*, 2005, Lin *et al.*, 2012; National Cancer Institute, 2018; Shen, 2013; Verdaguer *et al.*, 2017).

3.1.1 Mutácie receptoru epidermálneho rastového faktoru a liečba tyrozínkinázovými inhibítormi

Receptor epidermálneho rastového faktoru (EGFR) patrí do rodiny transmembránových tyrozínkinázových receptorov označovaných ako HER1–4. Epidermálny rastový faktor (EGF) bol jedným z prvých objavených rastových faktorov. Neskoršie štúdie potvrdili, že tento proteín sa viaže na receptor na bunkovom povrchu. Ten po dimerizácii a autofosforylácii piatich špecifických tyrozínov aktivuje intracelulárnu tyrozínkinázu a prenáša tak signál rôznymi cestami do jadra, kde ovplyvňuje expresiu génov zapojených do podpory bunkovej proliferácie (Cohen S., 1983; Ullrich *et Schlessinger*, 1990; Yarden *et al.*, 1987).

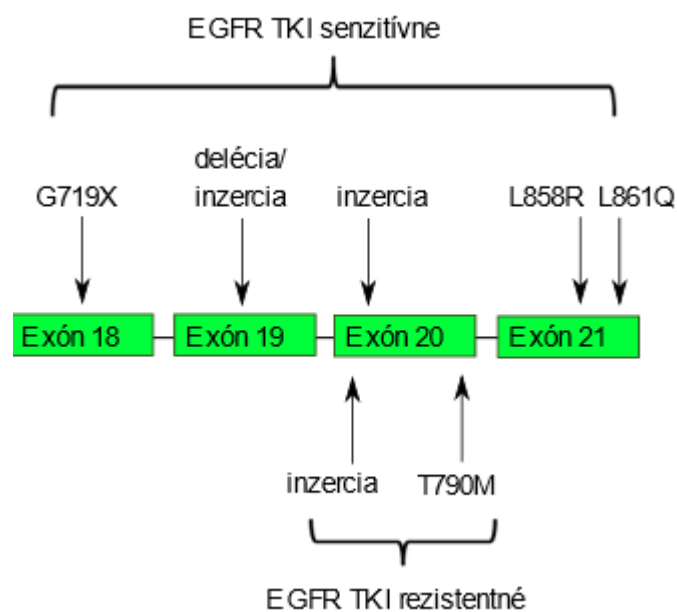
Zvýšená aktivita receptora môže byť spôsobená rôznymi mechanizmami, medzi ktoré patria mutácie extracelulárnej domény. EGFR je tyrozínkináza nezbitá pre transdukciu signálu, a preto je cieľom pre terapiu tyrozínkinázovými inhibítormi. Inhibítory receptora EGF sú využívané v liečbe nemalobunkového karcinómu pľúc, pankreatických nádorov, rakoviny hrubého čreva a nádorov prsníku (Gupta *et El-Rayers*, 2008; Sawyers, 2002; Wee *et Wang*, 2017).

Z pomedzi jednonukleotidových mutácií *EGFR* sa najviac vyskytuje substitúcia arginínu za leucín v kodóne 858 (L858R) exónu 21, ktorá zastupuje okolo 41 % zo všetkých aktivačných mutácií v rámci génu *EGFR*. Ďalšie mutácie sa vyskytujú v exóne 20 a sú to najmä inzercie a duplikácie. V exóne 19 sa z veľkej časti vyskytujú delécie, zastupujúce 45 % zo všetkých *EGFR* mutácií. Najčastejšie sa vyskytujúce mutácie v kinázovej doméne *EGFR* znázorňuje **Obrázok 1** (Sharma *et al.*, 2007).

K hlavným mechanizmom, ktoré spôsobujú rezistenciu voči tyrozínkinázovým inhibítorm (TKI) u pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc patrí mutácia v exóne 20 v géne pre receptor epidermálneho rastového faktoru označovaná ako T790M. Substitúcia treonínu za metionín bola prvýkrát zaznamenaná v roku 2005 a bola dokázaná jej kritická funkcia pre väzbu liečiva erlotinib. Liečba pomocou ďalšieho liečiva z rady TKI, gefitinibu, spôsobuje selekciu T790M pozitívnych buniek a aj malá

frakcia týchto buniek na začiatku liečby, môže viesť k rezistencii spôsobenej selektívnou proliferáciou mutovaných buniek (Inukai *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2005).

Mutácia T790M spôsobuje až polovicu prípadov rezistencie na prvú generáciu TKI, erlotinib a gefitinib. V týchto prípadoch sú dostupné TKI tretej generácie cieleň špecificky proti bunkám pozitívnym na mutáciu T790M. Pri využití liečiv tretej generácie sa u mnohých pacientov vyvinie terciárna mutácia C797S (substitúcia cysteínu za serín v exóne 20), ktorá spôsobí rezistenciu. Detekcia mutácií spôsobujúcich rezistenciu je preto rozhodujúcim faktorom pri výbere vhodnej liečby pre pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc (Chen *et al.*, 2018; Mok *et al.*, 2017; Sequist *et al.*, 2015).



Obrázok 1: Schéma zobrazujúca mutácie *EGFR* génu spôsobujúce senzitivitu a rezistenciu voči tyrozínkinázovým inhibítorm (TKI) 1. generácie (vytvorené podľa Lovly *et al.*, 2015; Yasuda *et al.*, 2013)

3.1.2 Mikrosatelitová nestabilita u pacientov s nádormi kolorekta

Mikrosatelity sú krátke tandémové DNA repetície, ktoré sú náhodne umiestnené v ľudskom genóme a vykazujú vysokú mieru polymorfizmu medzi individuálnymi jedincami. Veľké percento kolorektálnych karcinómov sa rozvíja z chromozomálnej nestability. Napriek tomu asi 12 až 15 % je charakterizovaných mikrosatelitovou nestabilitou, ktorá je spôsobená mutáciou génov kódujúcich proteíny v systéme opráv replikácie DNA – tzv. mismatch repair (MMR) génov. Tento systém, konkrétne hMutS α , je schopný rozoznať nesprávne zaradenú bázu v dcérskom vlákne DNA, ktorá je spôsobená chybou počas syntézy. Túto nesprávne zaradenú bázu označí a interaguje

s exonukleázou, ktorá z novonasynthesizedého reťazca odstráni niekoľko bází. Následne prebieha resyntéza tohto reťazca. Druhým systémom je hMutSβ, ktorý je schopný rozoznať slučky vytvorené v mikrosatelitových oblastiach a po naviazaní systému hMutLα nastáva ich vystrihnutie a oprava (Grady *et Carethers*, 2008; Kawakami *et al.*, 2015; Peltomaki, 2003).

Mikrosatelitová nestabilita je teda markerom pre stratu aktivity systému MMR, ktorá spôsobí akumuláciu mutácií v mikrosatelitových oblastiach. Je definovaná ako zmena v mikrosatelitovej dĺžke v DNA, ktorú je možné identifikovať pomocou elektroforetických techník a porovnať so vzorkou normálnej DNA od rovnakého pacienta. Približne 20 až 25 % kolorektálnych karcinómov, ktoré vykazujú mikrosatelitovú nestabilitu, sa vyskytuje u jedincov trpiacich Lynchovým syndrómom. Lynchov syndróm je diagnostikovaný v prípadoch, kedy sa u pacienta vyskytuje zárodočná mutácia v MMR génoch. Väčšina prípadov spojených s MSI nie je dedičného pôvodu a vzniká náhodným umlčaním génu *MLH1* (MutL homológ 1), ktoré je spôsobené metyláciou jeho promotora. Po tomto umlčaní klesá aktivita systému MMR a vzniká tak mikrosatelitová nestabilita (Boland, 2005; Boland *et Goel*, 2010; Kawakami *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017).

Mikrosatelitová nestabilita vo vysokých frekvenciách je označovaná ako MSI-H. Kolorektálne nádory s MSI-H vykazujú biologicky menej agresívne správanie v porovnaní s mikrosatelitovo stabilnými nádormi. Zároveň sa ukazuje nižšia terapeutická odpoveď na chemoterapeutickú liečbu pomocou fluorouracilu u nádorov s defektným MMR systémom, čo poukazuje na potrebu zistenia MMR statusu u pacientov, pri ktorých je zvažované použitie tohto chemoterapeutika. Pri výbere vhodnej liečby pre pacientov s nádormi MSI-H je taktiež nutné detegovať výskyt iných mutácií, ktoré sa s vysokou frekvenciou vyskytujú v kolorektálnych nádoroch (Lee *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2015; Sargent *et al.*, 2010).

3.1.3 Mutácie členov MAPkinázovej signálnej dráhy

V MAPkinázovej dráhe sa vyskytujú mutácie u niekoľkých jej členov, ktorý patria do proteínových rodín Ras a Raf. Detekcia týchto mutácií sa využíva pri predikcii odpovede na protilátky ciele na receptor epidermálneho rastového faktoru (Tan *et Du*, 2012).

KRAS onkogén je mutovaný približne v 35 až 45 % kolorektálnych nádorov s častým výskytom bodových substitúcií v kodónoch 12 a 13. V nízkych frekvenciách sa mutácie

vyskytujú v kodónoch 59, 61, 117 a 146 *KRAS* génu. Mutácie *KRAS* a *NRAS* sú negatívnou predikciou odpovede na liečbu pomocou protilátok cielených na receptor epidermálneho rastového faktoru (cetuximab, panitumumab). Proteínovým produktom génu *KRAS* a *NRAS* je GTPáza aktivujúca EGFR signálnu dráhu. Následkom mutácií je pozmenená GTPázová aktivita a narušený proces výmeny aktívneho GTP-viažuceho stavu za neaktívny GDP-viažuci stav. Týmto spôsobom je v bunke akumulovaná konštitutívne aktívna forma proteínu, čím je aktivovaná proliferáčna signálna dráha (Bamford *et al.*, 2004; Karapetis *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2012; Tikhonova *et al.*, 2018).

Ďalším členom v tejto MAPkinázovej dráhe je gén *BRAF*, ktorý kóduje serín/treonín proteínkinázu, efektor aktivovaného K-Ras proteínu. Asi 15 % kolorektálnych karcinómov nesie mutáciu v géne *BRAF*, ktoré sú ukazateľnom negatívnej prognózy. Najfrekvencovanejšie sa vyskytujúcou mutáciou v tomto géne je V600E, ktorú je možné detegovať v približne 90 % všetkých *BRAF* mutovaných nádorov. Jedná sa o jednonukleotidovú mutáciu, ktorá spôsobuje substitúciu glutámovej kyseliny za valín a konštitutívnu aktiváciu B-Raf. Medzi najpoužívanéjšie liečivá cielené proti *BRAF* proteínu s výskytom mutácie V600E patrí vemurafenib a dabrafenib (Ascierto *et al.*, 2012; Di Nicolantonio *et al.*, 2008; Zhang, 2015).

Detekcia mutácií členov MAPkinázovej dráhy zohráva dôležitú úlohu pri výbere cielenej terapie. Príkladom je použitie inhibítorov cielených proti MAP2K, čo je mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza. U týchto typov liečiv bola preukázaná rezistencia pri nádoroch nesúcich mutácie v géne *KRAS*. Ďalšou možnosťou je použitie monoklonálnych protilátok cielených na receptor epidermálneho rastového faktoru. Pri ich použití vykazovali nádory nesúce mutáciu *BRAF* a *KRAS* nižšiu senzitivitu (Di Nicolantonio *et al.*, 2008; Karapetis *et al.*, 2008; Wee *et al.*, 2009)

3.1.4 Tumor-supresorové gény asociované s rakovinou prsníku

Jedinci, u ktorých sa vyskytuje heterozygotná mutácia génov *BRCA1* (Breast Cancer Associated 1) alebo *BRCA2* (Breast Cancer Associated 2) v zárodočnej línii, majú vyššie riziko vzniku rakoviny prsníkov a taktiež predispozíciu k rakovine ovárií, prostaty a pankreasu. Tieto gény pôsobia ako klasické tumor-supresorové gény a nádory nesúce mutácie v tomto géne vykazujú stratu štandardnej alely (Wooster *et al.*, 2003).

Produkty génov *BRCA 1 a 2* (ďalej uvedené ako *BRCA* gény) sú lokalizované v jadre a zapojené do opravných procesov dvojlákových DNA zlomov, rekombinácie,

kontroly bunkového cyklu a transkripcie. Kódujú veľké proteíny, ktoré vykazujú expresiu v rôznych tkanivách najmä v S a G2 fáze bunkového cyklu. Produkt génu *BRCA2* sa svojimi väzobnými doménami priamo viaže a reguluje aktivitu RAD51 (DNA repair protein homolog 1), ktorý má katalytickú funkciu pri homologickej rekombinácii (HR). Proteínové produkty *BRCA* génov sa tak zapájajú do kontroly poškodení genetickej informácie počas bunkového cyklu (Christopher *et al.*, 2008; Venkitaraman, 2002).

Jedna defektná kópia génu v zárodočnej línii spôsobuje predispozíciu ku vzniku rôznych typov rakoviny. V nededičných typoch rakoviny prsníka sa mutácie génov *BRCA* vyskytujú iba sporadicky. Vyššie riziko vzniku rakoviny prsníka sa vyskytuje u nosičov mutácie v géne *BRCA2*. V kontraste k tomu je nízky výskyt rakoviny ovárií u týchto jedincov. Na základe metaanalýzy 22 štúdií z roku 2003 bolo vyčíslené 10 až 30-krát vyššie riziko vzniku rakoviny prsníka u žien nesúcich mutácie v týchto tumor supresorových génoch (Antoniou *et al.*, 2003; Venkitaraman, 2002).

BRCA gény patria medzi rutinne testované a 10 až 15 % pacientov, u ktorých bolo vykonané sekvenovanie celých *BRCA* génov, nieslo patogénnu variantu génu. Medzi tieto varianty patria nezmyselné (nonsense) varianty, inzercie a delécie spôsobujúce posuny čítacieho rámcu, veľké génové prestavby, varianty spôsobujúce zmeny v posttranskripčnom zostrihu prípadne patogénne substitúcie. Viac ako 5 % pacientov nieslo neklasifikované varianty zahŕňajúce mutácie v regulačných oblastiach, mutácie potenciálne ovplyvňujúce zostrih pre-mRNA a mutácie či delécie, ktorých vplyv na proteínovú štruktúru nie je možné posúdiť. Sú extrémne vzácne a preto nie je možné posúdiť ich efekt zvýšenie rizika vzniku rakoviny pomocou štúdií konkrétnych prípadov. Posúdenie patogenity jednotlivých variant je dôležitý krok pri diagnostikovaní pacientov a doporučení prípadnej liečby (Caleca *et al.*, 2011; Valleé *et al.*, 2012).

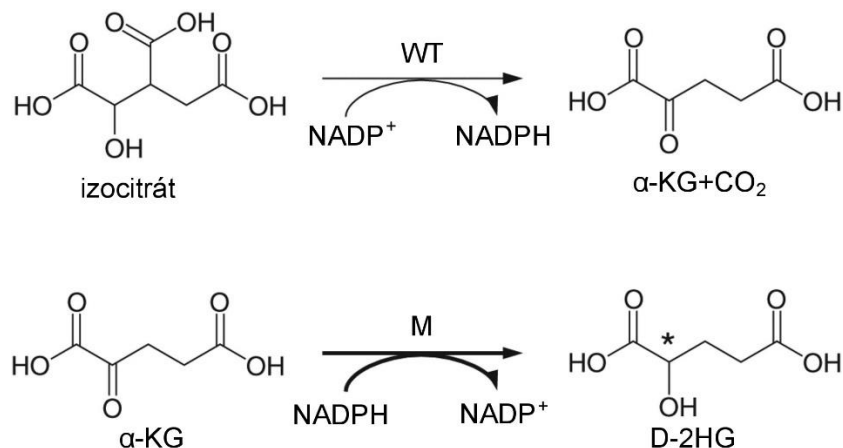
V cielej terapii sa využívajú PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) inhibítory, ako olaparib, ktoré cielia na proteíny schopné prenosu ADP-ribózy na iné proteíny a zohrávajú rolu v opravách jednonukleotidových zlomov v DNA. Po zabránení reparácie týchto zlomov pomocou inhibície sa vytvárajú dvojvláknové zlomy, ktoré nie je možné efektívne opraviť práve v nádoroch nesúcich mutácie v génoch *BRCA*. Štúdia z roku 2009 vykonaná na pacientoch s nádormi prsníku nesúcich mutácie v *BRCA* génoch podporila koncept vyššej aktivity liečiva olaparib v týchto prípadoch. V dnešnej dobe sú skúmané rôzne mechanizmy rezistencie, ktoré môžu byť spôsobené mutáciou v *BRCA2* géne

obnovujúcou otvorený čítací rámec génu a jeho funkciu (Davar *et al.*, 2012; Edwards *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2014; Tutt *et al.*, 2009).

3.1.5 Izocitrát dehydrogenáza

Gény kódujúce izocitrát dehydrogenázu, *IDH1* a *IDH2*, ktoré hrajú významnú rolu v Krebsovom cykle, sú mutované v mnohých typoch ľudských nádorov. Isocitrát dehydrogenáza patrí do veľkej rodiny oxidoreduktáz, ktoré katalyzujú oxidačnú dekarboxyláciu izocitrátu na α -ketoglutarát (2-oxoglutarát, α -KG). Kofaktormi tejto reakcie sú NAD^+ (oxidovaný nikotínamid adenín dinukleotid) alebo NADP^+ (oxidovaný nikotínamid adenín dinukleotidfosfát) a horečnaté ióny (Cohen *et al.*, 2013; Reitman *et Yan*, 2010).

Mutácie majú za následok stratu normálnej katalytickej aktivity. Produkciu 2-oxoglutarátu nahradí jeho redukcia na D-2-hydroxyglutarátu (D-2HG) v reakcii využívajúcej NADPH (redukovaný nikotínamid adenín dinukleotidfosfát). Rozdiel medzi týmito reakciami zobrazuje **Obrázok 2**. D-2HG je štruktúrne podobný, a tak je schopný pôsobiť ako antagonist α -KG. Tento produkt inhibuje aktivitu enzýmov závislých na α -ketoglutaráte, vrátane dioxygenáz, demetyláz a DNA hydroxyláz. Abnormálna metylácia histónov, DNA a najmä CpG ostrovčekov je častou spoločnou vlastnosťou nádorov s výskytom mutácií v génoch *IDH1* a *IDH2* (Cohen *et al.*, 2013; Reitman *et Yan*, 2010).



Obrázok 2: Zobrazenie katalytickej aktivity mutovaných (M) a štandardných (WT) génov *IDH* (prevzaté a upravené podľa Cairns *et Mak*, 2013; Mellai *et al.*, 2012)

Nádory nesúce *IDH1/2* mutácie sú heterozygotné a takmer všetky spôsobujú substitúciu v jednej aminokyseline ich produktov. Zmena aminokyseliny sa vyskytuje v aktívnom mieste enzýmu, čo vysvetľuje priamy dopad na zmenu katalytickej funkcie. Mutácie *IDH* génov boli analyzované v gliómoch, glioblastómoch a myeloidných leukémiách, u ktorých sú asociované s lepšou prognózou. Detekcia mutácií *IDH* nachádza uplatnenie v diferenciálnej diagnostike gliómov. Na základe absencie mutácií v pilocytárnych astrocytómoch je možné odlíšiť daný typ gliómov od rozptýlených astrocytómov a oligoastrocytómov, ktoré sa rozvíjajú po získaní prvotnej *IDH* mutácie. Analýzu mutácií je možné použiť na rozoznanie primárnych a sekundárnych glioblastómov, ktoré nie je možné histopatologicky odlíšiť, avšak reprezentujú dva subtypy gliómov (WHO grade IV) s rozdielnou prognózou. Ich unikátne vlastnosti z nich robia vhodné biomarkery a potenciálne terapeutické ciele. Absencia štandardných *IDH1/2* enzýmov vytvára možnosť použitia malých molekulových inhibítorov, medzi ktoré patria PARP inhibítory, inhibítory nikotínamid fosforiboziltransferázy (NAMPT) či inhibítory BCL-2 (Cohen *et al.*, 2013; Mellai *et al.*, 2012; Molenaar *et al.*, 2018; Pusch *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012).

3.2 Masívne paralelné sekvenovanie

Sekvenovanie nukleových kyselín od roku 1977, kedy bola prezentovaná sekvenačná metóda Fredericka Sangera s použitím nukleotidových analógov terminujúcich sekvenovaný reťazec, prešli dlhým procesom vývoja. Od roku 2005 sekvenovanie novej generácie (NGS) umožňuje masívne paralelné sekvenovanie (MPS), ktoré spočíva v simultánnom sekvenovaní rôznych cieľových oblastí genómu a bežne u viacerých vzoriek. MPS technológie sprístupnili možnosť zavedenia celogenómového a exómového sekvenovania do klinickej praxe. Rýchla charakterizácia viacerých individuálnych genómov dovoľuje skúmať komplexnosť génových variácií spojených s rozvojom nádorov a umožňuje využitie genetickej informácie pacienta v personalizovanej medicíne (Bently *et al.*, 2008; Sanger *et Coulson*, 1977; Serrati *et al.*, 2016).

DNA sekvenovanie zahŕňa celogenómové sekvenovanie (WGS), celoexómové sekvenovanie (WES) a cielečné sekvenovanie označované tiež ako panelové. Celoexómové sekvenovanie sa zameriava regióny kódujúce proteíny, ktoré zahŕňajú viac ako 1 % ľudského genómu. Cielečné sekvenovanie je zamerané na selekciu génov relevantných pre špecifické ochorenie a je dostupnejšie pre klinickú aplikáciu vo viacerých laboratóriách, pričom je navrhnuté tak, aby maximalizovalo pokrytie, senzitivitu a špecificitu u vybraných génov (Adams *et Eng*, 2018; Dillon *et al.*, 2018; Illumina, 2017; Biesecker *et Green*, 2014, Serrati *et al.*, 2016).

Napriek tomu, že NGS umožňuje paralelné sekvenovanie veľkého množstva DNA molekúl, sekvenovanie celého genómu stále nie je praktické a dostupné pre väčšinu klinických aplikácií vzhľadom na veľké množstvo získaných informácií a nedostupnosť systémov schopných výstup spracovať. Dahl a kolektív vo svojej štúdiu využívajú techniky masívneho sekvenovania pre sekvencie amplifikované v multiplexovej PCR. Pre tento spôsob je kľúčové, aby amplifikácia negenerovala nešpecifické artefakty a produkovala cielečné sekvencie v rovnomernej distribúcii. Metóda spájajúca multiplexovú PCR a sekvenovanie nových technológií umožňuje rýchle a finančne efektívne sekvenovanie mutácií génov spojených s rozvojom karcinómov a vyššiu sekvenačnú hĺbku v porovnaní s celogenómovým sekvenovaním (Dahl *et al.*, 2007; UnitedHealthcare®, 2019).

Sekvenovanie ribonukleových kyselín slúži na detekciu alternatívneho génového zostrihu transkriptu, posttranskripčných modifikácií, fúzných génov, jedno-nukleotidových polymorfizmov (SNP) a zmien v expresii génov. Pomocou NGS je taktiež možné skúmať epigenetické zmeny ako metyláciu promotora, molekuly microRNA a expresiu malých RNA (Serrati *et al.*, 2016).

3.2.1 Sekvenačné platformy

Roche 454 bol prvým komerčne úspešným systémom pre sekvenovanie novej generácie, ktorý využíval pyrosekvenačnú technológiu založenú na detekcii pyrofosfátu uvoľneného počas inkorporácie nukleotidov. Pri tejto technológii je množstvo uvoľneného pyrofosfátu úmerné množstvu inkorporovaných nukleotidov a následne je kvantitatívne prevedený na ATP, ktoré poháňa premenu luciferázy na oxyluciferín a svetelný signál. Prevedenie uvoľneného pyrofosfátu pomocou enzymatických reakcií na viditeľné svetlo prebieha proporcionálne (Sequeira *et al.*, 2012; Benkovic *et al.*, 1995).

V dnešnej dobe sú vo výskume využívané viaceré výkonnejšie platformy pre DNA sekvenovanie, ako Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM), Life Technologies SOLiD platforma (Sequencing by Oligo Ligation Detection) a Illumina. PGM využíva meranie zmien pH počas polymerizácie, ktoré sú spôsobené uvoľnením protónu pri inkorporácii nukleotidu. Zmena pH je následne prevedená na napätie, ktoré zodpovedá počtu inkorporovaných bází a postupné pridávanie individuálnych nukleotidov behom každého cyklu, umožňuje ich rozlíšenie. PGM je prvým komerčným sekvenačným prístrojom, ktorý nevyužíva fluorescenciu a optické skenovanie na rozlíšenie nukleotidov, čo podstatne zvyšuje rýchlosť procesu, znižuje náklady a veľkosť prístroja. V roku 2012 bol na trh uvedený prístroj Ion Proton, ktorý funguje na rovnakom princípe a je vhodný pre exómové sekvenovanie (Liu *et al.*, 2012; Mellmann *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015).

Life Technologies SOLiD platforma využíva fluorescenčne značené dinukleotidové próby, ktoré sú po inkorporácii do templátovej DNA ligované na primery v tuhej fáze. Na generovanie klonálnych DNA fragmentov uchytených na guľčkách (beads) je aplikovaná emulzná PCR (Glessner *et al.*, 2009; Dressman *et al.*, 2003).

Globálnym lídrom v DNA sekvenovaní je Illumina, ktorá využíva sekvenovanie pomocou syntézy, kedy je DNA knižnica denaturovaná a uchytená na prietokovú komôrku pomocou oligonukleotidov komplementárnych k adaptérom, ktoré sú ligované

k analyzovaným fragmentom počas tvorby knižnice. Následne prebieha mostíková amplifikácia vytvárajúca klastre obsahujúce klonálne fragmenty DNA. Jednotlivé báze sú čítané s použitím cyklickej reverzibilne terminátorovej stratégie využívajúcej sekvenovanie templátového vlákna po jednom nukleotide v cykloch zahŕňajúcich inkorporáciu báze, premytie, vizualizáciu a odštiepenie terminátora. (Guo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Illumina, 2018; Quail *et al.*, 2012).

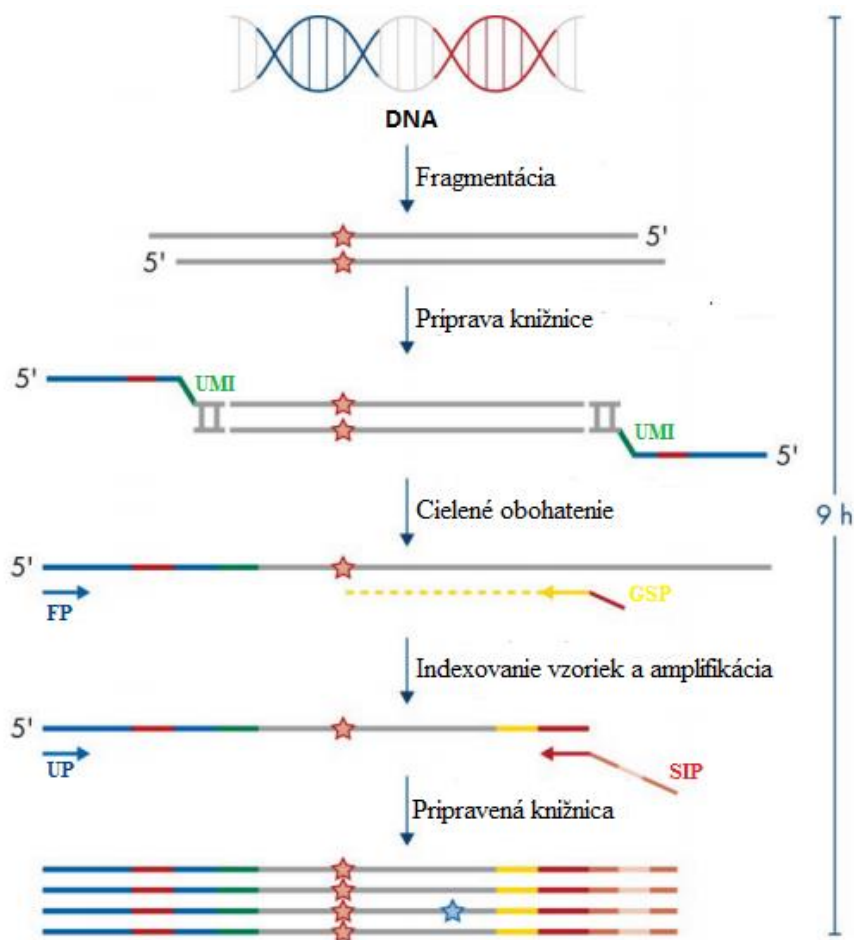
3.2.2 Využitie sekvenačných technológií v onkológii a génové panely

Väčšina nádorových ochorení je geneticky komplexných, a preto lepšie definovateľných pomocou aktivácie signálnych dráh, než špecifickou sadou mutácií. Aj napriek tomu úspech Projektu ľudského genómu (Human Genome Project) inšpiroval výskum genómu u rôznych typov nádorových ochorení. Najefektívnejšiu metódu pre zistenie veľkého množstva genomických informácií o rakovine predstavuje práve technológia masívne paralelného sekvenovania, sekvenovanie novej generácie (Ledford, 2010; Reuter *et al.*, 2015).

Sekvenovanie novej generácie postupne umožňuje rýchlejšie sekvenovanie individuálneho patientskeho genómu či jeho časti s vynaložením nižších finančných prostriedkov, takže je možné nielen jeho využitie pre výskumné potreby, ale i v klinickej praxi. Aj keď je celogenómové sekvenovanie technicky možné, poskytuje viac informácií ako sme schopný prakticky analyzovať a interpretovať. Náročné je najmä spracovanie tohto množstva dát na úrovni, ktorú si klinická aplikácia vyžaduje a vysoké finančné zaťaženie pre diagnostiku individuálneho pacienta. Rozvíjané sú preto najmä génové panely, založené na sekvenovaní novej generácie, u ktorých je možné vyšetřovať iba klinicky dôležité gény. V dnešnej dobe sú tieto testy prvou voľbou v individuálnej patientskej nádorovej starostlivosti, po zavedení NGS technológií do praxe. Pre pacientov s podozrením na dedičnú predispozíciu ku konkrétnemu typu nádoru, je možné navrhnúť panely obsahujúce gény spojené s touto predispozíciou, umožňujúce dosiahnuť dostatočnú hĺbku pokrytia (Nagahashi *et al.*, 2018; Pritchard *et al.*, 2012).

Príkladom sú QIAseq Target DNA panely, ktoré umožňujú digitálne DNA sekvenovanie s využitím unikátnych molekulárných indexov (UMI) na detekciu variant s nízkou frekvenciou, somatických mutácií, jednonukleotidových polymorfizmov, zmien v počte kópií, inzercí a delécií. S využitím cieleného sekvanovania QIAseq panely efektívne zvyšujú sekvenačnú hĺbku a počet spracovaných vzoriek s nízkymi finančnými nákladmi.

Zníženie limitu detekcie variant je umožnené využívaním vysoko optimalizovanej reakčnej chémie, ktorá integruje UMI v procese cieleného obohatenia. **Obrázok 3** znázorňuje prípravu knižnice, kedy v prvom kroku dochádza k vloženiu UMI a následne predĺženiu cieleného úseku pomocou jedného primeru. Následne prebieha inkorporácia indexov pre odlíšenie jednotlivých vzoriek. Príprava knižnice trvá 9 hodín. Vzorka spracovaná týmto spôsobom je osekvenovaná, dáta sú spracované pomocou QIAseq Target DNA Panel softvérovej analýzy a interpretované s použitím špecifických nástrojov (QIAGEN, 2017).



Obrázok 3: Príprava knižnice pomocou QIAseq Target DNA Panels (prevzaté a upravené podľa QIAGEN, 2017a)

Legenda: **UMI** – unikátny molekulový index. **GSP** – géno špecifický primer. **SIP** – primer obsahujúci index označujúci vzorku. **FP** – forward primer. **UP** – univerzálny primer. **Červená hviezda** – cielená mutácia. **Modrá hviezda** – chyba vznikajúca v procese prípravy knižnice, ktorá je eliminovaná pomocou využitia UMI.

3.3 Sekvenačná platforma Illumina

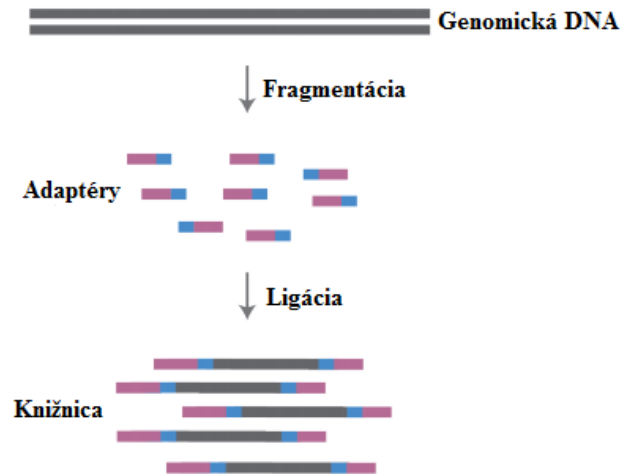
V roku 2006 vydala Solexa prístroj Genome Analyzer, ktorého výkon bol 1 Gb (10^9 báz) na jeden sekvenačný beh. Následne bola Solexa v roku 2007 odkúpená spoločnosťou Illumina. V posledných rokoch dominuje sekvenačnému trhu, najmä kvôli nízkej sekvenačnej cene za bázu. Využíva sekvenovanie pomocou syntézy (SBS), kedy je amplifikovaný DNA templát imobilizovaný na akrylamidom pokrytom povrchu sklenenej prietokovej komôrky (Illumina, 2018; Liu *et al.*, 2012; Quail *et al.*, 2012).

V dnešnej dobe sú dostupné dva rady sekvenátorov od firmy Illumina. K stolným sekvenátorom patria iSeq, MiniSeq, MiSeq a NextSeq. Dostupné sú vysokokapacitné sekvenátory, ku ktorým patrí HiSeq, HiSeq X, NovaSeq ale je možné sem zaradiť i NextSeq sériu. Prístroj HiSeq 2000, ktorého výkon činí 200 Gb na sekvenačný beh, je pomocou multiplexovania inkorporovaného v používaných primeroch a adaptéroch schopný simultánne spracovávať stovky či tisíce vzoriek. Illumina v roku 2011 vydala prístroj MiSeq určený pre využitie v menších laboratóriách a na trhu klinickej diagnostiky. S prístrojom HiSeq zdieľa väčšinu technológií a nachádza svoje praktické využitie najmä v sekvenovaní amplicónov a bakteriálnych vzoriek. MiSeq umožňuje sekvenovanie DNA v čase kratšom ako osem hodín a zahŕňa tvorbu klastrov, sekvenovanie a analýzu dát v jednom prístroji. Tento systém je schopný produkovať párové 300 bázové čítania a 0.5 Gb až 15 Gb nukleotidových sekvencií v priebehu jedného sekvenačného behu. Maximálne množstvo výstupných dát poskytuje prístroj NovaSeq, u ktorého výstup činí 6000 Gb a umožňuje až 20 miliárd čítaní s dĺžkou 2 x 150 bp v jednom sekvenačnom behu. Tento prístroj nachádza uplatnenie v WGS, WES, sekvenovaní malých genómov, cieleom sekvenovaní, metylačnom sekvenovaní, v aplikácii pri analýze RNA, interakciách DNA-proteín a v shotgun metagenomike Prístroj HiSeq X znížil cenu potrebnú na osekvenovanie genómu s pokrytím 30x pod 1000 USD (Genetica, 2019; Illumina, 2013; Illumina, 2016; Illumina, 2019; Liu *et al.*, 2012).

3.3.1 Príprava knižnice a sekvenovanie pomocou syntézy (SBS).

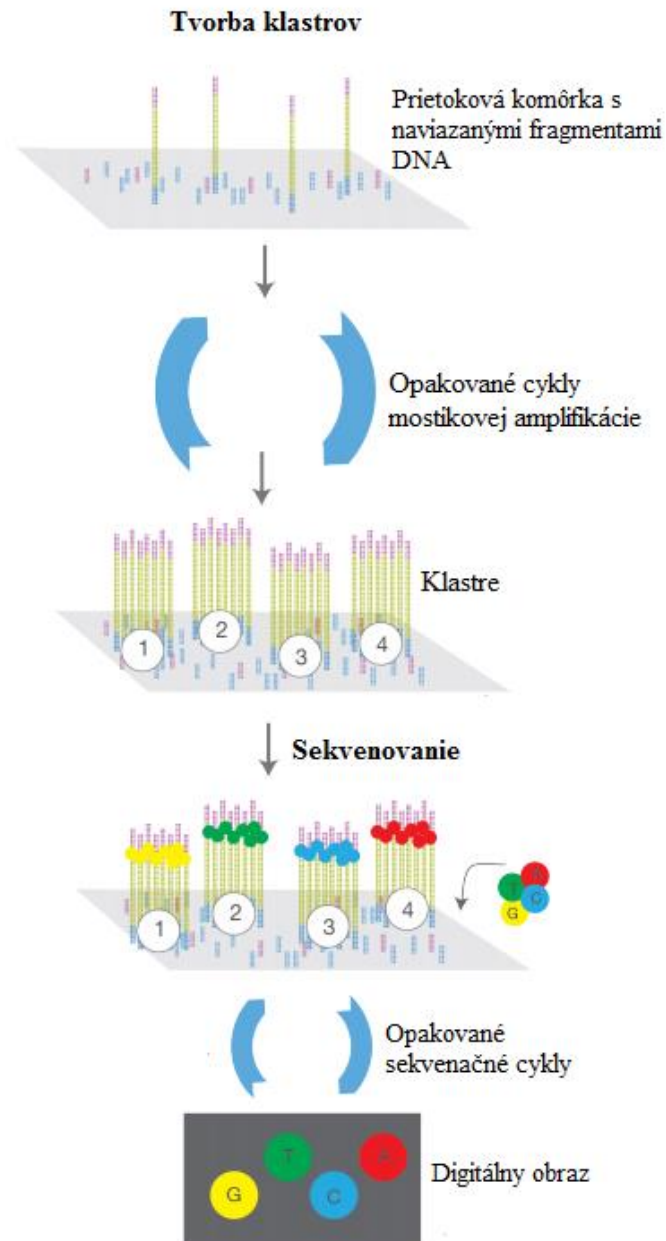
Príprava knižnice pre sekvenovanie novej generácie zahŕňa fragmentáciu DNA, prípadne cDNA (complementary DNA) a následnú ligáciu adaptérov, oligonukleotidov o známej sekvencii, na oba konce fragmentu (viď **Obrázok 4**). Alternatívou je použitie tagmentácie, ktorá spája tieto dva kroky do jedného, čím zvyšuje efektivitu prípravy

knižnice. Fragmenty s ligovanými adaptérmi sú následne amplifikované pomocou PCR. Jednotlivé protokoly pre prípravu knižnice môžu byť plne automatizované. Illumina ponúka riešenia pre prípravu knižníc, určené pre rôzne NGS metódy zahŕňajúce napríklad celogenómové sekvenovanie, cielené DNA a RNA sekvenovanie (Illumina, 2017; Zhou *et al.*, 2010).



Obrázok 4: Príprava knižnice pre NGS pomocou systému Illumina (prevzaté a upravené podľa Illumina, 2017)

Prípravená knižnica je nanosená na prietokovú komôrku, kde sú fragmenty denaturované a na základe komplementarity zachytené pomocou oligomérov naviazaných na povrchu komôrky. Každý imobilizovaný jednoreťazový fragment DNA vytvára mostíkovú štruktúru, pomocou hybridizácie jeho voľného konca s komplementárnym adaptérom. Po pridaní PCR reagensí je tento fragment amplifikovaný pomocou mostíkovej amplifikácie, čím sa po niekoľkých PCR cykloch utvárajú klastre obsahujúce tisíce kópií jedného DNA vlákna (viď **Obrázok 5**). V samotnom sekvenovaní (obrázok 5) sú použité deoxynukleotídy s reverzibilne naviazaným terminátorom. Jednotlivé báze sú detegované pri inkorporácii na základe komplementarity k templátovému reťazcu DNA (Illumina, 2017; Zhou *et al.*, 2010).



Obrázok 5: Tvorba klastrov pomocou mostíkovej amplifikácie a sekvenovanie na platforme Illumina (prevzaté a upravené podľa Illumina, 2017)

3.3.2 Možnosti spracovania sekvenačných dát

V procese analýzy sú identifikované sekvenačné čítania zarovnané k referenčnému genómu. Primárnym dátovým výstupom u všetkých sekvenačných platforiem je dátový súbor vo formáte FASTQ obsahujúci sekvencie jednotlivých čítaní a skóre kvality pre každú bázu. U multiplexovaných vzoriek je nutné v prvom kroku tvorby FASTQ súboru jednotlivé klastre prideliť ku vzorkám na základe indexových sekvencií. Súbor sú následne komprimované, obsahujú sekvenačný identifikátor s informáciami

o sekvenačnom behu a klastri, sekvenciu, separátor (znak +) a skóre kvality (Illumina, 2017a; Ledergerber *et Dessimoz*, 2011).

Pri sekvenovaní novej generácie pomocou sekvenačnej technológie Illumina je v jednom sekvenačnom behu typicky vyprodukovaných 50-200 miliónov čítaní o dĺžke 32-100 bp, čím sa vytvára tlak na používanie softvérov schopných mapovať veľké množstvo krátkych čítaní na referenčný genóm. K tomu je možné použiť napríklad softvér MAQ (Mapping and Assembly with Qualities), BWA (Burrows-Wheeler Alignment) a BowTie, ktoré používajú podobný algoritmus. Softvér BWA je schopný mapovať jednotlivé čítania k referenčnému genómu v kratšom čase s rovnakou presnosťou ako spomínaný MAQ, avšak nie je vhodný pre mapovanie dlhých sekvencií, pri ktorých sa odporúča rozdelenie čítania do krátkych fragmentov a ich následné oddelené mapovanie k referencii (Li *et al.*, 2008; Li *et Durbin*, 2009).

Pomocou genómových prehliadačov ako IGV (Integrative Genomics Viewer) je možné vizualizovať jednotlivé sekvenačné čítania zo súborov vo formáte SAM, prípadne v binárnom formáte BAM. Ten umožňuje definovanie ľubovoľných anotácií vzorky, napríklad identifikátor alebo fenotyp, ktoré sú pridelené k jednotlivým dátovým stopám (Robinson *et al.*, 2011).

V ďalšom kroku je nutné vyhľadať všetky odlišnosti nasekvenovanej DNA od referenčného genómu (variant calling). Tento krok je kľúčový pre odlišenie skutočných variant od artefaktov pochádzajúcich z prípravy knižnice, sekvenovania a mapovania. Genetické varianty je možné rozdeliť do troch skupín: jednonukleotidové varianty (SNV), multinukleotidové varianty (MNV), inzercie a delécie (indel), štrukturálne varianty (SV). V prvom kroku je nutné vyradenie čítaní s nízkou kvalitou. Na detekciu jednotlivých variant sú používané rôzne algoritmy, ktoré je možné rozdeliť na analýzu variant medzi nádorovou a normálnou vzorkou pacienta, analýzu pre jednu vzorku v prípadoch, kedy je dostupná iba nádorová vzorka. Ďalej je možné použiť analýzu založenú na univerzálnych molekulových indexoch u variant s nízkou frekvenciou a analýzu RNA-seq, ktorá deteguje fúzne gény (Xu, 2018).

3.3.3 Analýza variant založená na unikátnych molekulových indexoch

UMI sú používané pre detekciu variant s nízkou frekvenciou, ktoré by mohli byť zamenené s chybami pri sekvenovaní, ktoré sú u platforiem Illumina kvantifikované na 0,1 % na nukleotid. Frekvencia chýb, ktoré vznikajú pri tvorbe klastrov, sekvenačných

cyklov a analýzy obrazu, je u prístrojov HiSeq 2000 a MiSeq 10^{-3} . Dostupných je niekoľko nástrojov na analýzu variant založenú na UMI napríklad DeepSNVMiner, MAGERI, smCounter (Fox *et al.*, 2014; Xu, 2018).

MAGERI (Molecular tagged genome re-sequencing pipeline) je softvérový nástroj spájajúci extrakciu univerzálnych molekulových indexov, spájanie sekvenčných čítaní obsahujúcich rovnaký index do konsenzu, následné zarovnanie k referenčnej sekvencii a analýzu variant zo súborov vo formáte FASTQ. Toto spracovanie je schopné opraviť chyby v UMI sekvencii a jeho výhodou je redukcia dát pomocou konsenzu do skupín rovnakých molekulových identifikátorov (MIG). Softvér MAGERI predstavuje riešenie uplatňujúce sa v aplikáciách vyžadujúcich vysokú presnosť pri štúdiách nádorovej genómovej heterogenity, detekcii cirkulujúcej nádorovej DNA a zriedkavých rezistentných variant. Zarovnanie k referenčnej sekvencii a analýza variant vyžaduje referenčný súbor v textovom formáte FASTA obsahujúcom popis, ktorý je nasledovaný sekvenčnými dátami. MAGERI generuje viacero interných výstupných súborov, ktoré sumarizujú výsledky každého kroku v procese spracovania. Tieto textové súbory sa používajú na analýzu kontroly kvality. Výstup vo formáte SAM môže byť ďalej vizualizovaný pomocou vyššie spomínaného IGV prehliadaču. Druhým typom výstupu je VCF súbor (Variant Call Format), u ktorého je možné pomocou SnpEff nástroju predikovať efekt genetických variácií na gény a proteíny (MAGERI, 2015; Pearson, 2016; Shugay *et al.*, 2017).

3.4 Biomarkery vyšetované z cirkulujúcej nádorovej DNA

Cirkulujúca nádorová DNA (ctDNA) patrí spolu s cirkulujúcimi nádorovými bunkami (CTCs), exozómami obsahujúcimi fragmenty DNA a cirkulujúcou RNA medzi biomarkery detegované z tekutej biopsie. Nádorové bunky do cirkulácie uvoľňujú DNA fragmenty, ktoré je možné spolu s fragmentami uvoľnenými z normálnych funkčných buniek (cfDNA) nájsť v nebunkovej frakcii krvi. ctDNA uvoľňovaná zo všetkých častí nádoru je zdrojom celého genómu nádoru a je získavaná počas odberu biologického materiálu označovaného ako tekutá biopsia. Táto metóda je v porovnaní s biopsiou tkanív minimálne invazívna a je možné ju použiť na určenie vhodnej liečby či progresie u onkologických pacientov v skorých štádiách ochorenia (Chen *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2017; Heitzer *et al.*, 2015; Masuda *et al.*, 2016; Takai *et al.*, 2016).

V roku 1869 boli prvýkrát pozorované CTCs u pacientov s metastázami Thomasom Ashworthom, ktorý navrhol prítomnosť nádorových buniek v cirkulácii ako možné vysvetlenie vzniku metastáz. V roku 1948 bola popísaná cirkulujúca DNA (cfDNA) a v 1987 bola pozorovaná jej zvýšená hladina u pacientov s metastatickými nádormi v pokročilom štádiu. Nádorový pôvod týchto molekúl v plazme onkologických pacientov bol dokázaný v roku 1994 detekciou *KRAS* mutácie s použitím alelovo špecifickej amplifikácie vzoriek cfDNA pacientov s nádormi pankreasu. Prítomnosť mutovaných onkogénov v plazme a séru tak predstavuje vhodný marker pre diagnózu, determinovanie odpovede na zvolenú liečbu a predikciu prognózy. Pôvod cfDNA bol v rovnakom roku potvrdený u pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou, u ktorých bola v kostnej dreni a plazme detegovaná mutácia *NRAS* génu (Ashworth, 1869; Stroun *et al.*, 1948; Crowley *et al.*, 2013; Sorenson *et al.*, 1994; Vasioukhin *et al.*, 1994).

3.4.1 Pôvod a vlastnosti ctDNA

Cirkulujúca nádorová DNA pochádza zo životaschopných, apoptických a nekrotických nádorových buniek a môže byť uvoľnená z primárnych nádorov, CTCs a metastáz do krvi pacienta. V krvi sa taktiež nachádza voľná DNA pochádzajúca z nemalígnych hostiteľských buniek, ktorej zvýšenie je pozorovateľné najmä pri použití terapií spôsobujúcich poškodenie tkaniva (rádioterapia, chemoterapia, operačné zákroky) (Alix-Panabieres *et al.*, 2016).

Diskriminácia pôvodu DNA fragmentov je možná na základe určenia ich veľkosti. Fragmenty ctDNA s veľkosťou niekoľkých kilobáz sú uvoľňované v procese nekrózy

a malé fragmenty, ktorých veľkosť sa pohybuje v rozmedzí 180 až 540 bází pochádzajú z apoptotických buniek. Počas života ctDNA je 15 minút až niekoľko hodín a je z cirkulácie odstraňovaná obličkami a pečeňou. Krátka životnosť ctDNA umožňuje monitorovanie zmien v priebehu niekoľkých dní (Fleischhacker *et* Schmidt, 2006; Han *et al.*, 2017; Jahr *et al.*, 2001; Leon *et al.*, 1977).

U pacientov s nádormi sa dvojvláknové fragmenty DNA v plazme a v séru vyskytujú v značných množstvách. Množstvo DNA v 1 ml plazmy pacientov s rôznymi typmi nádorov sa pohybuje od úrovne 10 až 20 ng až po hodnoty 1000 ng. Frakcia ctDNA koreluje s veľkosťou nádoru. Menšie nádory uvoľňujú menšie množstvo DNA, zatiaľ čo väčšie nádory prerastajúce do okolitého tkaniva uvoľňujú väčšie množstvo fragmentov a zároveň sa do cirkulácie dostáva DNA zo zdravého tkaniva priľahlého k nádoru. Na základe toho, je frakcia ctDNA v celkovej cirkulujúcej DNA vyššia v prípadoch, kedy je množstvo cirkulujúcej DNA nižšie. U pacientov s metastatickými štádiami nádorov boli pozorované vyššie hodnoty koncentrácie DNA v séru (Jahr *et al.*, 2001; Leon *et al.*, 1977).

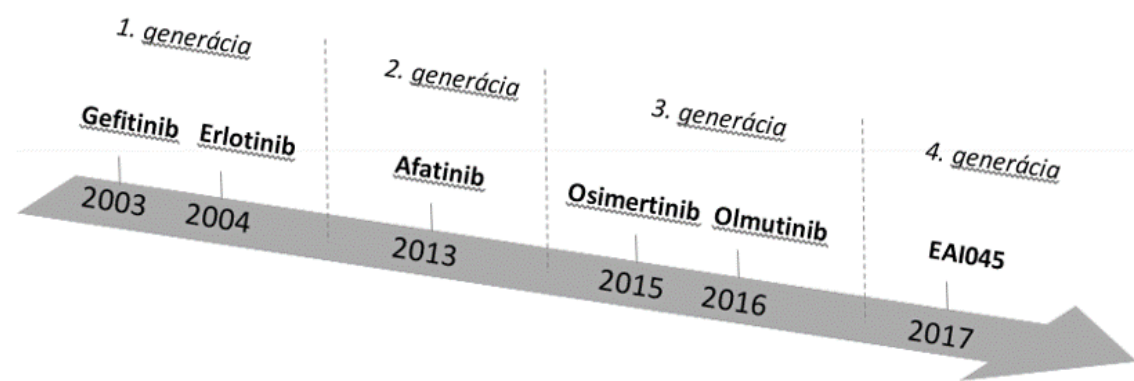
3.4.2 Využitie ctDNA v detekcii nádorových biomarkerov

Význam ctDNA ako nádorového biomarkeru vyplýva z uvoľňovania fragmentov z delokalizovaných rakovinových buniek, čo potenciálne prináša presnejšiu reprezentáciu heterogenity nádoru v porovnaní so vzorkami tkaniva. Tekutá biopsia tak pokrýva komplexný genetický profil nádoru. Aplikáciu ctDNA nachádza v determinácii prognózy, monitorovaní liečby a detekcii recidívy, aproximácii veľkosti nádoru, výbere liečby a detekcii rakoviny u jedincov bez prejavov ochorenia. ctDNA umožňuje detekciu mutácií a epigenetických zmien v krvnej plazme, ktoré odrážajú fyzický stav a odpoveď na špecifickú liečbu u pacientov s rozvojom nádorov. Prítomnosť genetických zmien spojených s rozvojom nádorov z ctDNA bola popísaná u pacientov s nádormi prsníka, krčku maternice, hrubého čreva, žalúdka, hlavy a krku, krvi, pečene, obličiek, pankreasu, kože, ovárií, pľúc, prostaty a pažeráka. (Diaz *et* Bardelli, 2014; Fiala *et* Diamandis, 2018; Fleischhacker *et* Schmidt, 2007; Han *et al.*, 2017).

V roku 2003 bola predstavená prvá generácia liečiv cielených na tyrozínkinázovú doménu EGFR. U polovice pacientov sa pri použití tejto liečby objavila rezistencia, ktorej príčina bola identifikovaná pomocou vyšetrenia biopsie a následne potvrdená analýzou plazmy. Mutácia T790M spôsobujúca spomínanú rezistenciu a následnú recidívu nádoru

je prvým príkladom toho, že mutácie spôsobujúce odolnosť na cieľnú liečbu solidných nádorov je možné detegovať neinvazívne v krvi pacientov. Monitorovanie mutácií v plazme tak ponúka možnosť sledovať odpoveď nádoru na liečbu s použitím prvej a druhej generácie TKI (Chen *et al.*, 2018; Diaz *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016; Mok *et al.*, 2017; Sequist *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017).

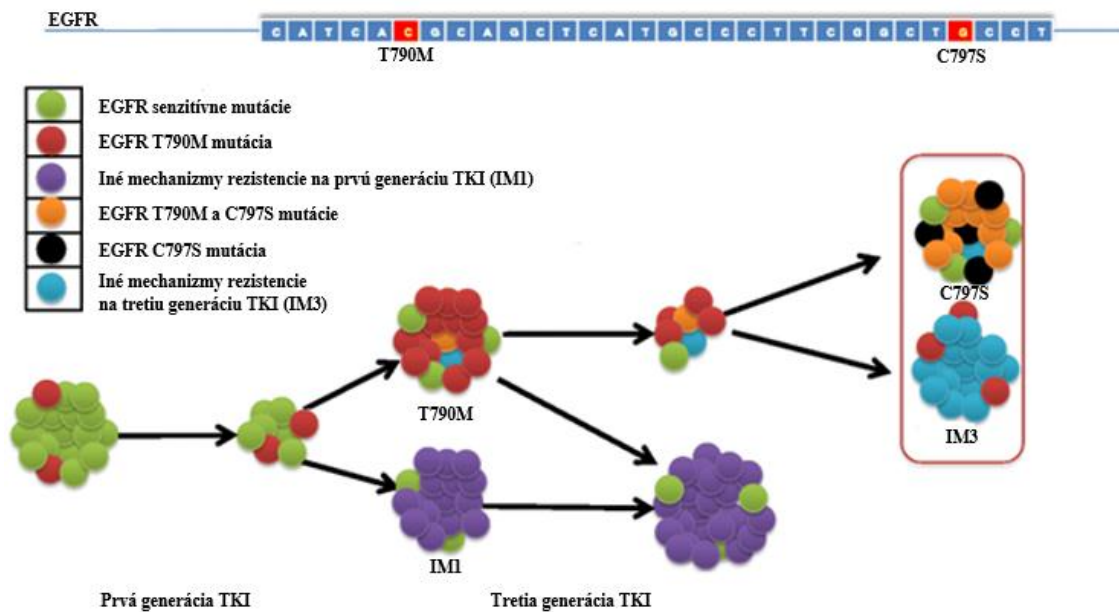
Vzhľadom na objavenie príčiny rezistencie, boli ďalej vyvíjané ďalšie generácie TKI, cieľené špecificky proti nádorom nesúcim rôzne mutácie. Ich prehľad a vývoj schematicky zobrazuje **Obrázok 6**. Tretia generácia TKI (osimertinib, rociletinib, olmutinib) je cieľená špecificky proti T790M pozitívnym NSCLC, avšak u tejto generácie sa objavuje nový spôsob rezistencie nádorov spôsobenej mutáciou C797S. Vzhľadom na to, že táto mutácia sa javí ako vedúci spôsob rezistencie, je vhodným cieľom na prekonanie tejto odolnosti nádorov. V tejto spojitosti bola vyvinutá štvrtá generácia TKI (EAI045), ktorá špecificky cieľi proti nádorom nesúcim mutácie T790M a C797S (Wang *et al.*, 2017).



Obrázok 6: Schéma časového vývoja jednotlivých generácií tyrozínkinázových inhibítorov (TKI) (vytvorené podľa Chen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017)

Sledovanie mutácií spôsobujúcich rezistenciu voči TKI s využitím ctDNA získanej zo vzoriek plazmy odobratých pred a po nasadení cieľenej liečby poskytuje globálny molekulárne-genetický obraz o pacientovom nádore. U rovnakého pacienta sa môžu vyskytnúť rôzne mutácie, dynamické zmeny v mutačnom profile, ktoré sa objavia počas liečby alebo sú dôsledkom heterogenity nádoru a selekčného tlaku terapeutík. Príkladom je klonálna evolúcia nádorových buniek u NSCLC v spojitosti s rezistenciou na tretiu generáciu TKI (viď **Obrázok 7**). Jednotlivé klony sú farebne odlišené a ich počet reprezentuje ich relatívnu veľkosť. Na tomto príklade je pozorovateľný dôsledok selekčného tlaku pri použití prvej prípadne druhej generácie TKI, ktorý spôsobí recidívu

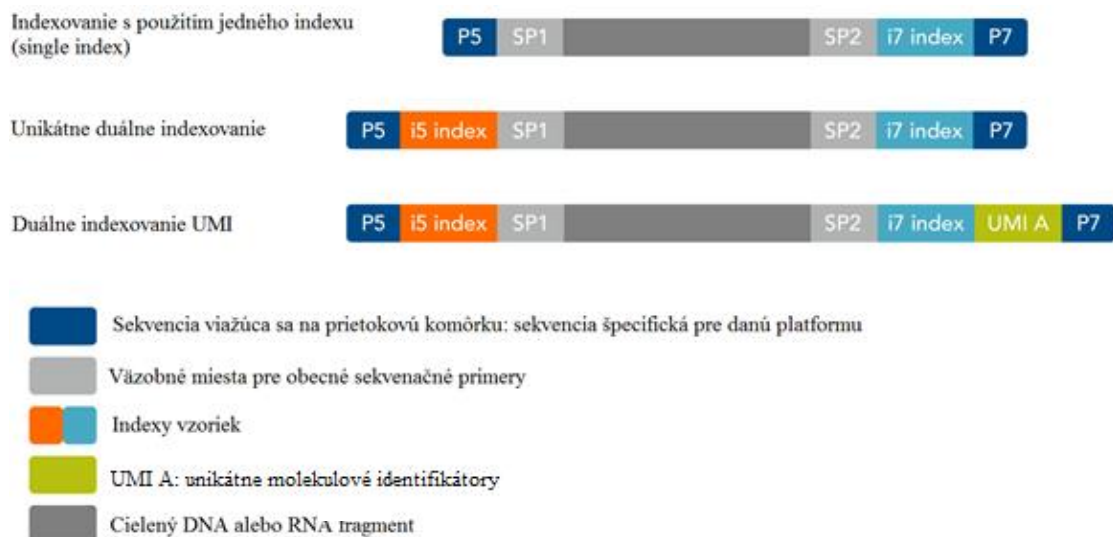
nádoru s vysokým výskytom buniek nesúcich mutáciu T790M. Po nasadení tretej generácie TKI sa môže objaviť spomínaná mutácia C797S. Vývoj, ktorý je u nádorov pozorovaný pri použití cielenej liečby, vytvára tlak na jeho kontinuálne sledovanie a na základe takto odhalených zmien je možný výber najvhodnejšej liečby. Tekutá biopsia je neinvazívnou metódou umožňujúcou sledovanie zmien v mutačnom profile v priebehu liečby, ktorá dostatočne rýchlo odráža reakciu nádorových buniek (Diaz *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016).



Obrázok 7: Klonálna evolúcia nádorových buniek u NSCLC zobrazujúca vývoj nádoru pri použití jednotlivých generácií tyrozínkinázových inhibítorov (TKI) (upravené podľa Wang *et al.*, 2016)

3.5 Unikátne molekulové indentifikátory a indexy determinujúce vzorku

Barkóding, firmou Illumina tiež označovaný ako indexovanie, je metóda, ktorá umožňuje paralelné sekvenovanie viacerých knižníc a vzoriek. Príprava indexovaných knižníc vyžaduje pridanie identifikátora k DNA vzorke počas prípravy knižnice. Unikátne molekulové indentifikátory (UMI) slúžia primárne na rozpoznanie falošných pozitív, zatiaľ čo indexy vzoriek (sample index, SI) determinujú vzorku, z ktorej pochádza daná sekvenca. Illumina adaptory typicky obsahujú jeden (i7) alebo dva (i7, i5) SI. Pri použití dvoch indexov hovoríme o duálnom indexovaní. Do adaptérov je tiež možné vložiť UMI. Jednotlivé príklady adaptérových dizajnov zobrazuje **Obrázok 8** (Illumina, 2015; Integrated DNA Technologies ; Witte *et al.*, 2017).



Obrázok 8: Príklady adaptérových dizajnov v primeroch pre prípravu sekvenačnej knižnice (upravené podľa Integrated DNA Technologies)

Použitie jediného indexu zvyšuje výskyt PCR skokov („PCR jumping“) a náhodného miešania oligonukleotidov. Obmedzenie, prípadne vylúčenie týchto chýb nie je pri tejto stratégii indexovania možné. Aj napriek tomu je tento spôsob stále atraktívny a využívaný v sekvenovaní krátkych oblastí. V duálnom indexovaní oba adaptéry nesú špecifickú sekvenciu, čo umožňuje zvýšenie celkovej kapacity na jeden sekvenačný proces. Použitie dvoch barkódov na jednu knižnicu podmieňuje použitie dvoch sekvenačných indexových primerov. Duálne indexovanie znižuje riziko kontaminácie oligonukleotidov a umožňuje korporatívnu amplifikáciu rôznych vzoriek (Kircher *et al.*, 2012; MacConaill *et al.*, 2018).

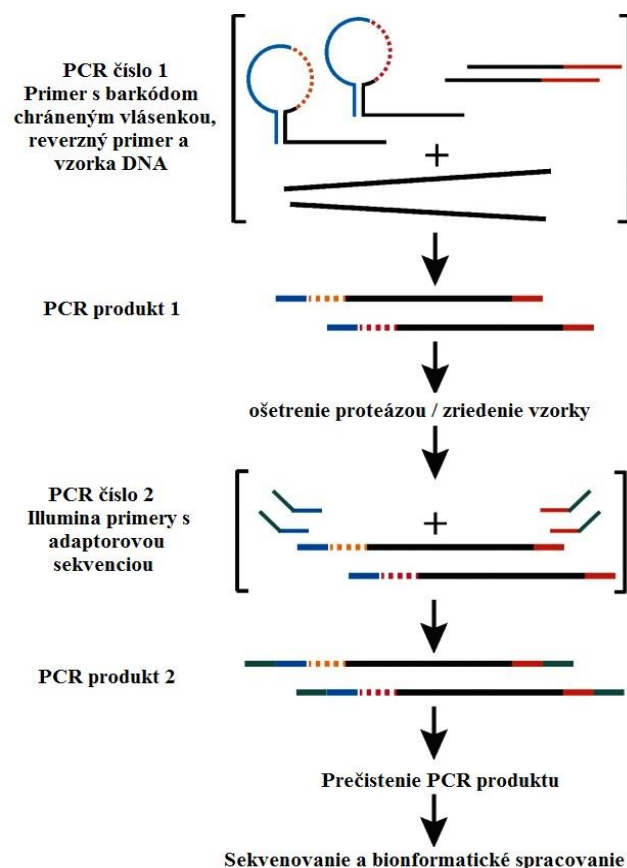
Stratégie, ktorými je docielené indexovanie jednotlivých vzoriek sa líšia svojim postupom a vhodnosťou použitia pre jednotlivé prípady. Stratégia, pri ktorej sa barkód nachádza bezprostredne za templátom a je sekvenovaný v jednom čítaní spolu s cieľenou oblasťou, sa nazýva „in-line“. Tento spôsob berie časť sekvenačnej kapacity a je determinovaný. Multiplexové sekvenovanie, na rozdiel od predchádzajúcej stratégie, obsahuje oddelené sekvenačné čítanie pre index. Najväčšou výhodou je možnosť paralelného sekvenovania až 96 vzoriek, čo významne prispieva k redukcii časovej náročnosti a množstva reagensov, pričom výsledkom sú dáta vysokej kvality. Je potrebné použitie troch sekvenačných primerov a to priameho, spätného a primeru na sekvenovanie indexu. Multiplexovanie vzoriek je zaťažené rizikom nesprávneho pridelenia indexu (cross-talk), ktoré vzniká v prípadoch, kedy je index v zmiešanej knižnici vo veľkej miere zhodný so sekvenciou čítania inej vzorky. Väčšina chýb je spôsobená chybami v detekcii jednotlivých klastrov, sporadickou kontamináciou oligonukleotidov nesúcich rôzne indexy, v prípade hromadnej amplifikácie viacerých knižníc aj takzvanými PCR skokmi, teda rekombináciou rôznych templátových molekúl počas PCR (Dijk *et al.*, 2014; Illumina Multiplex Sequencing, 2008; Kircher *et al.*, 2012).

3.5.1 Využitie unikátnych molekulových identifikátorov v detekcii variant s nízkou frekvenciou

Použitie UMI, krátkych DNA sekvencií, nám umožňuje amplifikáciu vzorky bez straty informácie o počte originálnych molekúl. Počet UMI v knižnici pôsobí ako molekulárna pamäť počtu DNA molekúl v originálnej vzorke. Táto metóda je kompatibilná s použitím indexov označujúcich separátne vzorky DNA, čo umožňuje jej využitie v multiparalelnom sekvenovaní. Použitím UMI je možné identifikovať PCR duplikáty a artefakty. Bolo pozorované zlepšenie hodnôt kvantitatívnych sekvenačných dát. Každý PCR duplikát, ktorý vzniká amplifikáciou jedného vlákna DNA, bude obsahovať sekvenciu, ktorou bola táto molekula označená. Takto sa v priebehu amplifikácie vytvárajú jednotlivé rodiny molekúl odvodené z jednej počiatkovej molekuly. Po sekvenovaní sú členovia týchto rodín identifikované a spojené do jednotlivých skupín, zdieľajúcich rovnakú sekvenciu. Porovnaním sekvencie členov rodiny je vytvorený konsenzus a identifikovaná výsledná nukleotidová sekvencia. Tento krok odfiltruje náhodné chyby, ktoré vznikli v priebehu PCR alebo sekvenovania. Výsledkom sú sekvencie, z ktorých každá prislúcha jednej individuálnej molekule DNA v použitej vzorke (Kivioja *et al.*, 2011; König *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2012)

UMI nachádzajú využitie v sekvenovaní cfDNA s použitím vzoriek plazmy, pri ktorom výsledné sekvenčné čítania nemusia dostatočne reprezentovať originálnu DNA populáciu, keďže počet čítaní presahuje počet cielených molekúl, čo vo výsledku môže ovplyvniť kvantifikáciu mutovaných aliel. Systém Safe-Sequencing využíva 12 až 14 bázové jednovláknové a je schopný zlepšiť detekciu mutácií až na hodnotu 10^{-5} na pár bází (Kinde *et al.*, 2011; Kukita *et al.*, 2015).

Metóda SiMSen-Seq (Simple, Multiplexed, PCR-based barcoding of DNA for Sensitive mutation detection using Sequencing) redukuje tvorbu nešpecifických produktov PCR a zároveň zvyšuje amplifikáciu špecifického produktu. Využíva stratégiu molekulárných vlásenek na ochranu indexových sekvencií v prvej PCR (viď **Obrázok 9**). Použitím štandardnej multiplexovej pre-amplifikácie s nízkou koncentráciou primerov je docielené zníženie nešpecifických produktov PCR. V druhej PCR sú použité primery obsahujúce adaptérovú sekvenciu (Ståhlberg *et al.*, 2016).



Obrázok 9: Schematické zobrazenie prípravy knižnice a sekvenovanie vzoriek metódou SiMSen-Seq (prevzaté a upravené podľa Ståhlberg *et al.*, 2016)

Použitie týchto metód na detekciu vzácnych mutácií má potenciál dramaticky zmeniť diagnostiku ochorení a jej monitorovanie. Poskytujú možnosť vysoko senzitívnej detekcie špecifických vzácnych mutácií a zabezpečujú skríning mutácií vo vzorkách obsahujúcich vysoké množstvo štandardných molekúl DNA. Perspektívne by preto mohlo použitie univerzálnych molekulových indexov zlepšiť diagnostikovanie nádorových ochorení v skorých štádiách ochorenia s použitím vzoriek cirkulujúcej nádorovej DNA a cirkulujúcich nádorových buniek (Gregory *et al.*, 2015; Schmitt *et al.*, 2012).

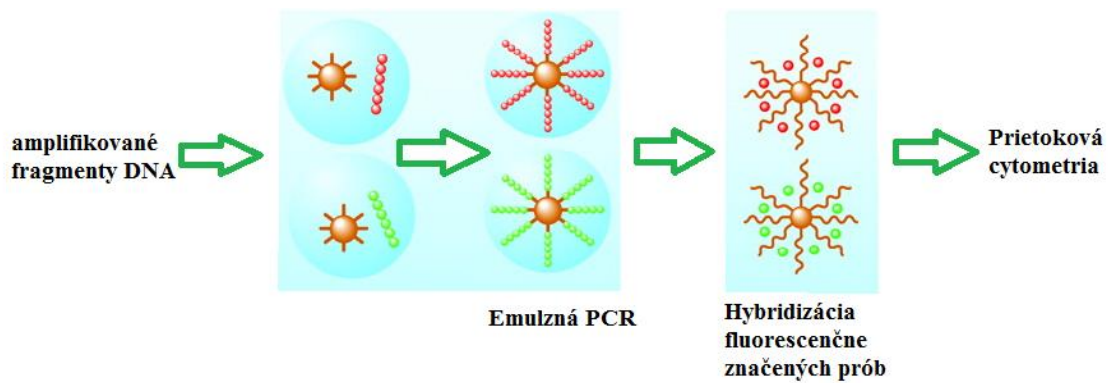
3.6 Trendy v detekcii cirkulujúcej nádorovej DNA

Cirkulujúca DNA je ideálnym zdrojom genetických informácií u pacientov s nádormi a dnes sa početné štúdie zaoberajú jej uplatnením v klinických aplikáciách. Náročnosť detekcie cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) v onkológii je daná náročným rozlíšením cirkulujúcich molekúl DNA rôzneho pôvodu, presnosťou kvantifikácie počtu mutantných fragmentov vo vzorke a prítomnosťou nízkej koncentrácie ctDNA. Vyšetrovanie cirkulujúcej nádorovej DNA u pacientov je možné prevádzať najmä kvôli vyvíjajúcim sa digitálnym genomickým technológiám, ktoré umožňujú vyčíslenie vzácných variant v komplexnej vzorke DNA. Medzi najnovšie používané metódy patrí hlboké sekvenovanie, digitálna PCR, BEAMing (Beads, Emulsification, Amplification and Magnetics) a PAP (polymerázová reťazová reakcia aktivovaná lýzou pyrofosfátu) (Diaz *et al.*, 2014; Jun-Liang *et al.*, 2016).

3.6.1 Metóda BEAMing

Metóda BEAMing (Beads, Emulsification, Amplification and Magnetics) umožňuje detekciu mutácií z krvi, ktorá obsahuje voľnú cirkulujúcu nádorovú DNA uvoľnenú do krvného obehu. Je možné ju použiť na detekciu špecifických bodových mutácií v génoch záujmu a na izolovanie molekúl DNA obsahujúcich špecifické varianty pre ďalšie experimenty. Umožňuje vyhodnotenie miliónov individuálnych DNA molekúl v štandardných laboratóriách (Diehl *et al.*, 2008; Dressman *et al.*, 2003).

Táto metóda prevádza populáciu DNA fragmentov na populáciu magnetických guľičiek, z ktorých každá nesie tisíce kópií identickej sekvencie. V prvom kroku využíva väzbu amplifikovaných fragmentov DNA na špecifické primery, ktoré sa nachádzajú na povrchu magnetických guľičiek. Každá DNA molekula je naviazaná na jednu časticu. Polymerázová reťazová reakcia na amplifikáciu DNA následne prebieha v emulzii oleja, vody a reagensov nezbytných pre reakciu. Po pridaní fluorescenčne značených prôb špecificky sa viažucich na nezmutovanú sekvenciu génu, prípadne na sekvenciu obsahujúcu bodovú mutáciu, prebieha hybridizácia na amplifikované DNA fragmenty. Na detekciu fluorescenčných značiek a kvantifikáciu počtu guľičiek obsahujúcich mutované DNA je prevedená magnetická prietoková cytometria (viď **Obrázok 10**) (Dressman *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2012).



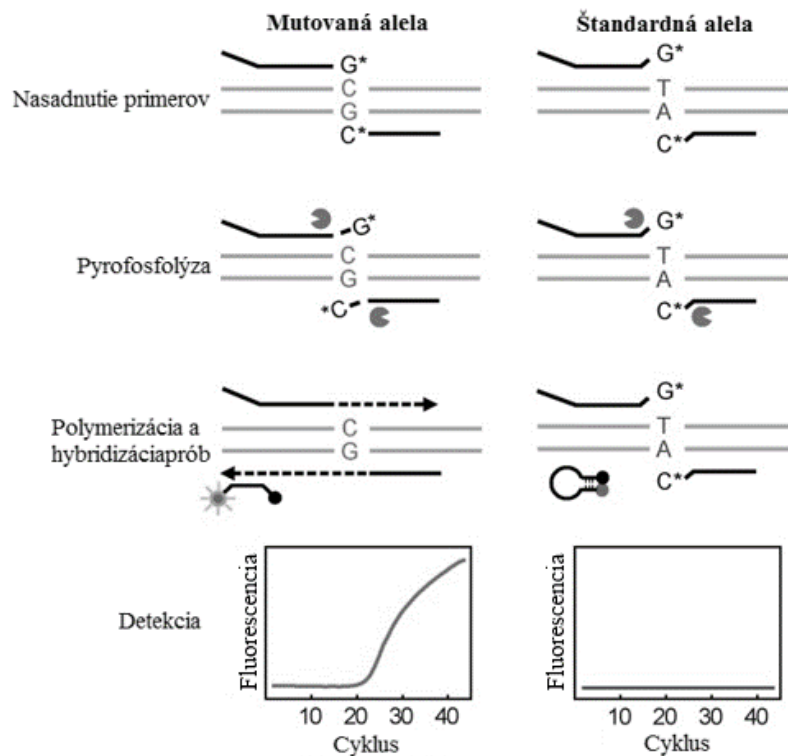
Obrázok 10: Zobrazenie postupu spracovania a detekcie amplifikovaných fragmentov PCR s použitím metódy BEAMing (upravené podľa Lauring *et al.*, 2011)

BEAMing je možné použiť na identifikáciu a kvantifikáciu mutácií s nízkou frekvenciou výskytu, ako aj štúdium variácií génových sekvencií v špecifickej populácii alebo tkanive. Je metódou vhodnou pre relatívne neinvazívne vyhodnotenie mutačného statusu s použitím vzoriek krvi u pacientov s nádorovými ochoreniami. Ukazuje sa ako diagnostická technika vhodná pre sledovanie výskytu mutácií spôsobujúcich rezistenciu, ktorá je použiteľná v rôznych štádiách liečby, čo umožňuje maximalizovať efektivitu cieľenej terapie (Dressman *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2012).

3.6.2 Polymerizácia aktivovaná lýzou pyrofosfátu

Pre kvantifikáciu cirkulujúcej nádorovej DNA je možné použiť metódu polymerázovej reťazovej reakcie aktivovanej lýzou pyrofosfátu, PAP. Je to vysokošpecifická metóda odvodená od PCR pre detekciu bodových mutácií v prítomnosti veľkého množstva DNA štandardného typu (Madic *et al.*, 2012).

Metóda spája lýzu pyrofosfátu a polymerizáciu s použitím PAP primerov, ktoré sú na ich 3' konci blokováné dideoxynukleotidom. Tieto PAP oligonukleotidy môžu byť polymerizované iba po ich aktivácii odstránením dideoxynukleotidu v prítomnosti pyrofosfátu a templátovej DNA. Pre zvýšenie analytickej selektivity bola vyvinutá obojsmerná polymerizácia aktivovaná lýzou pyrofosfátu, ktorá využíva dva blokováné primery prekrývajúce sa v jednej báze (viď **Obrázok 11**). Použitie obojsmernej polymerizácie v reálnom čase umožňuje detekciu 0,01% mutácií s použitím 100 ng templátovej DNA (Zhenbin *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2000; Najie *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014).



Obrázok 11: Princíp obojsmernej polymerizácie aktivovanej lýzou pyrofosfátu (prevzané a upravené podľa Song *et al.*, 2014)

Špecifická tejto metódy, umožňujúca odlišenie jednonukleotidových zmien, je odvodená z potreby perfektného nasadnutia blokových oligonukleotidov na komplementárnu cieľovú sekvenciu pre ich aktiváciu. Táto metóda je schopná detekcie jednej mutantnej kópie DNA alebo RNA prítomnej v jednom bilióne molekúl bez výskytu falošne pozitívnej amplifikácie (Zhenbin *et al.*, 2009; Madic *et al.*, 2012).

3.6.3 Digitálna polymerázová reťazová reakcia

Digitálna PCR bola objavená Vogelsteinom a Kinzlerom ako rozšírenie aplikácie konvenčnej PCR. Reprezentuje metódu kombinujúcu PCR a nové detekčné technológie, na rozšírenie možností pre genetickú analýzu. Svoje využitie nachádza v detekcii mutácií nachádzajúcich sa vo vzorke v nízkej koncentrácii (Vogelstein *et Kinzler*, 1999).

Táto technológia je založená na aplikácii optimálnych PCR podmienok pre amplifikáciu jedného templátu, po ktorej nasleduje detekcia PCR produktov so špecifickou sekvenciou. V prvom kroku je DNA aplikovaná na doštičku tak, že v priemere pripadá jedna templátová molekula DNA na dve jamky použitej doštičky. Po prebehnutí PCR sú analyzované jednotlivé jamky na prítomnosť produktu mutantnej alebo štandardnej

sekvencie s použitím fluorescenčných prób. Kvantita rôznych templátov je následne odvodená z počtu jamiek vykazujúcich pozitívny signál (Vermeulen *et al.*, 2009; Vogelstein *et Kinzler*, 1999; Yung *et al.*, 2009).

Digitálna PCR je metóda generujúca amplikóny, ktoré sú odvodené výhradne z jednej templátovej molekuly, umožňuje detekciu pomocou fluorescencie prípadne sekvenovania na odlišenie rôznych aliel. Limit detekcie je definovaný počtom jamiek, ktoré je možné analyzovať a vnútornou mierou mutácií polymerázy použitej na amplifikáciu. Ku príkladu komerčne dostupná doštička s 384 jamkami teoreticky povoľuje senzitivitu na detekciu mutácií na úrovni 0,1 %. Táto senzitivita môže byť limitovaná chybovosťou použitej polymerázy (Pohl *et Shih*, 2004; Vogelstein *et Kinzler*, 1999).

Maximálna presnosť tejto metódy je dosiahnutá pri optimálnej koncentrácii vzorky DNA. Chang a spolupracovníci ako prví vykonali digitálnu PCR na determináciu alelického statusu s použitím DNA v plazme a vyhodnotili potenciál tejto technológie pre detekciu nádorov v 330 vzorkách pacientov. Vďaka tomu, že každá jamka obsahuje v priemere menej ako jednu molekulu templátovej DNA, je možné túto metódu využiť na detekciu mutantných DNA sekvencií vo vzorke obsahujúcej veľké množstvo DNA s štandardnou sekvenciou (Chang *et al.*, 2002; Whale *et al.*, 2013; Yung *et al.*, 2009).

3.6.4 Metódy hlbokého sekvenovania

Hlboké sekvenovanie odkazuje na mnohonásobné sekvenovanie genomického regiónu, čo umožňuje detekciu vzácnych mutácií zahrňujúcich menej ako 1 % pôvodnej vzorky. Využitie v onkológii nachádza najmä z dôvodu vysokého obsahu štandardných buniek vo vzorkách u pacientov s nádormi a obsahu rôznych sub-klonov nádorových buniek obsiahnutých v samotnom nádore. Hĺbku sekvenovania ovplyvňuje obsah štandardných buniek a nádorových buniek vo vzorke, heterogenita nádoru a vyžadovaná senzitivita. Senzitivita tejto metódy je limitovaná chybovosťou sekvenátoru vzhľadom na to, že chybné prečítaná báza môže byť identifikovaná ako mutantná kópia. Identifikácia malého množstva ctDNA obsiahnutého vo vzorkách DNA izolovaných z plazmy môže byť preto problematické. Zvýšenie senzitivity sekvenovania ponúka využitie UMI popísané v kapitole 3.5 (Illumina, 2019a; Narayan *et al.*, 2012)

Personalizované profilovanie nádorov pomocou hlbokého sekvenovania (CAPP-Seq) je ekonomická a ultrasenzitívna metóda aplikovaná na kvantifikáciu ctDNA. Kombinuje optimalizovanú prípravu knižnice s použitím nízkeho vkladu DNA a biotinylovaných

DNA oligonukleotidov cielených na mutované oblasti u pacientov s rakovinou. Metóda je schopná detegovať bodové mutácie, SNP, inzercie, preskupenie a zmenu počtu kópií génov. CAPP-Seq umožňuje paralelné vyšetrenie tisícov genómových lokusov pomocou neinvazívneho genotypovania na rozdiel od iných metód, ako amplikónové sekvenovanie, u ktorých je schopnosť paralelného vyšetrenia rôznych mutácií limitovaná a vyžaduje rozdelenie vzorky do niekoľkých alikvotov. CAPP-Seq metóda jej schopná detegovať frakciu mutantnej alely pod 0,02 % so špecificitou 96 %. Hlboké sekvenovanie a jeho vylepšenia ponúkajú vysokošpecifickú možnosť detekcie mutácií s nízkou frekvenciou (Bratman *et al.*, 2015; Newman *et al.*, 2014).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

- Ako biologický materiál boli použité vzorky DNA izolované z krvi pacientov personálom Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny.
- V experimentoch bol použitý EGFR géno-špecifický multiplexový referenčný štandard gDNA (Horizon Discovery, kat. č. HD 802) a EGFR wild type referenčný štandard (Horizon Discovery, kat. č. HD 709).

4.2 Použité chemikálie súpravy a roztoky

Použité súpravy

- QIAquick PCR Purification Kit (250) (QIAGEN, kat. č. 28106)
- QIAxcel DNA Kit (1200) (QIAGEN, kat. č. 929002)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoScientific, kat. č. Q32851)

Použité chemikálie

- 5x Colorless GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega, kat. č. M890A)
- dd PCR voda (SigmaAldrich, kat. č. 95248-1L)
- DEPC voda (Invitrogen[™], kat. č. AM9906)
- 100 mM dNTP Set (Bioline, BIO-39049)
- EvaGreen Dye, 20x in Water (Biotinium, kat. č. 31000)
- FastStart[™] High Fidelity PCR System, dNTPack, Version 7 (Roche, kat. č. 04 738 292 001)
- GoTaq[®] MDx Hot Start Polymerase, 0,8 U/μl (Promega, kat. č. D6008)
- MgCl₂, 25mM (Promega, kat. č. A3513)
- Q5[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs[®], kat. č. M0493)
- Q5[®] Reaction Buffer, 5x (New England BioLabs[®], kat. č. B9027S)
- *Takara Ex Taq* HS (TaKaRa, kat. č. RR006)

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- QIAxcel Advanced Systém (QIAGEN)
- Real Time PCR Cyclor CFX96 (Bio-Rad)
- Mini-Centrifuge/Vortex FVL-2400N Combi-Spin (bioSan)

- Biohazard Mars Safety Classe 2 (LaboGene)
- Minicentrifuge MiniSpin (Eppendorf)
- GMCLab™ Fixed-Speed Mini-Centrifuge (Gilson™)
- MiSeq™ (Illumina)
- Centrifuge 5430 (Eppendorf)
- LightCycler® Nano instrument (Roche)
- Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Návrh primerov

Pomocou databáze UCSC Genome Browser on Human (GRCh37/hg19) bola vyhľadaná sekvencia exónu 18 a 20 *EGFR*, ktorá bola následne použitá pre návrh primerov v programe Primer3. Pre ciele oblasti boli navrhnuté sekvencie špecifických častí primerov (viď **Tabuľka 1**). V experimentoch boli ďalej používané primery zobrazené v **Tabuľke 2**. Sekvencia stabilizačného primeru fR-SP3-P5_1932 použitého pre exóny 18, 19, 20 a 21 je aatgatacggcgaccaccgagatctacacggc.

Tabuľka 1: Sekvencie primerov navrhnutých pre ciele oblasti exónu 18 a 20 *EGFR*

Exón	Druh primeru	číslo primeru	označenie primeru	Sekvencia primeru (5'-3')
18	P5	1950	fR-E18-P5_1950	AATGATACGGCGACCACCG AGATCTACACGGCGCNNNN NNNN gctccaaccaagctctc
18	P7 index 29, 32, 33, 35, 36, 38	1951, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020	fR-E18-P7index_ číslo primeru	CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT/ <i>index</i> /GTCTCGTGGt gccaggaccttacctat
20	P5	2064	fR-E20-P5_2064	AATGATACGGCGACCACCG AGATCTACACGGCGCNNNN NNNN Nagccgaagggcatgag
20	P5	2065	fR-E20-P5_2065	AATGATACGGCGACCACCG AGATCTACACGGCGCNNNN NNNN Naggaggcagccgaagg
20	P7 index 29	2066	fR-E20-P7i29_2066	CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT/ <i>index</i> /GTCTCGTGG ctccaggaagcctacgtgat

Legenda: špecifická časť primeru značená v sekvenciách **tučným** písmom. **N** – označenie báze v UMI.

Tabuľka 2: Sekvencie primerov pre ciele oblasti exónov 19, 20 a 21 génu *EGFR*

Exón	Druh primeru	číslo primeru	označenie primeru	Sekvencia primeru (5'-3')
19	P5	1850	fR-E19-P5_1850	AATGATACGGCGACC ACCGAGATCTACACG GCGCNNNNNNNN agaaagttaaattcccgtcgt
19	P7 index 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29	1873, 1877, 1813, 1853, 1857, 1861, 1865, 1869	fR-E18-P7index_číslo primeru	CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT/ <i>index</i> /GTCTCGTG Gcacagcaaagcagaaactcaca
20	P5	1848	fR-E20-P5_1848	AATGATACGGCGACCACC GAGATCTACACGGCGC NNNNNN Naggaagcctactgatggc
20	P7 index 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29	1874, 1878, 1814, 1854, 1858, 1862, 1866, 1870	fR-E20-P7index_číslo primeru	CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT/ <i>index</i> /GTCTCGTG Gtccaggaggcagccgaa
21	P5	1851	fR-E21-P5_1851	AATGATACGGCGACCACC GAGATCTACACGGCGC NNNNNN gcagcatgtcaagatcaca
21	P7 index 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29	1875, 1879, 1815, 1855, 1859, 1863, 1867, 1871	fR-E21-P7index_číslo primeru	CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT/ <i>index</i> /GTCTCGTG Gccttctgatgtattcttctct

Legenda: špecifická časť primeru značená v sekvenciách **tučným** písmom. **N** – označenie bázy v UMI.

4.4.2 Príprava vzoriek a prevedenie PCR

4.4.2.1 Optimalizácia podmienok PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy

Pred prípravou reakčnej zmesi na PCR boli jednotlivé reagenty premiešané na vortexe a krátko centrifugované. Do 1,5 ml skúmavky bola pripravená reakčná zmes pre PCR (viď **Tabuľka 3**), skúmavka bola krátko premiešaná na vortexe, centrifugovaná a 19 µl reakčnej zmesi bolo napipetovaných do mikroskúmavky pre PCR. Do každej mikroskúmavky s reakčnou zmesou bol napipetovaný 1 µl vzorky DNA alebo 1 µl dd PCR vody v prípade negatívnej kontroly. Pripravené vzorky pre PCR boli následne centrifugované a vložené do termocykléru, na ktorom bol spustený príslušný program (viď **Tabuľka 4**).

Tabuľka 3: Zloženie PCR reakčnej zmesi s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy

Reagencia	Koncentrácia pracovného roztoku	Konečná koncentrácia	Objem na 1 vzorku [μl]
PCR pufor: 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer	5x	1x	4,00
MgCl₂	25 mM	2,50 mM	2,00
dNTP	25 mM	0,25 mM	0,20
GoTaq® MDx Hot Start polymeráza	8 U/μl	0,05 U/μl	0,13
EvaGreen	20x	0,5x	0,50
dd PCR voda	-	-	10,50
Primer P5	1 μM	0,03 μM	0,60
Primer P7	10 μM	0,30 μM	0,60
Stabilizačný primer	10 μM	0,27 μM	0,54
Celkový objem	-	-	19 μl

Tabuľka 4: Teplotný program použitý pre optimalizáciu PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatková denaturácia	95 °C	2 min	1
Dodatočná denaturácia	95 °C	15 s	
1. annealing (nasadenie primerov)	48–68 °C *	**	2
Elongácia	72 °C	1 min	
Dodatočná denaturácia	95 °C	15 s	
2. annealing (nasadenie primerov)	50–70 °C ***	30 s	38
Elongácia	72 °C	30 s	
Konečná elongácia	72 °C	5 min	1
Ukončenie	10 °C	∞	

Legenda: *Pri optimalizácii 1. annealingu bol použitý teplotný gradient 48–68 °C a teplota 2. annealingu 60 °C. **Pri optimalizácii času 1. annealingu boli použité časy 1 min a 5 min, pričom teplota 1. annealingu činila 61 °C a 2. annealingu 60 °C. ***Pri optimalizácii 2. annealingu bol použitý teplotný gradient 50–70 °C a teplota 1. annealingu 65 °C na 5 min.

4.4.2.2 Optimalizácia podmienok multiplexovej PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a testovanie schopnosti detekcie mutácií

Pred prípravou reakčnej zmesi na multiplexovú PCR obsahujúcu primery pre exóny 18, 19, 20, 21 *EGFR* a triplexovú PCR obsahujúcu primery pre tri exóny génu *EGFR* vo všetkých kombináciách (vid' **Tabuľka 6**), boli jednotlivé reagenty premiešané na vortexe a krátko centrifugované. Do 1,5 ml skúmavky bola pripravená reakčná zmes pre PCR (vid' **Tabuľka 5**, **Tabuľka 7**), skúmavka bola krátko premiešaná na vortexe, centrifugovaná a 19 µl reakčnej zmesi bolo napipetovaných do mikroskúmavky pre PCR. Do každej mikroskúmavky s reakčnou zmesou bol napipetovaný 1 µl vzorky DNA alebo 1 µl dd PCR vody v prípade negatívnej kontroly. Pripravené vzorky pre PCR boli následne centrifugované a vložené do termocykléru, na ktorom bol spustený príslušný program (vid' **Tabuľka 8**).

Tabuľka 5: Zloženie multiplexovej (exón 18, 19, 20, 21 *EGFR*) PCR reakčnej zmesi s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy

Reagencia	Koncentrácia pracovného roztoku	Konečná koncentrácia	Objem na 1 vzorku [µl]
PCR pufor: 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer	5x	1x	4,00
MgCl₂	25 mM	2,50 mM	2,00
dNTP	25 mM	0,25 mM	0,20
GoTaq® MDx Hot Start polymeráza	8 U/µl	0,05 U/µl	0,13
EvaGreen	20x	0,5x	0,50
dd PCR voda	-	-	5,20
Primer P5 exón 18	1 µM	0,03 µM	0,60
Primer P7 exón 18	10 µM	0,30 µM	0,60
Primer P5 exón 19	1 µM	0,03 µM	0,60
Primer P7 exón 19	10 µM	0,30 µM	0,60
Primer P5 exón 20	1 µM	0,03 µM	0,60
Primer P7 exón 20	10 µM	0,30 µM	0,60
Primer P5 exón 21	1 µM	0,03 µM	0,60
Primer P7 exón 21	10 µM	0,30 µM	0,60
Stabilizačný primer	10 µM	1,08 µM	2,20
Celkový objem	-	-	19 µl

Tabuľka 6: Kombinácie primerových triplexov pre prípravu reakčnej zmesi s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy

Číslo triplexu	Exón číslo	Obsiahnuté primery pre exón
1	1	19
	2	20
	3	21
2	1	18
	2	20
	3	21
3*	1	18
	2	19
	3	21
4	1	18
	2	19
	3	20

Legenda: *Kombinácia primerov použitá v ďalších experimentoch.

Tabuľka 7: Zloženie triplexovej reakčnej zmesi s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy

Reagencia	Koncentrácia pracovného roztoku	Konečná koncentrácia	Objem na 1 vzorku [μl]
PCR pufo: 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer	5x	1x	4,00
MgCl₂	25 mM	2,50 mM	2,00
dNTP	25 mM	0,25 mM	0,20
GoTaq® MDx Hot Start polymeráza	8 U/μl	0,05 U/μl	0,13
EvaGreen	20x	0,5x	0,50
dd PCR voda	-	-	7,00
Primer P5 exón č. 1	1 μM	0,03 μM	0,60
Primer P7 exón č. 1	10 μM	0,30 μM	0,60
Primer P5 exón č. 2	1 μM	0,03 μM	0,60
Primer P7 exón č. 2	10 μM	0,30 μM	0,60
Primer P5 exón č. 3*	1 μM	0,03 μM	0,60
Primer P7 exón č. 3*	10 μM	0,30 μM	0,60
Stabilizačný primer	10 μM	0,81 μM	1,60
Celkový objem	-	-	19 μl

Legenda: *U triplexu číslo 3 pri testovaní optimálnej koncentrácie primerov pre exón č. 3 (exón 21 *EGFR*) boli použité výsledné koncentrácie primeru P5 a P7 o hodnotách 100 % (0,03 μM a 0,30 μM), 125 % (0,0375 μM a 0,375 μM), 150 % (0,045 μM a 0,45 μM) a 200 % (0,06 μM a 0,60 μM). Objem bol dopipetovaný dd PCR vodou do výsledného objemu primerov pre exón 21 *EGFR* rovného 1,2 μl.

Tabuľka 8: Teplotný program použitý pre multiplexovú a triplexovú PCR

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95 °C	2 min	1
Dodatočná denaturácia	95 °C	15 s	
1. annealing (nasadanie primerov)	65 °C	5 min	2
Elongácia	72 °C	1 min	
Dodatočná denaturácia	95 °C	15 s	
2. annealing (nasadanie primerov)	63 °C	30 s	38
Elongácia	72 °C	30 s	
Konečná elongácia	72 °C	5 min	1
Ukončenie	10 °C	∞	

4.4.2.3 Optimalizácia podmienok PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy a testovanie schopnosti detekcie mutácií

Pred prípravou reakčnej zmesi na PCR boli jednotlivé reagenty premiešané na vortexe a krátko centrifugované. Do 1,5 ml skúmavky bola pripravená reakčná zmes pre PCR (viď **Tabuľka 9**), skúmavka bola krátko premiešaná na vortexe, centrifugovaná a 19 μ l reakčnej zmesi bolo napipetovaných do mikroskúmavky pre PCR. Do každej mikroskúmavky s reakčnou zmesou bol napipetovaný 1 μ l vzorky DNA alebo 1 μ l dd PCR vody v prípade negatívnej kontroly. Pripravené vzorky pre PCR boli následne centrifugované a vložené do termocykléru, na ktorom bol spustený príslušný program (viď **Tabuľka 10**).

Tabuľka 9: Zloženie PCR reakčnej zmesi s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy

Reagencia	Koncentrácia pracovného roztoku	Konečná koncentrácia	Objem na 1 vzorku [μ l]
PCR pufor: 5X Q5® Reaction Buffer	5x	1x	4,00
dNTP	25 mM	0,20 mM	0,16
Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymeráza	2 U/ μ l	0,02 U/ μ l	0,2
EvaGreen*	20x	0,5x	0,50
dd PCR voda	-	-	12,40
Primer P5	1 μ M	0,03 μ M	0,60
Primer P7	10 μ M	0,30 μ M	0,60
Stabilizačný primer	10 μ M	0,27 μ M	0,54
Celkový objem	-	-	19 μ l

Legenda: *Pri experimentoch bola použitá varianta reakčnej zmesi bez použitia EvaGreen. Objem bol doplnený dd PCR vodou (0,5 μ l).

Tabuľka 10: Teplotný program použitý pre optimalizáciu PCR s použitím Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95 °C	2 min	1
Dodatočná denaturácia	95 °C	15 s	
1. annealing (nasadenie primerov)	52–72 °C *	5 min	2
Elongácia	72 °C	1 min	
Dodatočná denaturácia	95 °C	15 s	
2. annealing (nasadenie primerov)	55–72 °C **	30 s	38
Elongácia	72 °C	30 s	
Konečná elongácia	72 °C	5 min	1
Ukončenie	10 °C	∞	

Legenda: *Pri optimalizácii 1. annealingovej teploty bol použitý teplotný gradient 52–72 °C a teplota 2. annealingu 62 °C. **Pri optimalizácii 2. annealingovej teploty bol použitý teplotný gradient 55–72 °C a teplota 1. annealingu 65 °C na 5 min.

4.4.2.4 Prevedenie PCR pre exón 18 EGFR pomocu polymeráz s 3'→5' exonukleázovou aktivitou

Pred prípravou reakčnej zmesi na PCR boli jednotlivé reagenty premiešané na vortexe a krátko centrifugované. Do 1,5 ml skúmavky bola pripravená reakčná zmes pre PCR (viď **Tabuľka 3**, **Tabuľka 11**, **Tabuľka 12**), skúmavka bola krátko premiešaná na vortexe, krátko centrifugovaná a 19 µl reakčnej zmesi bolo napipetovaných do mikroskúmavky pre PCR. Do každej mikroskúmavky s reakčnou zmesou bol napipetovaný 1 µl vzorky DNA alebo 1 µl dd PCR vody v prípade negatívnej kontroly. Pripravené vzorky pre PCR boli následne centrifugované a vložené do termocykléru, na ktorom bol spustený príslušný program (viď **Tabuľka 13**).

Tabuľka 11: Zloženie PCR reakčnej zmesi s použitím a FastStart™ High Fidelity PCR systému

Reagencia	Koncentrácia pracovného roztoku	Konečná koncentrácia	Objem na 1 vzorku [μl]
PCR pufor: FastStart™ High Fidelity Reaction Buffer	10x	1x	2,00
dNTP	25 mM	0,20 mM	0,16
FastStart™ High Fidelity enzyme Blend	5 U/μl	0,1 U/μl	0,2
EvaGreen	20x	0,5x	0,50
dd PCR voda	-	-	14,40
Primer P5	1 μM	0,03 μM	0,60
Primer P7	10 μM	0,30 μM	0,60
Stabilizačný primer	10 μM	0,27 μM	0,54
Celkový objem	-	-	19 μl

Tabuľka 12: Zloženie PCR reakčnej zmesi s použitím pre exón 18 *EGFR* pomocou *Takara Ex Taq HS* polymerázy

Reagencia	Koncentrácia pracovného roztoku	Konečná koncentrácia	Objem na 1 vzorku [μl]
PCR pufor: <i>Takara Ex Taq</i> Buffer	10x	1x	2,00
dNTP	25 mM	0,20 mM	0,16
<i>Takara Ex Taq HS</i> polymeráza	5 U/μl	0,06 U/μl	0,25
EvaGreen	20x	0,5x	0,50
dd PCR voda	-	-	14,35
Primer P5	1 μM	0,03 μM	0,60
Primer P7	10 μM	0,30 μM	0,60
Stabilizačný primer	10 μM	0,27 μM	0,54
Celkový objem	-	-	19 μl

Tabuľka 13: Teplotný program použitý pre PCR pre exón 18 *EGFR* pomocou GoTaq® MDx Hot Start polymerázy, *Takara Ex Taq* HS polymerázy a FastStart™ High Fidelity PCR systému

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95 °C	2 min	1
Dodatočná denaturácia	95 °C	30 s	
1. annealing (nasadanie primerov)	65 °C	5 min	2
Elongácia	72 °C	1 min	
Dodatočná denaturácia	95 °C	30 s	
2. annealing (nasadanie primerov)	60 °C	30 s	38
Elongácia	72 °C	30 s	
Konečná elongácia	72 °C	5 min	1
Ukončenie	10 °C	∞	

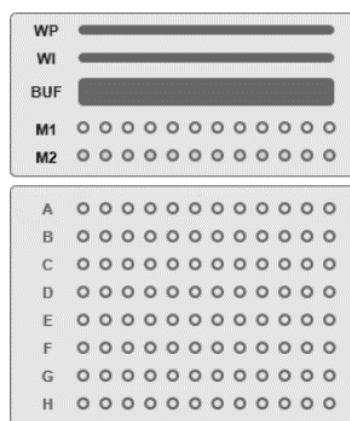
4.4.3 Kapilárová elektroforéza QIAxcel Advanced system

Amplifikované fragmenty DNA boli analyzované pomocou prístroja QIAxcel Advanced. Do zásobníku pufrov bolo napipetovaných po 8 ml QX Wash Buffer do pozícií WP a WI (viď **Obrázok 12**) a 18 ml QX DNA Separation Buffer do pozície BUF (viď **Obrázok 12**). Pufre boli pokryté minerálnym olejom (2 ml u pozícií s napipetovaným QX Wash Buffer, 4 ml u pozície s napipetovaným QX DNA Separation Buffer) a zásobník pufrov bol vložený do držiaku vzoriek umiestneného v prístroji a vysunutého pomocou príkazu v QIAxcel Screen Gel software.

Na prípravu zarovňavajúceho markeru (alignment marker) bolo do každej jamky 0,2 ml dvanásťjamkového stripu napipetovaných 15 µl odpovedajúceho markeru (QX Alignment marker) a ten bol prevrstvený kvapkou minerálneho oleja. Takto pripravený marker bol po temperovaní na laboratórnu teplotu vložený do pozície M1 na držiaku vzoriek (viď **Obrázok 12**). Veľkostný marker (QX DNA Size marker 100 ng/µl) bol napipetovaný do 0,2 ml skúmavky v objeme 1 µl a doplnený pomocou QX DNA Dilution Buffer do výsledného objemu 20 µl. Výsledná koncentrácia pripraveného veľkostného markeru činila 5 ng/µl. Takto pripravený marker bol po temperovaní na laboratórnu teplotu vložený do pozície A12 na držiaku vzoriek (viď **Obrázok 12**).

Na prípravu vzoriek analyzovaných pomocou QIAxcel Advanced systému bolo použitých 5 až 10 µl vzorky, ktorá bola nariadená pomocou DEPC H₂O na výsledný objem 10 až 15 µl. Vzorky na analýzu boli pripravované do 12 jamkového stripu a do

voľných pozícií bolo napipetovaných 10 µl DEPC H₂O. Takto pripravené vzorky boli vortexované a centrifugované na minicentifúge a po temperovaní na laboratórnu teplotu vložené do držiaku vzoriek do pozícií A1 až A11 (viď **Obrázok 12**). Po vložení všetkých reagensí a vzoriek boli dvierka pre vkladanie vzoriek uzatvorené a držiak na vzorky umiestnený do parkovacej pozície pomocou príkazu v QIAxcel Screen Gel software. Po otvorení kazetového priestoru bola kazeta s kapilármi temperovaná na laboratórnu teplotu vybraná z obalu a umiestnená do prístroja, dvierka kazetového priestoru boli uzatvorené.



Obrázok 12: Zásobník pufrov a držiak vzoriek (prevzaté z QIAGEN, 2017b)

Na prístroji boli nastavené parametre analýzy (viď **Tabuľka 14**), ktorá bola následne spustená. Výsledky boli hodnotené v rozhraní analýzy. Po kontrole kvality výsledkov veľkostného markeru a jednotlivých vzoriek boli vzorky označené a bola vygenerovaná správa (report) vo formáte .pdf, ktorá obsahovala obrázok gélu a jednotlivé elektroforeogramy.

Tabuľka 14: Parametre analýzy na prístroji QIAxcel Advanced

Záložka	Nastavený parameter
Process Profile	Default High Res v2.0
Run Parameters	Umiestnenie vzoriek (rad) Pozícia veľkostného markeru Vhodná metóda analýzy*
Marker	Použitý veľkostný a zarovnávajúci marker
Sample information	Názvy vzoriek
Run check	Kontrola vypísaných bodov

Legenda: *Metóda nastavená na základe veľkosti fragmentov a koncentrácie vzoriek (OM500 – koncentrácia 10–100 ng/µl a rozlíšenie 10 bp).

4.4.4 Prečistenie PCR produktov pomocou QIAquick PCR Purification Kitu

Produkty PCR amplifikácie boli na základe výsledkov kapilárovej elektroforézy zjednotené do 1,5 ml skúmavky v pomeroch, ktoré odpovedali odhadnutej koncentrácii špecifického produktu v jednotlivých vzorkách. K výslednej vzorke bol pridaný 5x objem Buffer PB, obsah bol premiešaný na vortexe a centrifugovaný. Vzorka bola napipetovaná na QIAquick kolónku v zbernej 2 ml skúmavke a centrifugovaná pri 13 000 rpm po dobu 60 sekúnd. Supernatant bol odstránený zo zbernej skúmavky. Kolónka bola nasadená na zbernú skúmavku a bolo na ňu pridaných 750 μ l Buffer PE. Následne bola prevedená centrifugácia (13 000 rpm po dobu 60 sekúnd). Supernatant bol odstránený zo zbernej skúmavky. Kolónka bola nasadená na zbernú skúmavku a bola centrifugovaná (13 000 rpm po dobu 60 sekúnd). Kolónka bola prenesená do novej 1,5 ml skúmavky, na stred kolónky bolo pridaných 50 μ l DEPC H₂O a bola inkubovaná 1 minútu pri laboratórnej teplote. Elúcia DNA bola prevedená centrifugáciou pri 13 000 rpm po dobu 60 sekúnd.

4.4.5 Meranie koncentrácie DNA pomocou prístroja Qubit 2.0 Fluorometer

Do mikroskúmavky bolo napipetovaných 199 μ l Qubit dsDNA HS Buffer a pridaný 1 μ l Qubit dsDNA HS Reagent (Qubit dsDNA HS Assay Kit). K zmesi bol pripipetovaný 1 μ l vzorky amplikónov a obsah bol premiešaný na vortexe. Následne bola zmeraná koncentrácia DNA vo vzorke pomocou prístroja Qubit 2.0 Fluorometer.

4.4.6 Príprava vzoriek na sekvenovanie

Nasledujúci postup prípravy vzoriek bol vykonaný v spolupráci s personálom Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny. Hmotnostná koncentrácia zistená pomocou Qubit 2.0 Fluorometer bola prepočítaná na molaritu DNA pomocou vzorca: $c \text{ [nM]} = p_i \text{ [ng/}\mu\text{l]} * 10^6 / (660 * 185)$, kde p_i je hmotnostná koncentrácia DNA, 185 bp je priemerná veľkosť molekuly DNA po indexácii a 660 g/mol vyjadruje priemernú molárnu hmotnosť jednej bázy (1 bp). Vzorky boli následne nariadené na 2 nM pomocou dd PCR vody a vzorky rovnakého typu knižnice boli zmiešané v rovnakom pomere. U takto pripraveného poolu vzoriek bola koncentrácia overená pomocou Qubit 2.0 Fluorometer (metóda Qubit HS) s použitím 10 μ l vzorky. V prípade, že nebola koncentrácia nariadeného poolu v rozsahu 1,6 nM až 2,4 nM, pool bol znovu nariadený do dosiahnutia koncentrácie v tomto rozsahu.

Zmiešaním 20 µl 5 M NaOH a 480 µl vody bol pripravený roztok 0,2 M NaOH. 20 µl nariadeného poolu bolo zmiešaných s čerstvo pripraveným roztokom NaOH v pomere 1:1 a roztok bol inkubovaný 5 min pri laboratórnej teplote.

Počas denaturácie boli nariadené sekvenačné primery pre analýzu vzorky pomocou metódy fastRAS a fastRAS EGFR: Read1 sekvenačný primer – R1SP (3 µl R1SP + 597 µl HT1 – Hybridization Buffer), Read2 sekvenačný primer – R2SP (13,5 µl R2SP RAS + 586,5 µl HT1 + 6 ul R2SP EGFR) a Index sekvenačný primer – ISP (13,5 µl ISP RAS + 594 µl HT1+ 6 ul ISP EGFR).

Denaturovaná DNA v objeme 10 µl bola nariadená vychladeným HT1 v pomere 1:100 (10 µl DNA:990 µl HT1). Takto pripravená vzorka na sekvenovanie bola uchovávaná v chladničke a následne v objeme 600 µl nanosená na dokonale rozmrznutú sekvenačnú kazetu (rozmrazovanie 60 minút pri laboratórnej teplote), ktorej obsah bol premiešaný obrátením (3x), do jamky č. 17. Do jamiek č. 18, 19 a 20 bolo nanosených 600 µl nariadených sekvenačných primerov v poradí R1SP, ISP a R2SP.

4.4.7 Sekvenovanie

Nasledujúci postup spustenia sekvenačného behu bol vykonaný v spolupráci s personálom Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny. Pomocou Illumina Experiment Manager bol pripravený SAMPLE SHEET. Sekvenátor MiSeq bol zapnutý a bol spustený premývací program (maintenance wash) s použitím 0,5% Tween 20. Pripravená bola sekvenačná prietoková komôrka (z kitu MiSeq Reagent Kit Nano v2 300 bp, prípadne MiSeq Reagent Kit v3 150 bp), ktorá bola dokonale opláchnutá destilovanou vodou a osušená papierom na optické zariadenia, ktorý neuvolňuje vlákna, má vysokú nasiakavosť a je bez obsahu abrazív (napr. Kimwipes Science Brand).

Bol spustený sekvenačný program (Illumina MiSeq software), bola vložená prietoková komôrka, sekvenačná kazeta pripravená v predchádzajúcich krokoch (viď kapitola 4.4.6), PR-2 pufor (súčasť balenia prietokovej komôrky) a prázdne odpadné fľaše. Po automatickej kontrole prístroja MiSeq bolo potvrdené spustenie behu pomocou tlačidla RUN. Bola vyliata premývací kazeta a po ukončení sekvenačného programu bol prístroj premytý 0,5% roztokom Tween 20 (program Post-RUN WASH) za použitia premývacej kazety a fľašky.

4.4.8 Spracovanie sekvenačných dát

Sekvenačné dáta vo formáte FASTQ boli analyzované v MAGERI software (Shugay *et al.*, 2017), prípadne vizualizované pomocou Integrative Genomics Viewer (Robinson *et al.*, 2011). Pre analýzu pomocou MAGERI v operačnom systéme linux Ubuntu 14.04 LTS bol použitý príkaz:

```
java -jar -Xmx32G mageri.jar -M3 NNNNNNNN --references ch7.fa -R1
príklad_R1.fastq.gz -R2 príklad_R2.fastq.gz --project-name <nazov experimentu> --
import-preset mageri_preset.txt --sample-name <nazov vzorku>
```

Pozičné určenie UMI (M3) umožňovalo skenovanie prvého čítania (R1) a reverzného komplementu druhého čítania (R2). Sekvencia UMI bola zadaná pomocou znakov N, ktorých počet prislúchal dĺžke UMI (príklad NNNNNNNN). Ako referenčná sekvencia bola použitá sekvencia chromozómu 7. Za pomoci textového súboru (mageri_preset.txt) boli do analýzy importované parametre, medzi ktoré patrilo nastavenie prahu počtu zhodných UMI (4, 10, 20), od ktorého bol vytvorený samostatný konsenzus (MIG). Z výstupného súboru vo formáte *.variant.caller.txt boli následne vytriedené záujmové mutácie.

5 VÝSLEDEKY

5.1 Optimalizácia podmienok PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy

Vzorka DNA o koncentrácii 47,5 ng/μl bola amplifikovaná pomocou PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre ciele úseky exónov 18, 19, 20 a 21 génu *EGFR*. Boli optimalizované podmienky 1. annealingu (teplota a čas) a 2. annealingu (teplota).

5.1.1 Optimalizácia parametrov 1. annealingu programu PCR

Optimalizácia teploty 1. annealingu bola vykonaná pomocou teplotného gradientu 48–68 °C, pričom teplota 2. annealingu bola 60 °C. **Tabuľka 15** zobrazuje hodnoty C_q (cycle quantification value) u cielej oblasti exónov 18, 19, 20, 21 génu *EGFR* pri jednotlivých teplotách 1. annealingu.

Tabuľka 15: Hodnoty C_q (cycle quantification value) u vzoriek amplifikovaných s použitím teplotného gradientu 1. annealingu (48–68 °C)

		C _q			
		Exón 18	Exón 19	Exón 20	Exón 21
	68	33,11	27,86	34,21	31,19
	64,6	31,08	27,64	31,81	30,44
Teplota 1. annealingu [°C]	60,6	30,83	27,59	31,80	30,26
	55,8	30,44	27,87	31,48	29,79
	51,9	29,77	27,26	31,36	29,33
	48	28,84	27,64	31,42	28,94

Legenda: **Exón 18, 19, 20 a 21** *EGFR*.

Príloha 1 a Príloha 2 zobrazujú snímky gélov získané pomocou QIAxcel Advanced systému obsahujúce vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu. U vzorky obsahujúcej amplikóny cielej oblasti exónu 18 s hodnotou 1. annealingovej teploty 64,6 °C, 60,6 °C, 55,8 °C, 51,9 °C boli amplifikované fragmenty DNA o dĺžke 197 báz (bp) a nešpecifický produkt amplifikácie o dĺžke 97 bp (viď **Príloha 1**). U vzorky obsahujúcej amplikóny cielej oblasti exónu 18 *EGFR*

s hodnotou 1. annealingovej teploty 48 °C boli amplifikované iba fragmenty nešpecifického produktu (97 bp) a vzorka s hodnotou teploty 1. annealingu 68 °C obsahovala iba fragmenty špecifického produktu o dĺžke 197 bp v nízkej koncentrácii (viď **Príloha 1**). U vzoriek obsahujúcich amplikóny cieľenej oblasti exónu 19 *EGFR* sa pri všetkých teplotách 1. annealingu amplifikoval špecifický produkt o dĺžke 185 bp (viď **Príloha 1**). U vzoriek obsahujúcich amplikóny pre cieľenú oblasť exónu 20 a 21 *EGFR* boli vzhľadom na nízku koncentráciu fragmentov špecifického a nešpecifického produktu PCR výsledky kapilárovej elektroforézy vyhodnotené na základe získaných elektroforeogramov. Príklad elektroforeogramu je uvedený v **Prílohe 3**. U vzoriek získaných v PCR pomocou primerov navrhnutých na cieľenú oblasť exónu 20 *EGFR* (použité primery z **Tabuľky 2**) boli pri hodnote 1. annealingu 68 °C detegované fragmenty DNA nešpecifického produktu o dĺžke 93 bp (viď **Príloha 3**). U ostatných hodnôt teploty 1. annealingu boli detegované fragmenty nešpecifického produktu a fragmenty špecifického produktu o dĺžke 196 bp (viď **Príloha 2**). Vzorka s teplotou annealingu 64,6 °C, ktorá bola prístrojom QIAxcel Advanced nesprávne detegovaná, bola následne znovu vyhodnotená (viď **Príloha 4**). U vzoriek obsahujúcich amplikóny cieľenej oblasti exónu 21 *EGFR* sa pri všetkých teplotách 1. annealingu amplifikoval nešpecifický produkt (100 bp) a u teplôt 68 °C, 64,6 °C, 60,6 °C, 55,8 °C, 51,9 °C bol detegovaný špecifický produkt o dĺžke 163 bp (viď **Príloha 2**). Optimálna teplota 1. annealingu pre amplifikáciu cieľených oblastí exónu 18, 19, 20 a 21 *EGFR* bola 65 °C. Pri tejto teplote bola detegovaná najvyššia koncentrácia špecifického produktu a zároveň najnižší výskyt nešpecifických produktov.

Pri optimalizácii času 1. annealingu pre exón 20 a 21 (*EGFR*) bola použitá dĺžka 1 min a 5 min, pričom teplota 1. annealingu činila 61 °C a 2. annealingu 60 °C. **Tabuľka 16** obsahuje hodnoty C_q u vzoriek s rôznym časom pri 1. annealingovej teplote. U vzoriek amplifikovaných s použitím času 1. annealingovej teploty 5 min bolo pozorované zníženie hodnoty C_q.

Tabuľka 16: Hodnoty C_q (cycle quantification value) u vzoriek amplifikovaných cieľených oblastí exónu 20 a 21 *EGFR* s časom pri 1. annealingu 1 min alebo 5 min.

vzorka	1 min		5 min		exón 20	exón 21
	exón 20	exón 21	exón 20	exón 21	(negatívna kontrola)	(negatívna kontrola)
C _q	31,8	30,3	29,3	28,7	32,5	32,1

Legenda: **Exón 20 a 21 *EGFR*, 1 min** – čas 1. annealingu, **5 min** – čas 1. annealingu.

5.1.2 Optimalizácia parametrov 2. annealingu programu PCR

Pri optimalizácii 2. annealingu bol použitý teplotný gradient 50–70 °C a optimalizovaná teplota a čas 1. annealingu 65 °C na 5 min. **Tabuľka 17** zobrazuje hodnoty C_q u cieľených oblastí exónov 18, 19, 20, 21 génu *EGFR* pri jednotlivých teplotách 2. annealingu.

Tabuľka 17: Hodnoty C_q (cycle quantification value) u vzoriek amplifikovaných s použitím gradientu 2. annealingovej teploty (50–70 °C)

	C _q	Exón 18	Exón 19	Exón 20	Exón 21
		70	31,97	29,72	30,69
66,6	31,03	27,65	30,12	29,13	
Teplota 2. annealingu	62,6	30,52	27,11	30,12	28,78
[°C]	57,8	30,06	26,83	30,05	28,62
	53,9	30,26	26,71	30,33	28,61
	50	30,05	27,22	30,32	28,42

Legenda: **Exón 18, 19, 20 a 21 *EGFR*.**

Príloha 5 a Príloha 6 zobrazujú snímky gélov získané pomocou QIAxcel Advanced systému obsahujúce vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 2. annealingu.

U vzorky obsahujúce amplikóny cieľenej oblasti exónu 18 s hodnotou 2. annealingovej teploty 70 °C, 66,6 °C, 62,6 °C a 57,8 °C boli amplifikované fragmenty DNA o dĺžke

197 bází (bp) (viď **Príloha 5**). U vzorky obsahujúcej amplikóny cieľenej oblasti exónu 18 s hodnotou 2. annealingovej teploty 53,9 °C a 50 °C boli amplifikované fragmenty nešpecifického produktu (97 bp) a fragmenty špecifického produktu o dĺžke 197 bp (viď **Príloha 5**). U vzoriek obsahujúcich amplikóny cieľenej oblasti exónu 19 sa pri všetkých teplotách 2. annealingu amplifikoval špecifický produkt o dĺžke 185 bp (viď **Príloha 5**). U vzoriek získaných PCR pomocou primerov pre amplifikáciu cieľenej oblasti exónu 20 (použité primery z **Tabuľky 2**) boli pri všetkých hodnotách teploty 2. annealingu detegované fragmenty DNA špecifického produktu o dĺžke 197 bp (viď **Príloha 6**). U vzoriek obsahujúcich amplikóny cieľenej oblasti exónu 21 sa pri všetkých teplotách 2. annealingu amplifikoval špecifický produkt o dĺžke 163 bp (viď **Príloha 6**). Optimálna teplota 2. annealingu pre amplifikáciu cieľených oblastí exónu 18, 19, 20 a 21 génu *EGFR* bola 63 °C, pri ktorej bola detegovaná najvyššia koncentrácia špecifického produktu a zároveň najnižšia koncentrácia nešpecifických produktov.

5.2 Optimalizácia podmienok multiplexovej PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy

5.2.1 Optimalizácia kombinácie primerov v reakčnej zmesi

Optimalizácia multiplexovej PCR bola vykonaná pomocou porovnania amplifikácie cieľených oblastí exónov 18, 19, 20 a 21 *EGFR* s použitím mastermixu obsahujúceho primery pre všetky štyri exóny, u ktorého boli koncentrácie jednotlivých amplikónov následne porovnané s koncentraciami pri amplifikácii pomocou všetkých kombinácií primerových triplexov (viď **Tabuľka 6**). Vzorka DNA použitá na amplifikáciu bola nariadená na koncentráciu 20 ng/μl a 1 μl bola napipetovaná do skúmaviek s variantami mastermixu. U negatívnej kontroly bol použitý 1 μl dd PCR vody. **Tabuľka 18** zobrazuje hodnoty C_q pri amplifikácii cieľených oblastí exónov 18, 19, 20, 21 génu *EGFR* s použitím jednotlivých variant mastermixu. Najväčšia hodnota ΔC_q u vzorky obsahujúcej DNA a vzorky negatívnej kontroly bola detegovaná vo variante mastermixu obsahujúceho primery pre exóny 18, 19, 21 *EGFR*.

Tabuľka 18: Hodnoty Cq (cycle quantification value) u vzoriek amplifikovaných s použitím jednotlivých variant mastermixu

		Cq				
		MM4	MM 18, 19, 20	MM 19, 20, 21	MM 18, 20, 21	MM 18, 19, 21
	DNA (50 ng/μl)	19,82	20,49	26,29	22,13	26,10
Vzorka	negatívna kontrola	19,85	20,85	27,50	22,13	29,15
	Δ Cq	0,03	0,36	1,21	0,00	3,05

Legenda: **MM4** – vzorka amplifikovaná s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre exóny 18, 19, 20, 21 *EGFR*. **MM 18, 19, 20** – vzorka amplifikovaná s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre exóny 18, 19, 20 *EGFR*. **MM 19, 20, 21** – vzorka amplifikovaná s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre exóny 19, 20, 21 *EGFR*. **MM 18, 20, 12** – vzorka amplifikovaná s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre exóny 18, 20, 21 *EGFR*. **MM 18, 19, 21** - vzorka amplifikovaná s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre exóny 18, 19, 21 *EGFR*.

V **Prílohe 7** je zobrazená snímka gélu získaná pomocou QIAxcel Advanced systému obsahujúca vzorky amplifikované s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre všetky štyri exóny (18, 19, 20, 21 *EGFR*) a vzoriek amplifikovaných pomocou všetkých kombinácií primerových triplexov (viď **Tabuľka 6**). Vo všetkých vzorkách, na ktorých amplifikáciu bola použitá vzorka DNA, pozorujeme výskyt nešpecifických produktov s veľkosťou 90 bp (viď **Príloha 7**). U vzorky, na ktorej amplifikáciu bola použitá varianta mastermixu obsahujúceho primery pre exóny 18, 19 a 21 *EGFR*, boli separované fragmenty o dĺžke 107 bp, 163 bp a 186 bp predstavujúce špecifické produkty PCR (viď **Príloha 7**).

5.2.2 Optimalizácia koncentrácie primerov v reakčnej zmesi

U triplexu obsahujúceho primery pre exóny 18, 19, 21 *EGFR* bola následne optimalizovaná koncentrácia primerov pre cieľnú oblasť exónu 21, u ktorého bola s použitím kapilárovej elektroforézy detegovaná najnižšia koncentrácia špecifického produktu (viď **Príloha 7**). Vzorka DNA použitá na amplifikáciu bola nariadená na koncentráciu 20 ng/μl a 1 μl bol napipetovaný do skúmaviek s variantami mastermixu. U negatívnej kontroly bol použitý 1 μl dd PCR vody. Pôvodná koncentrácia primerov P5

a P7 (100 %) bola zvýšená na hodnoty 125 %, 150 % a 200 %. Po vykonaní PCR boli jednotlivé vzorky analyzované pomocou QIAxcel Advaced systému. Optimálna koncentrácia špecifického produktu cieľenej oblasti u exónu 21 bola detegovaná pri koncentrácii primerov 125 % (viď **Príloha 8**).

5.3 Testovanie schopnosti detekcie mutácií pomocou multiplexovej a singleplexovej PCR

V experimentoch zameraných na testovanie schopnosti detekcie mutácií bola pre amplifikáciu cieľených oblastí exónov 18, 19, 21 *EGFR* použitá reakčná zmes optimalizovaná v predchádzajúcich experimentoch (viď **Tabuľka 6**), v ktorej boli použité primery obsahujúce rôzne indexy vzoriek (viď **Tabuľka 1** a **Tabuľka 2**). Amplifikácia cieľenej oblasti exónu 20 *EGFR* bola prevedená s použitím reakčnej zmesi obsahujúcej jeden pár primerov s rôznymi indexami vzoriek (viď **Tabuľka 3** a **Tabuľka 2**). U negatívnej kontroly bol použitý 1 μ l dd PCR vody.

Bola testovaná schopnosť detekcie mutácií s použitím rôznych koncentrácií DNA a predpokladaného percenta mutácií 6,25 % (Experiment 1), respektíve 4,53 % (viď **Výpočet 1**). Pre prípravu vzoriek boli použité referenčné štandardy so zásobnou koncentráciou 50 ng/ μ l, ktoré boli zmiešané v pomere 1:1 (HD 802):(HD 709) a nariadené na výslednú koncentráciu DNA 25 ng/ μ l, 12,5 ng/ μ l a 6,25 ng/ μ l. Ďalej bola otestovaná schopnosť detekcie mutácií s použitím rôznych koncentrácií DNA vzoriek referenčných štandardov (HD 802, HD 709), ktoré boli nariadené na príslušné koncentrácie 25 ng/ μ l, 12,5 ng/ μ l a 6,25 ng/ μ l (Experiment 2). **Tabuľka 19** obsahuje informácie o použitých vzorkách DNA a Cq pri amplifikácii cieľených oblastí exónov 18, 19, 20, 21 génu *EGFR* pomocou optimalizovaného testu v jednotlivých experimentoch.

Tabuľka 19: Hodnoty Cq (cycle quantification value) u vzoriek DNA s rôznou koncentráciou amplifikovaných pomocou optimalizovanej PCR

Experiment 1	MP 1	MP 2	MP 3	SP 1	SP 2	SP 3	MP NTC	SP NTC
Koncentrácia DNA [ng/μl]	25	12,5	6,25	25	12,5	6,25	0	0
Cq	27,13	28,15	28,93	28,14	29,29	30,23	31,54	31,08
Experiment 2	MP			SP			MP NTC	SP NTC
Koncentrácia DNA (HD 709) [ng/μl]	25	12,5	6,25	25	12,5	6,25	0	0
Cq	25,60	27,30	27,65	28,21	29,40	30,68	30,17	29,97
Koncentrácia DNA (HD 802) [ng/μl]	25,00	12,50	6,25	25,00	12,50	6,25	0,00	0,00
Cq	29,22	28,48	30,49	29,93	30,25	30,20	30,17	29,97

Legenda: **MP** – reakčná zmes použitá pri PCR obsahovala primery pre cieľnú oblasť exónov 18, 19 a 21 *EGFR*. **SP** – reakčná zmes použitá pri PCR obsahovala primery pre cieľnú oblasť exónu 20 *EGFR*. **NTC** – negatívna kontrola pre jednotlivé varianty reakčnej zmesi.

Experiment 2 odhalil rozdielnu amplifikáciu referenčných štandardov (HD 802, HD 709; vid' **Tabuľka 19**), kedy priemerný rozdiel Cq u varianty reakčnej zmesi pre obsahujúcej primery pre cieľnú oblasť exónu 20 *EGFR* činil 1,02 cyklu. U varianty reakčnej zmesi určenej pre amplifikáciu cieľných oblastí exónov 18, 19 a 21 *EGFR* bol tento rozdiel v priemere 2,54 cyklu, čo by pri ideálnom priebehu PCR poukazovalo až na päťkrát vyššiu koncentráciu DNA vo vzorke referenčného štandardu HD 709.

Vzorky amplifikované pomocou PCR (Experiment 1) boli následne elektroforeticky separované pomocou QIAxcel Advanced systému. Získaná snímka gélu je obsiahnutá v **Prílohe 9**. So znižujúcou sa koncentráciou DNA (Experiment 1) bol pozorovaný pokles koncentrácie špecifických produktov PCR, ktorých veľkosť sa v prípade multiplexovej reakčnej zmesi použitej na amplifikáciu cieľných oblastí exónov 18, 19 a 21 *EGFR* pohybuje v rozmedzí 165–200 bp (vid' **Príloha 9**). Zároveň bola pozorovaná vyššia

koncentrácia nešpecifických produktov vo veľkosti 83–109 bp. V prípade amplifikácie cielenej oblasti exónu 20 *EGFR* bol pozorovaný rovnaký trend poklesu koncentrácie špecifického produktu a zvýšenie koncentrácie nešpecifického produktu s klesajúcou koncentráciou DNA (viď **Príloha 9**).

Vzorky z oboch experimentov (Experiment 1 a Experiment 2) boli následne prečistené pomocou QIAquick PCR Purification kitu a bola zameraná ich koncentrácia. Vzorky boli zmiešané, pripravené na sekvenovanie a sekvenované na prístroji MiSeq. Dáta boli spracované pomocou MAGERI (s použitím mageri_preset.txt prahu počtu zhodných UMI pre vytvorenie samostatného konsenzu na hodnotu 10 u Experimentu 1 a na hodnotu 4 u Experimentu 2) a percentá vybraných detegovaných mutácií sú obsahom **Tabuľky 20**.

Tabuľka 20: Percentuálne zastúpenie mutácií vzoriek z Experimentu 1 a Experimentu 2 detegovaných pomocou sekvenovania a spracovaných pomocou softvéru MAGERI

		Detegovaná mutácia [%]					
		L861Q	L858R	T790M	Δ E746– A750	L858P	L861P
Experiment 1 Koncentrácia DNA [ng/μl]	25	1,61	1,25	2,12	1,25	0,09	-
	12,5	2,22	1,66	1,60	1,62	-	-
	6,25	2,99	2,99	2,21	1,60	-	0,50
Experiment 2 Koncentrácia DNA (HD 709) [ng/μl]	25	-	0,08	-	-	-	-
	12,5	-	-	-	-	0,20	0,20
	6,25	-	-	-	-	-	-
Experiment 2 Koncentrácia DNA (HD 802) [ng/μl]	25	13,28	10,52	13,04	7,14	-	-
	12,5	10,56	11,84	17,49	7,23	0,08	-
	6,25	8,73	10,24	17,21	14,47	-	-

Legenda: (-) – daná mutácia nebola v špecifickej vzorke detegovaná. **L861Q** – mutácia v exóne 21 *EGFR*. **L858R** – mutácia v exóne 21 *EGFR*. **T790M** – mutácia v exóne 20 *EGFR*. **Δ E746–A750** – mutácia v exóne 19 *EGFR*. **L858P** – mutácia v exóne 21 *EGFR*. **L861P** – mutácia v exóne 21 *EGFR*.

V Experimente 1 boli detegované percentá špecifických mutácií nižšie ako očakávaný počet percent vo vzorkách, ktorý bol 6,25 %, respektíve 4,53 % (viď **Výpočet 1**). U vzoriek je pozorované zvýšenie percenta detegovaných mutácií v exóne 21 *EGFR* so znižujúcou sa koncentráciou DNA. To mohlo byť spôsobené dostatočným počtom primerov pre exón 21 pri nižšom počte molekúl DNA v PCR.

V Experimente 2 bolo u vzorky s použitým referenčným štandardom HD 709 očakávaných 0 % detegovaných mutácií. Detegované boli mutácie na hladine do 0,20 %. U vzorky s použitým referenčným štandardom HD 802 bolo očakávaných 12,5 % detegovaných mutácií. U jednotlivých koncentrácií DNA pozorujeme rôznu tendenciu zmeny percenta detegovaných mutácií v závislosti na koncentrácii DNA vo vzorke. Na základe rozdielnej amplifikácie vzoriek referenčných štandardov (viď **Tabuľka 19**) bola na základe počtu MIG (nastavenie prahu počtu zhodných UMI pre vytvorenie samostatného konsenzu na hodnote 4) u týchto vzoriek vypočítaná predpokladaná hodnota mutácií pri vzájomnom miešaní týchto vzoriek za účelom riedenia percenta detegovaných mutácií (viď **Výpočet 1**).

Výpočet 1: Predpokladaná hodnota mutácií získaná vzájomným zmiešaním vzoriek referenčných štandardov HD 709 a HD 802

$$\bar{x} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \frac{\text{Počet MIG HD 709}}{\text{Počet MIG HD 802}} = 1,76$$

Miešanie vzoriek referenčných štandardov v pomere 1:1
(HD 709):(HD802) = 1,76:1 \rightarrow (12,5 %)/2,76 = 4,53 %

Miešanie vzoriek referenčných štandardov v pomere 4:1
(HD 709):(HD802) = 7,04:1 \rightarrow (12,5 %)/8,04 = 1,55 %

5.3.1 Overenie výskytu falošne pozitívnych vzoriek

Experimenty zamerané na testovanie schopnosti detekcie mutácií zahŕňali overenie špecificity testu, teda vylúčenie detekcie falošne pozitívnych vzoriek. Použité vzorky DNA izolované z krvi (724, 740, 760) a referenčná vzorka HD 709 boli nariedené na výslednú koncentráciu 25 ng/μl. Referenčné štandardy boli následne zmiešané v pomere 1:4 – (HD 802):(HD 709) a nariedené na výslednú koncentráciu DNA 25 ng/μl. **Tabuľka 21** obsahuje informácie o použitých vzorkách DNA a Cq pri amplifikácii

cielených oblastí exónov 18, 19, 20, 21 génu *EGFR* pomocou optimalizovaného testu v experimente.

Tabuľka 21: Hodnoty Cq (cycle quantification value) u vzoriek DNA amplifikovaných pomocou optimalizovanej PCR

		Vzorka DNA					
		724	740	760	WT	M	NTC
Cq	MP	23,39	22,46	22,84	23,78	24,62	23,79
	SP	25,52	24,29	25,33	27,73	28,23	30,15

Legenda: **MP** – reakčná zmes použitá pri PCR obsahovala primery pre cieľnú oblasť exónov 18, 19 a 21 *EGFR*. **SP** – reakčná zmes použitá pri PCR obsahovala primery pre cieľnú oblasť exónu 20 *EGFR*. **NTC** – negatívna kontrola pre jednotlivé varianty reakčnej zmesi. **WT** – na PCR použitá referenčná vzorka HD 709 (25 ng/μl). **M** – na PCR použitá vzorka referenčných štandardov zmiešaných v pomere 1:4 – (HD 802):(HD 709) a nariadených na výslednú koncentráciu DNA 25 ng/μl.

Vzorky boli následne prečistené pomocou QIAquick PCR Purification kitu a bola zameraná ich koncentrácia. Vzorky boli zmiešané, pripravené na sekvenovanie a sekvenované na prístroji MiSeq. Dáta boli spracované pomocou MAGERI (s použitím mageri_preset.txt prahu počtu zhodných UMI pre vytvorenie samostatného konsenzu na hodnotu 4) a percentá vybraných detegovaných mutácií sú obsahom **Tabuľky 22**.

Tabuľka 22: Percentuálne zastúpenie mutácií u amplifikovaných vzoriek DNA izolovaných z krvi a vzoriek referenčných štandardov detegovaných pomocou sekvenovania a spracovaných pomocou softvéru MAGERI

		Detegovaná mutácia [%]					
		L861Q	L858R	T790M	$\Delta E746-A750$	L858P	L861P
Vzorka	724	-	-	-	-	0,24	-
	740	-	-	-	-	-	-
	760	-	-	0,17	-	-	-
	WT	-	-	-	-	-	-
	M	0,88	0,44	0,55	0,30	0,11	-

Legenda: **MP** – reakčná zmes použitá pri PCR obsahovala primery pre cieľnú oblasť exónov 18, 19 a 21 *EGFR*. **SP** – reakčná zmes použitá pri PCR obsahovala primery pre cieľnú oblasť exónu 20 *EGFR*. **NTC** – negatívna kontrola pre jednotlivé varianty reakčnej zmesi. **WT** – na PCR použitá referenčná vzorka HD 709 (25 ng/ μ l). **M** – na PCR použitá vzorka referenčných štandardov zmiešaných v pomere 1:4 – (HD 802):(HD 709) a nariadených na výslednú koncentráciu DNA 25 ng/ μ l. (-) – daná mutácia nebola v špecifickej vzorke detegovaná. **L861Q** – mutácia v exóne 21 *EGFR*. **L858R** – mutácia v exóne 21 *EGFR*. **T790M** – mutácia v exóne 20 *EGFR*. **$\Delta E746-A750$** – mutácia v exóne 19 *EGFR*. **L858P** – mutácia v exóne 21 *EGFR*. **L861P** – mutácia v exóne 21 *EGFR*.

U vzoriek získaných pomocou PCR amplifikácie vzoriek DNA izolovaných z krvi bola pozorovaná náhodná detekcia falošne pozitívneho výskytu mutácií na hladine 0,24 a 0,17 %. U vzorky získanej DNA získanej pomocou zmiešania referenčných štandardov v pomere (HD 709):(HD802) - 4:1 bolo predpokladané percentuálne zastúpenie mutácií 1,55 % (viď **Výpočet 1**). Detegované boli nižšie hodnoty mutácií, ktoré boli detegované pod úrovňou 1 %.

5.4 Testovanie navrhnutých primerov pre cieľný úsek exónu 20 *EGFR*

Vzorka DNA o koncentrácii 53 ng/ μ l bola nariadená na koncentráciu 25 ng/ μ l a amplifikovaná pomocou PCR s použitím GoTaq[®] MDx Hot Start polymerázy a navrhnutých primerov pre cieľný úsek exónu 20 génu *EGFR* (viď **Tabuľka 1**).

Reakčná zmes bola pripravená pomocou rozpisu v **Tabuľke 3** a použitý teplotný program zapísaný v **Tabuľke 4**. Výsledné hodnoty C_q pri použití nových primerových párov v porovnaní s primerami používanými v predchádzajúcich experimentoch (viď **Tabuľka 2**) zobrazuje **Tabuľka 23**.

Tabuľka 23: Hodnoty C_q (cycle quantification value) pri použití nových primerových párov v porovnaní s primerami používanými v predchádzajúcich experimentoch

	Vzorka DNA (25 ng/μl)			Negatívna kontrola
Primer P5	2064	2065	1848	2065
Primer P7	2066	2066	1858	2066
C_q	26,17	25,28	24,45	28,65

V **Prílohe 10** je zobrazená snímka gélu získaná pomocou QIAxcel Advanced systému obsahujúca vzorky amplifikované s použitím jednotlivých primerových kombinácií z **Tabuľky 23**. Špecifický produkt PCR s veľkosťou 173 bp bol detegovaný iba u vzorky amplifikovanej pomocou primerov 2064 a 2066. U ostatných vzoriek boli detegované nešpecifické produkty. V ďalších experimentoch boli použité nové primery pre cieľnú oblasť exónu 20 *EGFR*.

5.5 Optimalizácia podmienok PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy

V prvom kroku bola testovaná schopnosť detekcie mutácií pomocou Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy. Bola testovaná vzorka DNA (740) vyizolovaná z krvi, ktorá bola nariadená na koncentráciu 25 ng/μl. Exóny 18, 19, 20 a 21 *EGFR* boli amplifikované s použitím reakčnej zmesi v **Tabuľke 9** a teplotného programu v **Tabuľke 10**, pričom teplota 1. annealingu bola 65 °C na 5 minút a teplota 2. annealingu bola nastavená na teplotu 63 °C. Vzorky získané v PCR boli následne prečistené pomocou QIAquick PCR Purification kitu a bola zmeraná ich koncentrácia. Vzorky boli zmiešané, pripravené na sekvenovanie a sekvenované na prístroji MiSeq. Dáta boli spracované pomocou MAGERI s použitím mageri_preset.txt s nastavením prahu počtu zhodných UMI pre vytvorenie samostatného konsenzu na hodnotu 4. Dáta o počte vytvorených konsenzov (MIG) boli následne porovnané s dátami získanými v experimente zameranom na testovanie schopnosti detekcie mutácií s použitím multiplexovej a singleplexovej PCR

a reakčnej zmesi obsahujúcej GoTaq® MDx Hot Start polymerázu (viď kapitola 5.2.2). Dáta sú obsahom **Tabuľky 24**. Počet jednotlivých vytvorených konsenzov bol u vzorky amplifikovanej s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy nižší. Bola zistená nízka amplifikácia cieľenej oblasti exónu 18 *EGFR*. V ďalších krokoch bola prevedená optimalizácia PCR programu pre reakciu s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy.

Tabuľka 24: Porovnanie počtu MIG získaných pomocou programu MAGERI u vzorky DNA 740 amplifikovanej s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy

	Počet MIG pre jednotlivé exóny <i>EGFR</i>	
	Exón 19, 20, 21	Exón 18
Vzorka 1	32 712	14 987
Vzorka 2	6216	33

Legenda: **Vzorka 1** – vzorka amplifikovaná s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy. **Vzorka 2** - vzorka amplifikovaná s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy.

Vzorka DNA o koncentrácii 12 ng/μl bola amplifikovaná pomocou PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy a primerov pre cieľené úseky exónov 18, 19, 20 a 21 génu *EGFR*. Pri optimalizácii 2. annealingu bol použitý teplotný gradient 55–72 °C a teplota 1. annealingu 65 °C na 5 min. Pomocou použitia QIAxcel Advanced systému bola určená optimálna teplota 2. annealingu na 62 °C. Optimalizácia 1. annealing teploty bola vykonaná pomocou teplotného gradientu 52–72 °C, pričom teplota 2. annealingu bola 62 °C. **Príloha 11**, **Príloha 12**, **Príloha 13** a **Príloha 14** zobrazuje snímky gélov získané pomocou QIAxcel Advanced systému obsahujúce vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu. U exónu 18 *EGFR* bol u všetkých teplôt 1. annealingu detegovaný nešpecifický produkt (97 bp), amplifikácia špecifického produktu bola nízka (viď **Príloha 11**). U exónu 19 *EGFR* bola najvyššia koncentrácia špecifického produktu (185 bp) detegovaná pri teplote 1. annealingu 68,6 °C, nešpecifický produkt sa neamplifikoval (viď **Príloha 12**). U exónu 20 *EGFR* bola najvyššia koncentrácia špecifického produktu (207 bp) pri 1. annealingovej teplote 72 °C, amplifikácia nešpecifického produktu (97 bp) bola nízka (viď **Príloha 13**). U exónu 21 *EGFR* bola detegovaná nízka koncentrácia špecifického produktu (163 bp)

a vysoká koncentrácia nešpecifického produktu (vid' **Príloha 14**). Vzhľadom na výsledky optimalizácie PCR bolo v ďalšom experimente testované použitie rôznych polymeráz pre exón 18 *EGFR*.

5.6 Testovanie polymeráz s 3'→5' exonukleázovou aktivitou pre amplifikáciu cieleného úseku exónu 18 *EGFR*

Vzorka DNA vyzolovanej z krvi o koncentrácii 20 ng/μl bola amplifikovaná pomocou PCR s použitím troch typov reakčných zmesí, GoTaq® MDx Hot Start polymerázy (vid' **Tabuľka 3**), *Takara Ex Taq* HS polymerázy (vid' **Tabuľka 12**) a FastStart™ High Fidelity PCR systému (vid' **Tabuľka 11**). Teplotný program použitý pre PCR bol navrhnutý na základe optimálnych podmienok pre reakcie s použitím jednotlivých polymeráz (vid' **Tabuľka 13**). Amplifikované vzorky boli analyzované pomocou systému QIAxcel Advanced a výsledná snímka gélu bola počítačovo upravená a je súčasťou **Prílohy 15**. U vzorky amplifikovanej s použitím polymerázy *Takara Ex Taq* HS bola detegovaná vysoká koncentrácia nešpecifických produktov. V porovnaní s výsledkami získanými pri použití GoTaq® MDx Hot Start polymerázy bola najvyššia koncentrácia špecifických produktov detegovaná u FastStart™ High Fidelity PCR systému.

6 DISKUSIA

Účelom tejto bakalárskej práce bolo overenie možnosti inkorporácie UMI do jednokrokovej prípravy sekvenačnej knižnice pre genotypizáciu *EGFR*. Použitý spôsob spája do jednej PCR niekoľko krokov bežnej prípravy knižnice, ktorá zahŕňa fragmentáciu DNA, ligáciu adaptérov a následnú amplifikáciu cieľných génov. Bola prevedená optimalizácia podmienok PCR s použitím špecifických primerov pre cieľné oblasti exónov 18, 19, 20 a 21 génu *EGFR* na prípravu sekvenačnej knižnice určenej pre sekvenovanie na platforme Illumina u vzoriek s nízkou koncentráciou DNA a nízkou frekvenciou mutácií (Illumina, 2017).

Cieľom bakalárskej práce bola optimalizácia a overenie možnosti použitia metódy založenej na príprave sekvenačnej knižnice, v ktorej boli v PCR vzorky amplifikované pomocou primerov obsahujúcich sekvenačné adaptéry, indexy označujúce vzorku (SI) a unikátne molekulové indexy (UMI). Metódou, ktorá je schopná využívať UMI inkorporované počas PCR, je SiMSen-Seq (Simple, Multiplexed, PCR-based barcoding of DNA for Sensitive mutation detection using Sequencing; vid' kapitola 3.5.1). Na jej realizáciu je však, na rozdiel od metódy popísanej v tejto bakalárskej práci, potrebné prevedenie dvoch PCR. Počas prvej PCR využíva primery obsahujúce 12 bází dlhé UMI, ktoré sú chránené pomocou štruktúry vlásenky. Produkt PCR je následne amplifikovaný s použitím primerov obsahujúcich sekvenciu adaptérov. Metóda SiMSen-Seq bola otestovaná u vzoriek s nízkou frekvenciou mutácií a je schopná detekcie pod 0,1 %. Použitie UMI umožňuje uchovanie informácie o počte molekúl DNA v originálnej vzorke po vykonaní amplifikácie. Slúžia tak na identifikáciu PCR duplikátov, artefaktov a chýb, ktoré vznikajú počas amplifikácie a sekvenovania vzoriek s nízkou frekvenciou mutácií (Kivioja *et al.*, 2011; Schmitt *et al.*, 2012; Ståhlberg *et al.*, 2016).

V prvom kroku bola používaná GoTaq® MDx Hot Start polymeráza s relatívne nízkou presnosťou, ktorá sa pohybuje v okolí 10^{-5} mutácií na bp. Metóda využívajúca GoTaq® MDx Hot Start polymerázu však bola v minulosti úspešne optimalizovaná a validovaná pre genotypizáciu génov *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *NRAS* a *EGFR* bez použitia UMI. Metóda bola modifikovaná inkorporáciou primerov obsahujúcich 8 bází dlhé indexy a boli optimalizované teploty a časy 1. a 2. annealingu PCR. Pri PCR bolo pozorované zníženie hodnôt Cq (cycle quantification value) u vzoriek, ktoré následne pri detekcii pomocou QIAxcel Advanced systému vykazovali vysokú koncentráciu nešpecifického produktu. Amplifikácia nešpecifického produktu teda prebiehala v skorších cykloch PCR, čo

znižovalo hodnotu Cq. Na základe týchto poznatkov bola určená potreba detekcie amplikónov v jednotlivých vzorkách pomocou kapilárovej elektroforézy, podľa ktorej boli experimenty následne hodnotené. Reakcia bola optimalizovaná s použitím multiplexovej reakčnej zmesi obsahujúcej primerové páry pre amplifikáciu cieľných oblastí exónov 18, 19, 20 a 21 *EGFR*. Multiplexovanie PCR je vykonávané za účelom zníženia počtu potrebných reakcií, času a množstva používanej vzorky DNA. V tomto multiplexovom usporiadaní však bola detegovaná nízka koncentrácia jednotlivých špecifických produktov PCR. Naopak koncentrácia špecifických produktov pri použití reakčnej zmesi obsahujúcej primerové páry pre amplifikáciu cieľných oblastí exónov 18, 19 a 21 *EGFR* bola v porovnaní s multiplexom pre všetky štyri exóny vyššia. PCR tak nebolo možné multiplexovať do jednej reakcie, avšak využitím tejto kombinácie primerov spolu s druhou PCR pre amplifikáciu cieľnej oblasti exónu 20 *EGFR*, bol znížený počet reakcií a množstvo vzorky DNA potrebnej na genotypizáciu štyroch exónov *EGFR* na polovicu (Kotková, 2017; McInerney *et al.*, 2014; Sint *et al.*, 2012).

S použitím optimalizovaného zloženia reakčnej zmesi v kombinácii so singleplexovou reakčnou zmesou obsahujúcou primerový pár pre amplifikáciu cieľnej oblasti exónu 20 (*EGFR*) bola overená schopnosť detekcie mutácií s použitím rôznych koncentrácií DNA, predpokladaného percenta mutácií 4,53 % (vzorka referenčných štandardov HD 802 a HD 709 zmiešaných v pomere 1:1) a s použitím rôznych koncentrácií DNA vzoriek referenčných štandardov (HD 802, HD 709). U použitých koncentrácií boli detegované všetky mutácie avšak s nižším percentuálnym zastúpením. Bola zistená rozdielna amplifikácia referenčných štandardov (HD 802, HD 709), kedy priemerný rozdiel Cq u varianty reakčnej zmesi obsahujúcej primery pre cieľnú oblasť exónu 20 *EGFR* činil 1,02 cyklu. U varianty reakčnej zmesi určenej pre amplifikáciu cieľných oblastí exónov 18, 19 a 21 *EGFR* bol tento rozdiel v priemere 2,54 cyklu. Na základe toho bola s použitím počtu MIG u týchto vzoriek, vypočítaná predpokladaná hodnota mutácií pri vzájomnom miešaní týchto vzoriek za účelom riedenia percenta detegovaných mutácií. Overenie špecificity testu bolo prevedené na sade 3 vzoriek DNA izolovaných z krvi, na referenčnom štandarde HD 709 a na vzorke referenčných štandardov zmiešaných v pomere 1:4 – (HD 802):(HD 709). Vo vzorke pripravenej pomocou zmiešania referenčných štandardov bolo predpokladané zastúpenie mutácií 1,55 %. V tejto vzorke boli detegované všetky zastúpené mutácie na úrovni pod 1 %. U dvoch testovaných

vzoriek DNA izolovaných z krvi bola pozorovaná náhodná detekcia falošne pozitívneho výskytu mutácií na hladine 0,24 % (mutácia L858P) a 0,17 % (mutácie T790M).

Výskyt falošne pozitívnych vzoriek bol prisúdený chybám, ktoré boli spôsobené nesprávnym zaradením báze pri PCR, teda nízkou presnosťou používanej polymerázy. Z tohto dôvodu bola v nasledujúcich experimentoch testovaná Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymeráza, ktorá má 280krát vyššiu presnosť ako *Taq* DNA polymeráza a nízku chybovosť. Pri porovnaní počtu MIG u sekvenovaných vzoriek, na ktorých prípravu bola použitá Q5® Hot Start High-Fidelity DNA a GoTaq® MDx Hot Start polymeráza, bol zistený nižší počet vytvorených konsenzov v procese spracovania dát pomocou programu MAGERI u vzorky s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy. Avšak bola zistená nízka amplifikácia cieľenej oblasti exónu 18 *EGFR*. Následnou optimalizáciou podmienok PCR pomocou Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy sa podarilo zvýšiť koncentráciu špecifických produktov reakcie s použitím primerov pre cieľené oblasti exónov 19, 20 a 21 génu *EGFR*. Pre exón 18 *EGFR*, ktorého koncentrácia po PCR detegovaná pomocou systému QIAxcel Advanced bola nízka aj po optimalizácii, bola otestovaná možnosť použitia inej polymerázy (McInerney *et al.*, 2014; New England BioLabs®, 2018).

V experimente s použitím polymeráz s 3'→5' exonukleázovou aktivitou (proofreading schopnosťou) Takara Ex Taq HS a polymerázy z FastStart™ High Fidelity PCR systému pre amplifikáciu cieľeného úseku exónu 18 *EGFR* bola, v porovnaní s GoTaq® MDx Hot Start polymerázou, ako najlepšia vyhodnotená polymeráza z FastStart™ High Fidelity PCR systému. Jeho použitie by po optimalizácii mohlo byť vhodným riešením problému s nízkou amplifikáciou cieľenej oblasti exónu 18 génu *EGFR* a zároveň je možné predpokladať zvýšenie sekvenačnej kvality pri použití polymerázy s proofreading schopnosťou. Je preto vhodné zvážiť optimalizáciu PCR s použitím FastStart™ High Fidelity PCR systému pre všetky detegované exóny génu *EGFR* a prípadné použitie v multiplexovej reakcii (Fazekas *et al.*, 2018).

Posledným krokom celého procesu vývoja a zavedenia metódy do klinickej praxe je jej validácia. Vzhľadom na potrebu dokonalej optimalizácie metódy pred jej validáciou a problémy, s ktorými bolo nutné sa v tomto procese vysporiadať, nebolo možné metódu optimalizovanú v tejto bakalárskej práci posunúť do validačného procesu. Po výbere vhodných cieľov na genotypizáciu je nutné optimalizovať celý proces od prípravy knižnice, až po analýzu dát. Následne je prístupné k vypracovaniu validačného

protokolu, ktorý zahŕňa spôsob testovania a vyhodnotenia určených validačných parametrov, medzi ktoré patrí limit detekcie (LOD), špecificita, senzitivita, robustnosť, opakovateľnosť, prípadne parametre určované na základe medzilaboratórneho porovnávania. Dostupné sú rôzne dokumenty obsahujúce definície a spôsob určenia jednotlivých parametrov, ktoré je však možné v rámci validácie metódy upraviť (Jennings *et al.*, 2017; Soukupova *et al.*, 2018).

Na validáciu je potrebné použiť väčšie množstvo vzoriek DNA, ktoré zahŕňajú vzorky s výskytom „hotspot“ mutácií relevantných pre daný test a aspoň dve dobre charakterizované vzorky (referenčné vzorky) na vylúčenie systematických chýb. Na validáciu metódy optimalizovanej v tejto bakalárskej práci by bolo vhodné použitie sady 20 negatívnych a 20 pozitívnych vzoriek. Pri testovaní reprodukovateľnosti je nutné minimálne 3krát otestovať a porovnať hodnoty získané pri testovaní vzorky DNA, ktorá je analyzovaná počas dlhšieho časového obdobia za účelom inkorporácie všetkých prístrojov, personálu a rôznych šarží reagensií, na zistenie výskytu náhodných chýb. Oproti tomu, na základe porovnania získaných hodnôt pri opakovanom testovaní vzorky DNA s použitím rovnakých reagensií, inštrumentácie a vykonaným rovnakou osobou, je možné určiť opakovateľnosť. LOD je možné určiť na sade vzoriek s rôznymi alelickými frekvenciami (napr. 0,5 %, 1 % a 2 % v aspoň piatich duplikátoch), kedy je najnižší limit detekcie (LLOD) definovaný ako najnižšia alelická frekvencia, pro ktorej je možné spoľahlivo detegovať 95 % vzoriek. Senzitivita vyjadruje úspešnosť, s akou je test schopný zachytiť prítomnosť sledovanej mutácie. Naopak špecificita vyjadruje schopnosť testu správne identifikovať prípady, u ktorých sa sledovaná mutácia nevyskytuje. V rámci tejto bakalárskej práce bolo na určenie týchto parametrov použité nedostatočné množstvo spracovaných vzoriek DNA. Na určenie špecificity a senzitivity testu, by bolo vhodné použitie sady aspoň piatich dobre charakterizovaných vzoriek, nariadených na rôznu koncentráciu DNA (Jennings *et al.*, 2017; Soukupova *et al.*, 2018; Vollbrecht *et al.*, 2018).

Metóda, ktorej sa venuje táto bakalárska práca by mohla po ďalšej optimalizácii slúžiť na detekciu mutácií génu *EGFR* s nízkou frekvenciou u vzoriek ctDNA pri determinácii prognózy, monitorovaní a výbere liečby u pacientov. Dôležitú úlohu zohráva monitorovanie mutácií *EGFR* pri liečbe s použitím TKI, u ktorej sú detegované najmä mutácie spôsobujúce senzitivitu a rezistenciu voči jednotlivým líniam TKI. Výhodou

použitia vzoriek ctDNA je možnosť neinvazívneho sledovania dynamických zmien v mutačnom profile pacienta počas liečby (Diaz *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017).

7 ZÁVER

V teoretickej časti tejto bakalárskej práce bola zhrnutá problematika personalizovanej medicíny a detekcie nádorových biomarkerov s použitím vzoriek ctDNA s dôrazom na použitie metód sekvenovania novej generácie na platforme Illumina a na zlepšenie schopnosti detekcie mutácií s nízkou frekvenciou. Popísané boli najdôležitejšie charakteristiky vzoriek ctDNA a ich využitie v klinickej praxi, najmä u vzoriek nesúcich mutácie génu *EGFR*. V tejto časti boli popísané taktiež najnovšie trendy a technológie v oblasti detekcie mutácií v ctDNA.

V experimentálnej časti tejto bakalárskej práce bol optimalizovaný postup prípravy sekvenačnej knižnice pre platformu Illumina MiSeq s použitím PCR, počas ktorej boli do cielených úsekov génu *EGFR* inkorporované UMI. Optimalizované boli jednotlivé parametre reakčnej zmesi a teplotného programu PCR pre amplifikáciu exónov 18, 19, 20 a 21 génu *EGFR*. Cieľom bolo získanie optimálnych koncentrácií špecifických produktov cielených oblastí ako aj následná multiplexácia reakcie, ktorá v tomto prípade znížila množstvo vzorky DNA potrebnej pre detekciu mutácií v exónoch 18, 19, 20 a 21 génu *EGFR* na polovicu v porovnaní so singleplexovým usporiadaním (reakčná zmes s obsahom primerov pre amplifikáciu jedného cieleného úseku) tohto testu.

Pri sekvenovaní knižnice pripravenej pomocou optimalizovanej PCR nebolo dosahované očakávaných percentuálnych zastúpení mutácií a bol detegovaný náhodný výskyt falošne pozitívnych vzoriek. V reakcii na to, bola zmenená používaná polymeráza, ktorá mala nižšiu chybovosť. Vzhľadom na časovú náročnosť experimentov nebolo možné metódu posunúť do procesu validácie. Postup validácie bol navrhnutý a po ďalšej optimalizácii testu by mohol slúžiť na detekciu mutácií s nízkou frekvenciou mutácií vo vzorkách ctDNA.

8 LITERATÚRA

- Adams, D. R. *et Eng*, C. M. (2018): Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. *New England Journal of Medicine*, 379(14), 1353–62.
- Alix-Panabieres, C. *et Pantel*, K. (2016): Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discovery*, 6(5), 479–491.
- Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., ... *et Easton*, D. F. (2003): Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1117–1130.
- Ascierto, P. A., Kirkwood, J. M., Grob, J. J., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F. M., ... *et Mozzillo*, N. (2012): The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of translational medicine*, 10, 85.
- Ashworth, T. R. (1869): A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. *The Medical Journal of Australia*, 14, 146-147.
- Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A., ... *et Wooster*, R. (2004): The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *British Journal of Cancer*, 91(2), 355-358.
- Benkovic S. J., *et Cameron* C. E. (1995): Kinetic analysis of nucleotide incorporation and misincorporation by Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Methods in Enzymology*, 262, 257–269.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., ... *et Smith*, A. J. (2008): Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456 (7218), 53–59.
- Biesecker, L. G., *et Green*, R. C. (2014): Diagnostic Clinical Genome and Exome Sequencing. *New England Journal of Medicine*, 370(25), 2418–2425.
- Boland, C. R., *et Goel*, A. (2010): Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073-2087.e3.
- Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., ... *et Srivastava*, S. (1998): A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research*, 58(22), 5248-5257.
- Bratman, S. V., Newman, A. M., Alizadeh, A. A., *et Diehn*, M. (2015): Potential clinical utility of ultrasensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 15(6), 715–719.
- Cairns, R. A. *et Mak*, T. W. (2013): Oncogenic Isocitrate Dehydrogenase Mutations: Mechanisms, Models, and Clinical Opportunities. *Cancer Discovery* 3(7), 730.

- Caleca, L., Radice, P., De Summa, S., *et* Tommasi, S. (2011): Unclassified Variants in BRCA Genes: Guidelines for Interpretation. *Annals of Oncology*, 22(1), 18–23.
- Chan, D. W., Montz, F. J., Singer, G., Chang, H., Shih, I., Sokoll, L. J., ... *et* Zhang, Z. (2002): Assessment of Plasma DNA Levels, Allelic Imbalance, and CA 125 as Diagnostic Tests for Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(22), 1697–1703.
- Chen, L., Fu, W., Zheng, L., Liu, Z., *et* Liang, G. (2018): Recent Progress of Small-Molecule Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitors against C797S Resistance in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(10), 4290–4300.
- Chen, K. Z., Lou, F., Yang, F., Zhang, J. B., Ye, H., Chen, W., ... *et* Wang, J. (2016): Circulating Tumor DNA Detection in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Targeted Sequencing. *Scientific reports*, 6, 31985.
- Cheng, F., Liang, H., Butte, A. J., Eng, C., *et* Nussinov, R. (2019): Personal Mutanomes Meet Modern Oncology Drug Discovery and Precision Health. *Pharmacol Reviews*, 71(1), 1-19.
- Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., *et* Bardelli, A. (2013): Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(8), 472–484.
- Cohen, A. L., Holmen, S. L., *et* Colman, H. (2013): IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Current neurology and neuroscience reports*, 13(5), 345.
- Cohen, S. (1983): The Epidermal Growth Factor (EGF). *Cancer*, 51(10), 1787-1791.
- Dahl, F., Stenberg, J., Fredriksson, S., Welch, K., Zhang, M., Nilsson, M., ... *et* Ji, H. (2007): Multigene amplification and massively parallel sequencing for cancer mutation discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9387-9392.
- Davar, D., Beumer, J. H., Hamieh, L., *et* Tawbi, H. (2012): Role of PARP inhibitors in cancer biology and therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 19(23), 3907-3921.
- De Witte, A., Zobeck, K. L., Forsmark, L., LeCocq, Ch., Tao, H., Arezi, B., *et* Isaksson, M. (2017): Molecular barcodes. *Agilent Technologies*, 1-2, 5991-7421EN
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., ... *et* Bardelli, A. (2008): BRAF wild-type is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(35), 5705–5712.
- Diaz, L. A., *et* Bardelli, A. (2014): Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(6), 579-86.
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., ... *et* Diaz Jr, L. A. (2008): Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*, 14(9), 985–990.
- Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., *et* Thermes, C. (2014): Ten years of next-generation sequencing technology. *Cell Press, Trends in Genetics*, 30(9), 118 – 126.
- Dillon, O. J., Lunke, S., Stark, Z., Yeung, A., Thorne, N., Gaff, C., ... *et* Melbourne Genomics Health Alliance. (2018): Exome Sequencing Has Higher Diagnostic Yield Compared to Simulated Disease-Specific Panels in Children with Suspected Monogenic Disorders. *European Journal of Human Genetics*, 26(5), 644–51.

- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., *et* Vogelstein, B. (2003): Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8817–22.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., *et* Vogelstein, B. (2003): Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8817–22.
- Edwards, S. L., Brough, R., Lord, C. J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D. A., ... *et* Ashworth, A. (2008): Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*, 451(7182), 1111–1115.
- Fazekas, A. J., Steeves, R. *et* Newmaster, S. G. (2018): Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. *Biotechniques*, 48(4), 277–283.
- Fiala, C., *et* Diamandis, E. P. (2018): Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection. *BMC Medicine*, 16(1), 166.
- Fleischhacker, M. *et* Schmidt, B. (2007): Circulating Nucleic Acids (CNAs) and Cancer—A Survey. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1775(1), 181–232.
- Fox, E. J., Reid-Bayliss, K. S., Emond, M. J., *et* Loeb, L. A. (2014): Accuracy of Next Generation Sequencing Platforms. *Next generation, sequencing and applications*, 1, 1000106.
- Futreal, P. A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., *et* Stratton, M. R. (2004): A Census of Human Cancer Genes. *Nature Reviews Cancer*, 4(3), 177–183.
- Genetica: NGS – Illumina (2019): [online] [navštívené 13.4.2019] Dostupné z <https://www.genetica.cz/next-generation-sequencing>
- Glessner, J. T., Wang, K., Cai, G., Korvatska, O., Kim, C. E., Wood, S., ... *et* Hakonarson, H. (2009): Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*, 459(7246), 569–73.
- Grady, W. M., *et* Carethers, J. M. (2008): Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079–99.
- Gregory, M. T., Bertout, J. A., Ericson, N. G., Taylor, S. D., Mukherjee, R., Robins, H. S., Drescher, C. W., ... *et* Bielas, J. H. (2015): Targeted single molecule mutation detection with massively parallel sequencing. *Nucleic acids research*, 44(3), e22.
- Guo, J., Xu, N., Li, Z., Zhang, S., Wu, J., Kim, D. H., ... *et* Ju, J. (2008): Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27), 9145–9150.
- Gupta, S., *et* El-Rayes, B. F. (2008): Small molecule tyrosine kinase inhibitors in pancreatic cancer. *Biologics : targets & therapy*, 2(4), 707–715.
- Han, X., Wang, J., *et* Sun, Y. (2017): Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 15(2), 59–72.

- Heitzer, E., Ulz, P., *et* Geigl, J. B. (2015): Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clinical Chemistry*, 61(1), 112–123.
- Illumina: An introduction to Next-Generation Sequencing Technology (2016): [online] [navštívené 5.1.2019] Dostupné z https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing-introduction.pdf
- Illumina: Deep sequencing (2019a): [online] [navštívené 13.4.2019] Dostupné z <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/deep-sequencing.html>
- Illumina: FASTQ files explained (2017a): [online] [navštívené 20.12.2018] Dostupné z <https://support.illumina.com/bulletins/2016/04/fastq-files-explained.html>
- Illumina: HiSeq X™ Series of Sequencing Systems (2017): [online] [navštívené 5.5.2019] Dostupné z <https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet-hiseq-x-ten.pdf>
- Illumina: Illumina Reports Financial Results for Fourth Quarter and Fiscal Year 2017 (2018): [online] [navštívené 14.4.2018] Dostupné z https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/company/investor-relations/Q417_Illumina_EarningsRelease.pdf
- Illumina: MiSeq System User Guide (2013): [online] [navštívené 13.1.2019] Dostupné z [http://application.sbroscoff.fr/download/fr2424/abims/corre/ngs/1_illumina/MiSeq%20System%20User%20Guide%20\(15027617\).pdf](http://application.sbroscoff.fr/download/fr2424/abims/corre/ngs/1_illumina/MiSeq%20System%20User%20Guide%20(15027617).pdf)
- Illumina: Overview of Indexed Sequencing on the NextSeq, MiSeq, and HiSeq Platforms (2015): [online] [navštívené 13.12.2018] Dostupné z http://www.bea.ki.se/documents/Illumina_Indexed_-_Sequencing_Reference_Guide_Aug2015.pdf
- Illumina: Specifications for the MiSeq System (2019): [online] [navštívené 13.1.2019] Dostupné z <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq/specifications.html>
- Integrated DNA Technologies: Adapters for next generation sequencing [online] [navštívené 8.4.2019] Dostupné z <https://eu.idtdna.com/pages/products/next-generation-sequencing/adapters>
- Inukai, M., Toyooka, S., Ito, S., Asano, H., Ichihara, S., Soh, J., ... *et* Date, H. (2006): Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 66(16), 7854–7858.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. *et* Knippers, R. (2001): DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Research*, 61(4), 1659.
- Jennings, L. J., Arcila, M. E., Corless, C., Kamel-Reid, S., Lubin, I. M., Pfeifer, J., ... *et* Nikiforova, M. N. (2017): Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 19(3), 341–365.
- Jun-Liang, L., *et* Liang, Z. (2016): Circulating Free DNA in the Era of Precision Oncology: Pre- and Post-Analytical Concerns. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 2(4), 223–230.
- Karapetis, Ch. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J., O’Callaghan, Ch. J., Tu, D., Tebbutt, N. C., ... *et* Zalcborg, J. R. (2008): K-Ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(17), 1757–1765.

- Kawakami, H., Zaanan, A., *et* Sinicrope, F. A. (2015): Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Current treatment options in oncology*, 16(7), 30.
- Kinde, I., Wu, J., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W. *et* Vogelstein, B. (2011): Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 9530–9535.
- Kircher, M., Sawyer, S., *et* Meyer, M. (2012): Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Research*, 1(40), e3.
- Kivioja, T., Vähärautio, A., Karlsson, K., Bonke, M., Enge, M., Linnarsson, S., *et* Taipale, J. (2011): Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nature Methods*, 9(1), 72–74.
- Kobayashi, S., Boggon, T. J., Dayaram, T., Jänne, P. A., Kocher, O., Meyerson, M., ... *et* Halmos, B. (2005): EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 352(8), 786–792.
- Kotková L. (2017): Optimalizace přípravy knihoven pro multiparalelní sekvenování v diagnostice kolorektálního karcinomu. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- König, J., Zarnack, K., Rot, G., Curk, T., Kayikci, M., Zupan, B., ... *et* Ule, J. (2010): iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(7), 909–915.
- Kukita, Y., Matoba, R., Uchida, J., Hamakawa, T., Doki, Y., Imamura, F., *et* Kato, K. (2015): High-fidelity target sequencing of individual molecules identified using barcode sequences: de novo detection and absolute quantitation of mutations in plasma cell-free DNA from cancer patients. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 22(4), 269-277.
- Lauring, J. *et* Park, B. H. (2011): BEAMing Sheds Light on Drug Resistance. *Clinical Cancer Research* 17(24), 7508–7510.
- Ledergerber, C., *et* Dessimoz, C. (2011): Base-calling for next-generation sequencing platforms. *Briefings in Bioinformatics*, 12(5), 489-497.
- Ledford H. (2010): Big science: the cancer genome challenge. *Nature*, 464(7291), 972–974.
- Lee, H. S., Kim, W. H., Kwak, Y., Koh, J., Bae, J. M., Kim, K. M., ... *et* Cho, M. Y. (2017): Gastrointestinal Pathology Study Group of Korean Society of Pathologists, Molecular Pathology Study Group of Korean Society of Pathologists. Molecular Testing for Gastrointestinal Cancer. *Journal of pathology and translational medicine*, 51(2), 103-121.
- Lee, J. Y., Qing, X., Xiumin, W., Bai, Y., Sangah, C., So, H. B., ... *et* Myung-Ju, A. (2016): Longitudinal monitoring of EGFR mutation in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR-TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC 12-02). *Oncotarget*, 7(6), 6984–6993.
- Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. *et* Yaros, M. J. (1977): Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Research*, 37(3), 646.

- Li, H., *et* Durbin, R. (2009): Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.
- Li, H., Ruan, J., *et* Durbin, R. (2008): Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Research*, 18(11), 1851-1858.
- Li, M., Diehl, F., Dressman, D., Vogelstein, B., *et* Kinzler, K. W. (2006): BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nature Methods*, 3(2), 95–97.
- Lin, E. I., Tseng, L. H., Gocke, C. D., Reil, S., Le, D. T., Azad, N. S., *et* Eshleman, J. R. (2015): Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncotarget*, 6(39), 42334-44234.
- Lin, L., Huang, H. *et* Juan, H. (2012): Discovery of Biomarkers for Gastric Cancer: A Proteomics Approach. *Journal of Proteomics*, 75(11), 3081–3097.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., ... *et* Law, M. (2012): Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 7, 11 pages.
- Liu, Q., *et* Sommer, S. S. (2000): Pyrophosphorolysis-Activated Polymerization (PAP): Application to Allele-Specific Amplification. *BioTechniques*, 29(5), 1072–1083.
- Lord, Ch. J., *et* Ashworth, A. (2008): Targeted Therapy for Cancer Using PARP Inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(4), 363–369.
- Lovly, C., Horn, L., *et* Pao, W. (2015): EGFR in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). [online] [navštívené 10.4.2019] Dostupné z <https://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/egfr/>
- Lowy, D. R., *et* Collins, F. S. (2016): Aiming High--Changing the Trajectory for Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 374(20), 1901-1904.
- MacConaill, L. E., Burns, R. T., Nag, A., Coleman, H. A., Slevin, M. K., Giorda, K., ... *et* Thorner, A. R. (2018): Unique, dual-indexed sequencing adapters with UMIs effectively eliminate index cross-talk and significantly improve sensitivity of massively parallel sequencing. *BMC Genomics*, 19, 30.
- Madic, J., Piperno-Neumann, S., Servois, V., Rampanou, A., Milder, M., Trouiller, B., ... *et* Stern, M.-H. (2012): Pyrophosphorolysis-Activated Polymerization Detects Circulating Tumor DNA in Metastatic Uveal Melanoma. *Clinical Cancer Research*, 18(14), 3934–3941.
- MAGERI (2015): [online] [navštívené 20.12.2018] Dostupné z <https://mageri.readthedocs.io/en/latest/index.html>
- Masuda, T., Hayashi, N., Iguchi, T., Ito, S., Eguchi, H., *et* Mimori, K. (2016): Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer. *Molecular oncology*, 10(3), 408-417.
- McInerney, P., Adams, P. *et* Hadi, M. Z. (2014): Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Molecular Biology International*, vol. 2014, 1-8.
- McShane, L. M., Altman, D. G., Sauerbrei, W., Taube, S. E., Gion, M., *et* Clark, G. M. (2005): Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(16), 1180–1184.
- Mellai, M., Caldera, V., Annovazzi, L., *et* Schiffer, D. (2012): The Distribution and Significance of IDH Mutations in Gliomas. [online] [navštívené 9.4.2019] Dostupné z

<https://www.intechopen.com/books/evolution-of-the-molecular-biology-of-brain-tumors-and-the-therapeutic-implications/the-distribution-and-significance-of-idh-mutations-in-gliomas>

- Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C. A., Zentz, E. B., Leopold, S. R., Rico, A., ... *et* Karch, H. (2011): Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PloS one*, 6(7), e22751.
- Mok, T S., Wu, Y., Ahn, M., Garassino, M. C., Kim, H. R., Ramalingam, S. S., ... *et* Papadimitrakopoulou, V. A. (2017): Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 376(7), 629–640.
- Molenaar, R. J., Maciejewski, J. P., Wilmink, J. W., *et* Noorden, C. J. F. (2018): Wild- Type and Mutated IDH1/2 Enzymes and Therapy Responses. *Oncogene*, 37(15), 1949–1960.
- Morales, J., Li, L., Fattah, F. J., Dong, Y., Bey, E. A., Patel, M., Gao, J., ... *et* Boothman, D. A. (2014): Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 24(1), 15-28.
- Nagahashi, M., Shimada, Y., Ichikawa, H., Kameyama, H., Takabe, K., Okuda, S., *et* Wakai, T. (2018): Next generation sequencing-based gene panel tests for the management of solid tumors. *Cancer science*, 110(1), 6-15.
- Najie, S., Zhong, X., *et* Li, Q. (2014): Real-Time Bidirectional Pyrophosphorolysis-Activated Polymerization for Quantitative Detection of Somatic Mutations. *PLOS ONE*, 9(4), 1–9.
- Narayan, A., Carriero, N. J., Gettinger, S. N., Kluytenaar, J., Kozak, K. R., Yock, T. I., ... *et* Patel, A. A. (2012): Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing. *Cancer Research*, 72(14), 3492-3498.
- National Cancer Institute: NCI Dictionary of Cancer Terms (2018): [online] [navštívené 28.1.2019] Dostupné z <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker?redirect=true>
- New England BioLabs®: Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (2018): [online] [navštívené 6.5.2019] Dostupné z https://www.neb.com/-/media/nebus/files/brochures/q5_trifold.pdf
- Newman, A. M., Bratman, S. V., To, J., Wynne, J. F., Eclov, N. C., Modlin, L. A., ... *et* Diehn, M. (2014): An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine*, 20(5), 548-554.
- Pearson W. R. (2016): Finding Protein and Nucleotide Similarities with FASTA. *Current protocols in bioinformatics*, 53, 3.9.1-25.
- Peltomaki P. (2003): Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(6), 1174-1179.
- Pohl, G., *et* Shih, I.-M. (2004): Principle and applications of digital PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4(1), 41–47.
- Pritchard, C. C., Smith, C., Salipante, S. J., Lee, M. K., Thornton, A. M., Nord, A. S., ... *et* Walsh, T. (2012): ColoSeq provides comprehensive lynch and polyposis syndrome mutational analysis using massively parallel sequencing. *The Journal of molecular diagnostics*, 14(4), 357-366.

- Pusch, S., Sahm, F., Meyer, J., Mittelbronn, M., Hartmann, C., *et* von Deimling, A. (2011): Glioma IDH1 mutation patterns off the beaten track. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37(4), 428-430.
- QIAGEN: QIAxcel Advanced User Manual (2017b): [online] [navštivené 21.4.2019] Dostupné z <https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=e3edf734-1e5a-4ebf-957e-a35e120d6290&lang=en>
- QIAGEN: QIAseq™ Targeted DNA Panel Handbook (2017a): [online] [navštivené 14.4.2019] Dostupné z <https://www.qiagen.com/jp/resources/resourcedetail?id=8907edbe-a462-4883-ae1b-2759657e7fd0&lang=en>
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., ... *et* Gu, Y. (2012): A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, 13, 341.
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., ... *et* Gu, Y. (2012): A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, 13.
- Reitman, Z. J., *et* Yan, H. (2010): Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(13), 932-41.
- Reuter, J. A., Spacek, D. V., *et* Snyder, M. P. (2015): High-throughput sequencing technologies. *Molecular Cell*, 58(4), 586–597.
- Richardson, A. L., *et* Iglehart, J. D. (2012): BEAMing up personalized medicine: mutation detection in blood. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(12), 3209-11
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., *et* Mesirov, J. P. (2011): Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, 29(1), 24-26.
- Sanger, F., Nicklen, S., *et* Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Sargent, D.J., Marsoni, S., Monges, G., Thibodeau, S. N., Labianca, R., Hamilton, S.R., ... *et* Gallinger S. (2010): Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based ad–juvant therapy in colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(30), 3219-3226.
- Sawyers, Ch. L. (2002): Rational therapeutic intervention in cancer: kinases as drug targets. *Current Opinion in Genetics and Development*. 12(1), 111-115.
- Sequist, L. V., Soria, J., Goldman, J. W., Wakelee, H. A., Gadgeel, S. M., Varga, A., ... *et* Camidge, D. R. (2015): Rociletinib in EGFR-Mutated Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(18), 1700–1709.
- Serrati, S., De Summa, S., Pilato, B., Petriella, D., Lacalamita, R., Tommasi, S., *et* Pinto, R. (2016): Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. *OncoTargets and therapy*, 9, 7355–7365.

- Sharma, V., Bell, D., Settleman, J., *et* Haber, D. (2007): Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(3), 169-181.
- Shen, Z. (2013): Cancer biomarkers and targeted therapies. *Cell and Bioscience*, 3(1), 6.
- Shugay, M., Zaretsky, A. R., Shagin, D. A., Shagina, I. A., Volchenkov, I. A., Shelenkov, A. A., ... *et* Chudakov, D. (2017): MAGERI: Computational pipeline for molecular-barcoded targeted resequencing. *PLoS Computational Biology*, 13(5), e1005480.
- Schmitt, M. W., Kennedy, S. R., Salk, J. J., Fox, E. J., Hiatt, J. B., *et* Loeb, L. A. (2012): Detection of ultra-rare mutations by next-generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), 14508-14513.
- Siqueira, J. F., Fouad, A. F., *et* Rôças, I. N. (2012): Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of oral microbiology*, 4, 10.3402/jom.v4i0.10743.
- Sint, D., Raso, L. *et* Traugott, M. (2012): Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(5), 898-905.
- Song, N., Zhong, X., *et* Li, Q. (2014): Real-time bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization for quantitative detection of somatic mutations. *PLoS One*, 9(4), e96420.
- Sorenson, G. D., Pribish, D. M., Valone, F. H., Memoli, V. A., Bzik, D. J., *et* Yao, S. L. (1994): Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 3(1), 67-71.
- Soukupova, J., Zemankova, P., Lhotova, K., Janatova, M., Borecka, M., Stolarova, L., ... Kleibl, Z. (2018): Validation of CZECA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PloS one*, 13(4), e0195761.
- Ståhlberg, A., Krzyzanowski, P. M., Jackson, J. B., Egyud, M., Stein, L., *et* Godfrey, T. E. (2016): Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing. *Nucleic acids research*, 44(11), e105.
- Stroun, M., Anker, P., Lvautey, J., Lederrey, C. *et* Maurice, P. A. (1987): Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 23(6), 707-712.
- Takai, E. *et* Yachida, S. (2016): Circulating tumor DNA as a liquid biopsy target for detection of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(38), 8480-8488.
- Tan, C., *et* Du, X. (2012): KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 18(37), 5171-80.
- Tikhonova, I. A., Huxley, N., Snowsill, T., Crathorne, L., Varley-Campbell, J., Napier, M., *et* Hoyle, M. (2018): Economic Analysis of First-Line Treatment with Cetuximab or Panitumumab for RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer in England. *Pharmacoeconomics*, 36(7), 837–851.
- Tutt, A., Robson, M., Garber, J. E., Domchek, S., Audeh, M. W., Weitzel, J. N., Friedlander, M., *et* Carmichael, J. (2009): Phase II Trial of the Oral PARP Inhibitor Olaparib in BRCA-Deficient Advanced Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(18), CRA501–CRA501.
- Ullrich, A., *et* Schlessinger, J. (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61(2), 203-212.

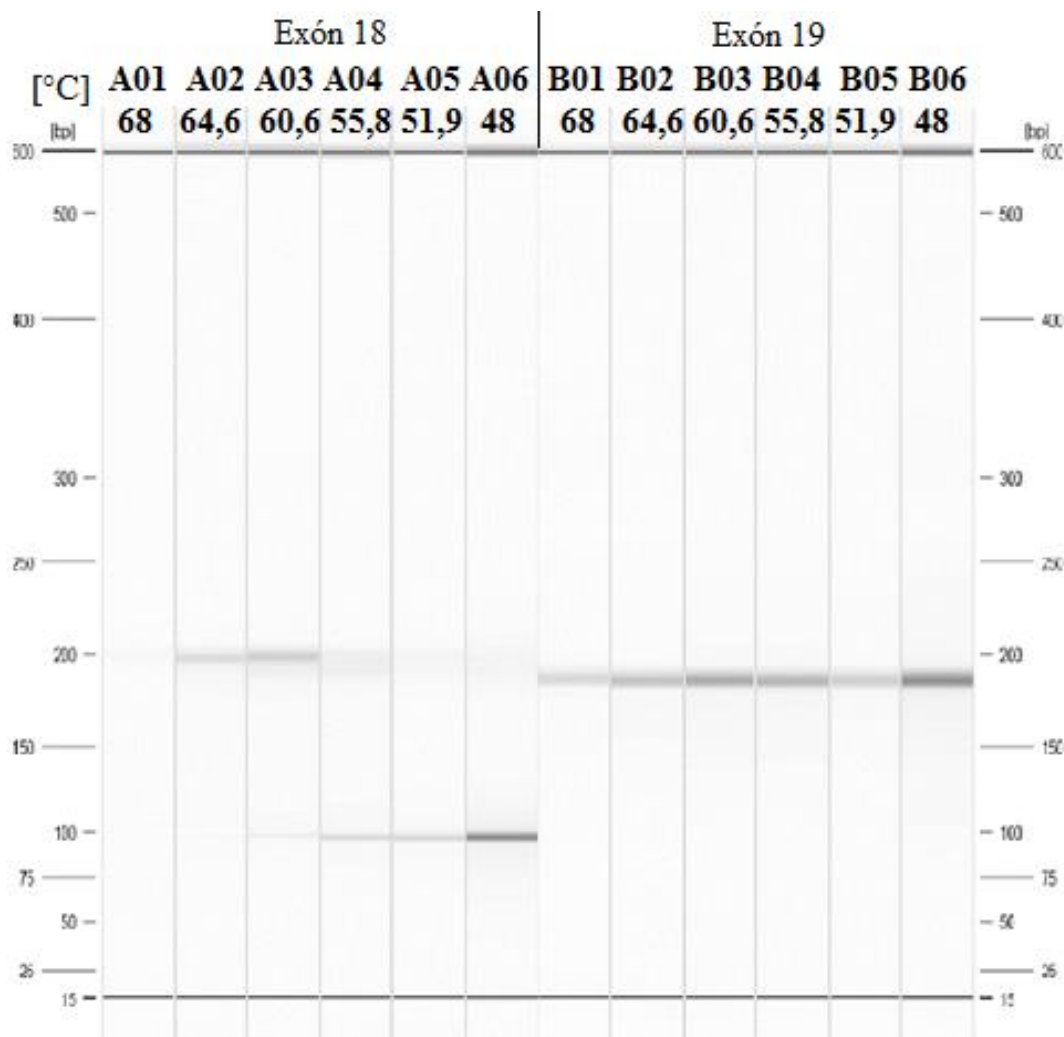
- UnitedHealthcare®. (2019): Whole exome and whole genome sequencing. [online] [navštívené 12.4.2019] Dostupné z <https://www.uhcprovider.com/content/dam/provider/docs/public/policies/signaturevalue-mmng/whole-exome-whole-genome-sequencing-sv.pdf>
- Vallée, M. P., Francy, T. C., Judkins, M. K., Babikyan, D., Lesueur, F., Gammon, A., ... *et* Tavtigian, S. V. (2012): Classification of Missense Substitutions in the BRCA Genes: A Database Dedicated to Ex-UVs. *Human Mutation*, 33(1), 22–28.
- Vasioukhin, V., Anker, P., Maurice, P., Lyutey, J., Lederrey, C., *et* Stroun, M. (1994): Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology*, 86(4), 774-779.
- Venkitaraman, A. R. (2002): Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), 171–82.
- Verdaguer, H., Saurí, T., *et* Macarulla, T. (2017): Predictive and prognostic biomarkers in personalized gastrointestinal cancer treatment. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8(3), 405-417.
- Vermeulen, J., Derveaux, S., Lefever, S., De Smet, E., De Preter, K., Yigit, N., De Paepe, A., Pattyn, F., Speleman, F., ... *et* Vandesompele, J. (2009): RNA pre-amplification enables large-scale RT-qPCR gene-expression studies on limiting sample amounts. *BMC research notes*, 2, 235.
- Vogenberg, F. R., Isaacson Barash, C. *et* Pursel, M. (2010): Personalized medicine: part 1: evolution and development into theranostics. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 35(10), 560–576.
- Vogelstein, B., *et* Kinzler, K. W. (1999): Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9236-41.
- Vollbrecht, C., Lehmann, A., Lenze, D., *et* Hummel, M. (2018): Validation and comparison of two NGS assays for the detection of EGFR T790M resistance mutation in liquid biopsies of NSCLC patients. *Oncotarget*, 9(26), 18529–18539.
- Wang, S., Song, Y., *et* Liu, D. (2017): EAI045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance. *Cancer Letters*, 385, 51–54.
- Wang, S., Tsui, S. T., Liu, C., Song, Y. *et* Liu, D. (2016): EGFR C797S Mutation Mediates Resistance to Third-Generation Inhibitors in T790M-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Hematology and Oncology*, 9(1), 59.
- Wee, P., *et* Wang, Z. (2017): Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, 9(5), 52.
- Wee, S., Jagani, Z., Xiang, K. X., Loo, A., Dorsch, M., Yao, Y. M., ... *et* Stegmeier, F. (2009): PI3K pathway activation mediates resistance to MEK inhibitors in KRAS mutant cancers. *Cancer Research*, 69(10), 4286–4293.
- Whale, A. S., Cowen, S., Foy, C. A., *et* Huggett, J. F. (2013): Methods for applying accurate digital PCR analysis on low copy DNA samples. *PloS one*, 8(3), e58177.
- Wheeler, D. A., *et* Wang L. (2013): From human genome to cancer genome: the first decade. *Genome Research*, 23(7), 1054-1062.

- Wooster, R., *et* Weber, B. L. (2003): Breast and Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(23),2339–47.
- Xu, Ch. (2018): A review of somatic single nucleotide variant calling algorithms for next-generation sequencing data, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 15-24.
- Yang, H., Ye, D., Guan, K. L., *et* Xiong, Y. (2012): IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(20), 5562-71.
- Yarden, Y., *et* Schlessinger, J. (1987): Epidermal growth factor induces rapid reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry*, 26(5), 1443-1451.
- Yasuda, H., Park, E., Yun, CH., Sng, N. J., Lucena-Araujo, A. R., Yeo, W. L., ... *et* Costa, D. B. (2013): Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Science Translational Medicine*, 5(216), 216ra177.
- Yung, T. K. F., Chan, K. C. A., Mok, T. S. K., Tong, J., To, K.-F., *et* Lo, Y. M. D. (2009): Single-Molecule Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Plasma by Microfluidics Digital PCR in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 15(6), 2076–2084.
- Zhang, B., Penton, C. R., Xue, C., Wang, Q., Zheng, T., *et* Tiedje, J. M. (2015): Evaluation of the Ion Torrent Personal Genome Machine for Gene-Targeted Studies Using Amplicons of the Nitrogenase Gene *nifH*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4536-4545.
- Zhang, W. (2015): BRAF Inhibitors: The Current and the Future. *Current Opinion in Pharmacology*, 23, 68–73.
- Zhang, Y. C., Zhou, Q. *et* Wu, Y. L. (2017): The emerging roles of NGS-based liquid biopsy in non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 167.
- Zhenbin, Ch., Feng, J., Buzin, C. H., Liu, Q., Weiss, L., Kernstine, K., Somlo, G., *et* Sommer, S. S. (2009): Analysis of Cancer Mutation Signatures in Blood by a Novel Ultra-Sensitive Assay: Monitoring of Therapy or Recurrence in Non-Metastatic Breast Cancer. *PLOS ONE*, 4(9), 1–14.
- Zhou, X., Ren L., Meng Q., Li Y., *et* Yu Y. (2010): The next-generation sequencing technology and application. *Protein*, 1(6), 520-536.

9 PRÍLOHY

Príloha 1

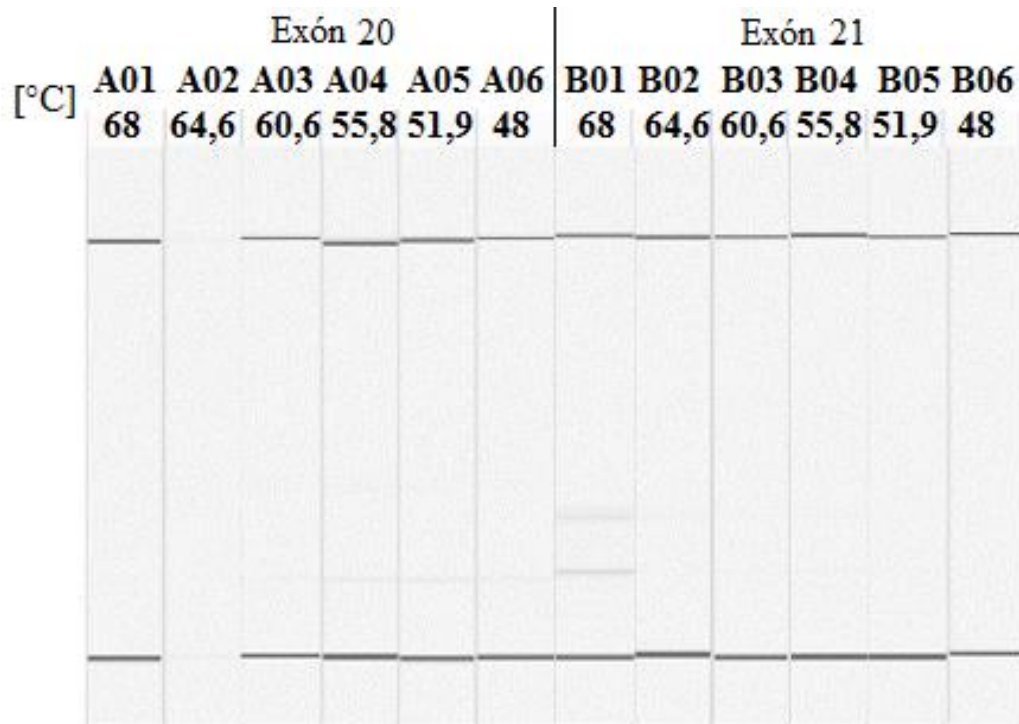
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre ciele oblasti exónov 18 a 19 *EGFR*



Legenda: **A01–A06** (exón 18 *EGFR*), **B01–B06** (exón 19 *EGFR*) - vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre ciele oblasti exónov 18, 19 *EGFR*.

Príloha 2

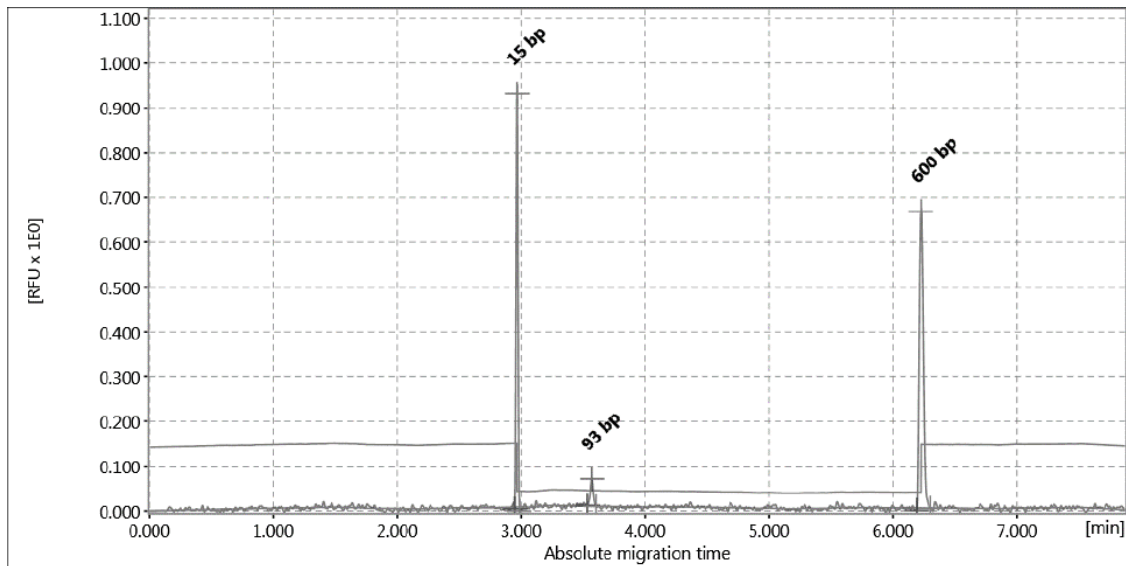
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre ciele oblasti exónov 20 a 21 *EGFR*



Legenda: **A01–A06** (exón 20 *EGFR*), **B01–B06** (exón 21 *EGFR*) - vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre ciele oblasti exónov 20, 21 *EGFR*.

Príloha 3

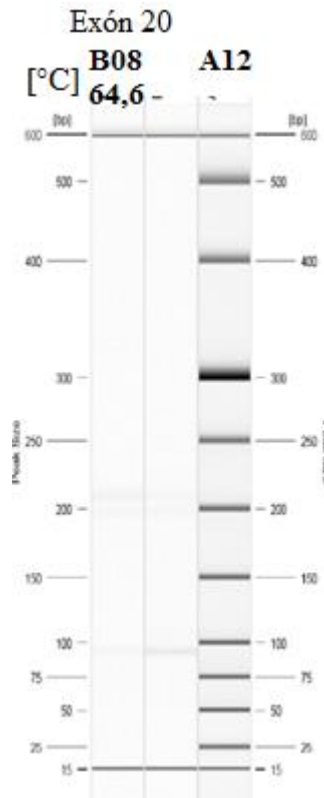
Separované fragmenty vzorky amplifikovanej pri teplote 1. annealingu 68 °C v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieleňú oblasť exónu 20 *EGFR*



Legenda: **15–600 bp** – fragmenty Alignment markru, **93 bp** – fragment nešpecifického produktu PCR s použitím primerov pre cieleňú oblasť exónu 20 *EGFR*.

Príloha 4

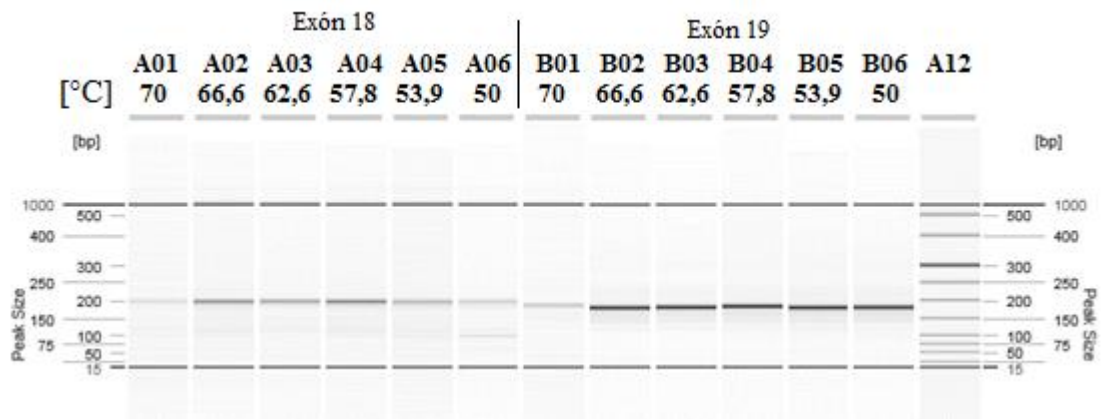
Separované fragmenty vzorky amplifikovanej pri teplote 1. annealingu 64,6 °C v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľnú oblasť exónu 20 *EGFR*



Legenda: **B08** - vzorka amplifikovaná pri teplote 1. annealingu 64,6 °C v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľnú oblasť exónu 20 *EGFR*. **A12** – marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).

Príloha 5

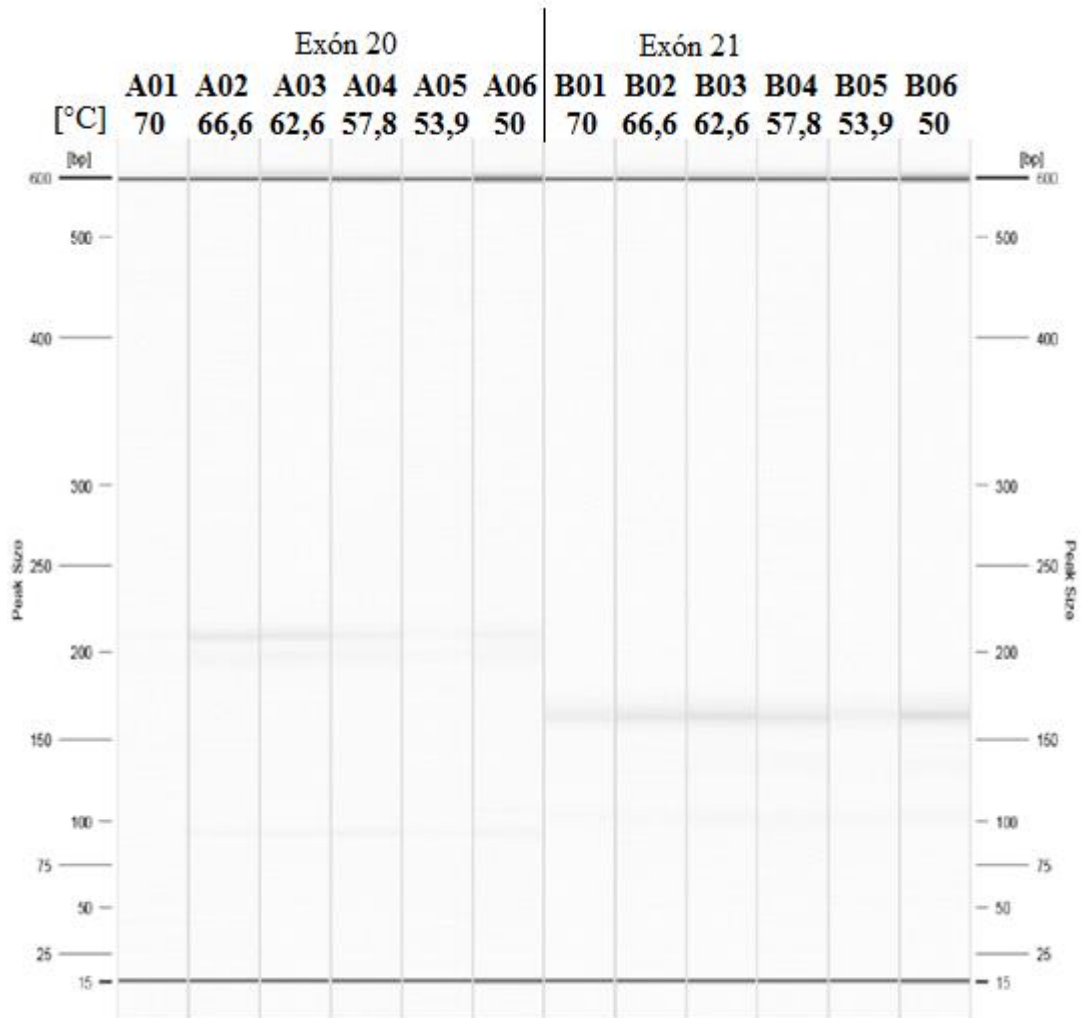
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu 2. annealingu v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre ciele oblasti exónov 18 a 19 *EGFR*



Legenda: **A01–A06** (exón 18 *EGFR*), **B01–B06** (exón 19 *EGFR*) - vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 2. annealingu v PCR s použitím s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy primerov pre ciele oblasti exónu 18, 19 *EGFR*. **A12** – marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).

Príloha 6

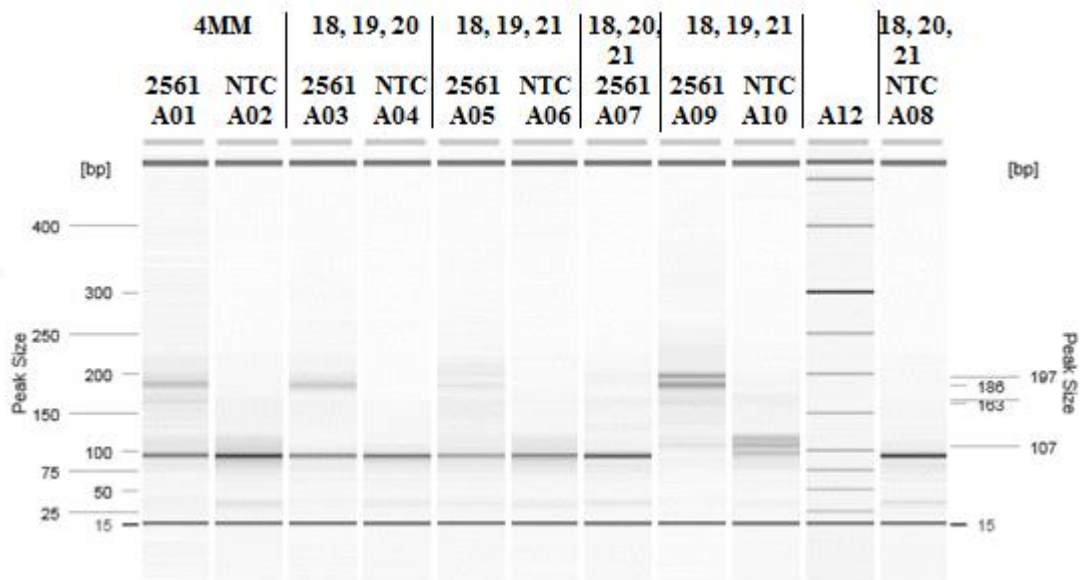
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu 2. annealingu v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľené oblasti exónov 20 a 21 *EGFR*



Legenda: **A01–A06** (exón 20 *EGFR*), **B01–B06** (exón 21 *EGFR*) - vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 2. annealingu v PCR s použitím s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy primerov pre cieľený úsek exónu 20, 21 *EGFR*.

Príloha 7

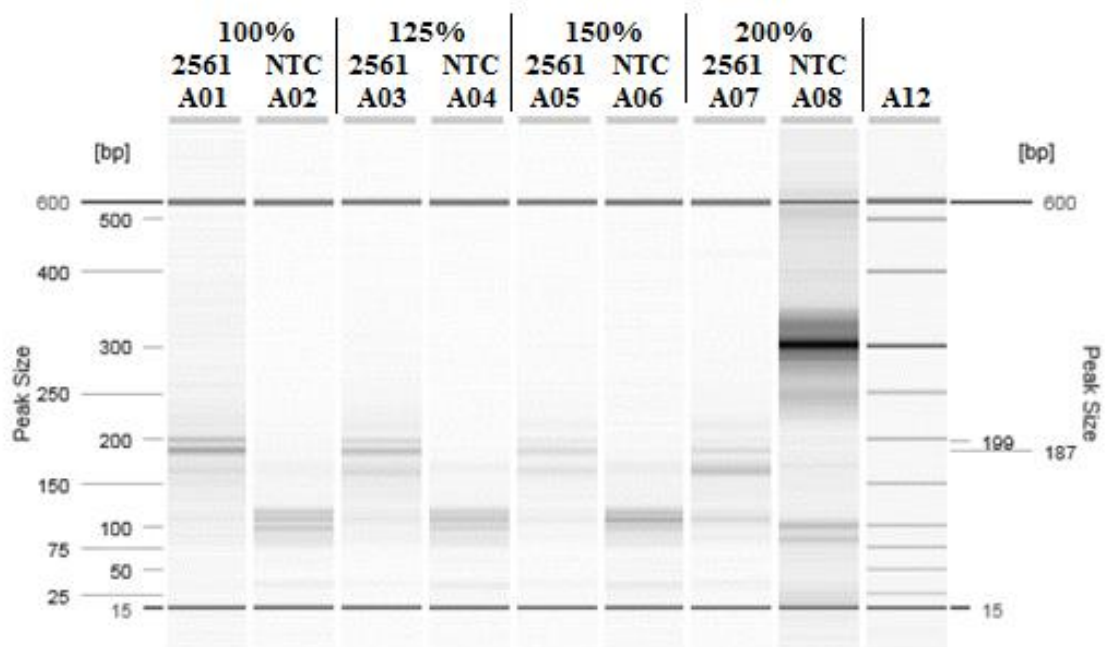
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných multiplexovej a triplexovej PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre ciele oblasti exónov 18, 19, 20 a 21 *EGFR*



Legenda: **4MM** – vzorka amplifikovaná s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre exóny 18, 19, 20, 21 *EGFR*. **MM 18, 19, 20** – vzorka amplifikovaná s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre exóny 18, 19, 20 *EGFR*. **MM 19, 20, 21** – vzorka amplifikovaná s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre exóny 19, 20, 21 *EGFR*. **MM 18, 20, 21** – vzorka amplifikovaná s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre exóny 18, 20, 21 *EGFR*. **MM 18, 19, 21** – vzorka amplifikovaná s použitím mastermixu, ktorý obsahoval primery pre exóny 18, 19, 21 *EGFR*. **NTC** – negatívna kontrola. **2561** – na amplifikáciu bola použitá vzorka DNA nariadená na koncentráciu 50 ng/μl. **A12** – marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).

Príloha 8

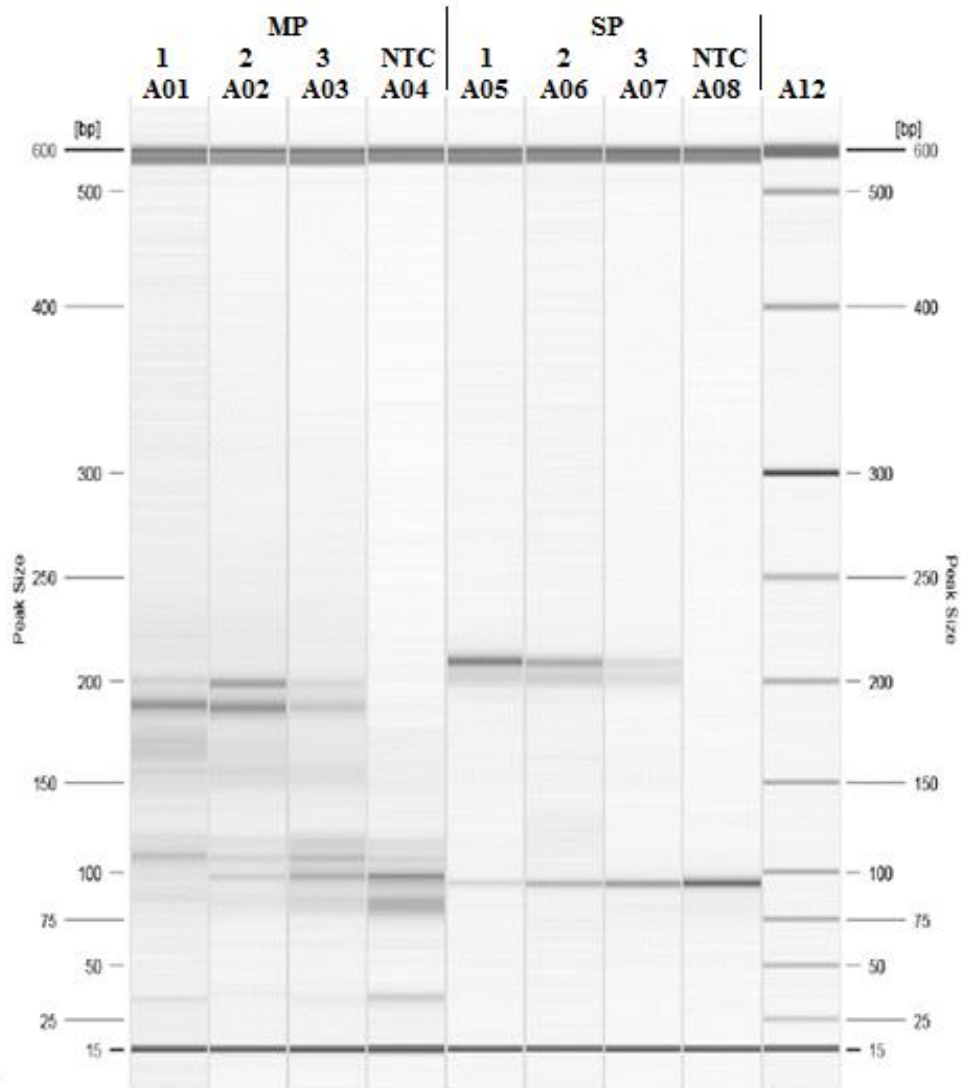
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých koncentráciách primerov pre amplifikáciu cieľovej oblasti exónu 21 v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a primerov pre cieľové oblasti exónov 18, 19 a 21 *EGFR*



Legenda: **A01–A08** – vzorky amplifikované pri jednotlivých koncentráciách primerov pre amplifikáciu cieľovej oblasti exónu 21 *EGFR* v PCR s použitím s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy. **A12** – marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).

Príloha 9

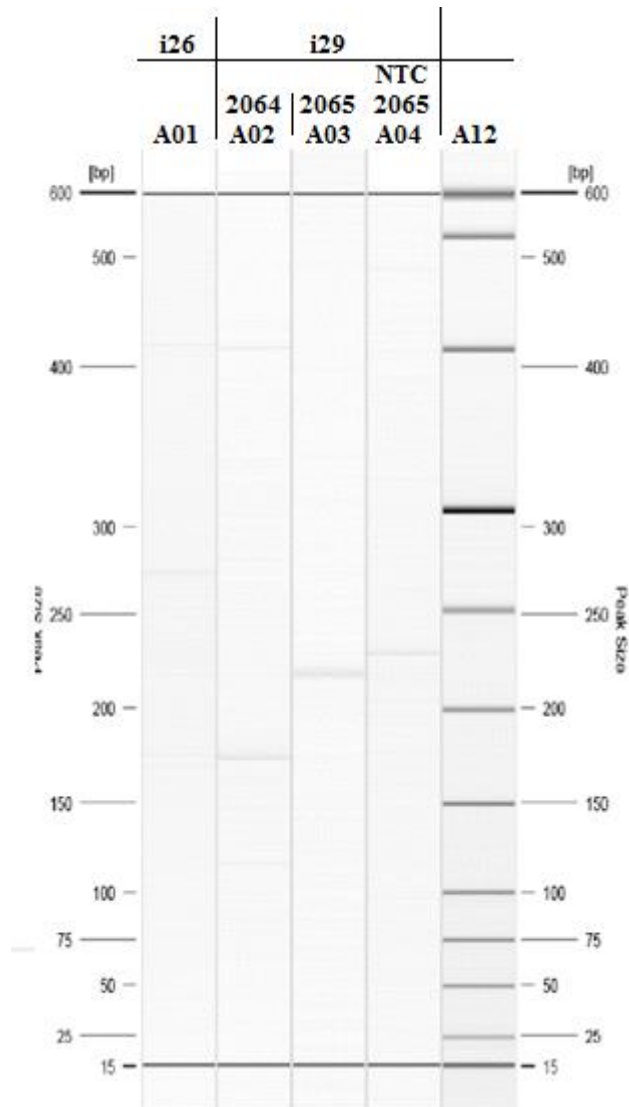
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných v multiplexovej a singleplexovej PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a rôznych koncentrácií DNA s použitím primerov pre ciele oblasti exónov 18, 19, 20 a 21 *EGFR*



Legenda: **MP** - reakčná zmes použitá pri PCR obsahovala primery pre ciele oblasti exónov 18, 19 a 21 *EGFR*. **SP** - reakčná zmes použitá pri PCR obsahovala primery pre ciele oblasti exónu 20 *EGFR*. **NTC** - negatívna kontrola pre jednotlivé varianty reakčnej zmesi. Jednotlivé čísla vzoriek vid' **Tabuľka 19**. **A12** - marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).

Príloha 10

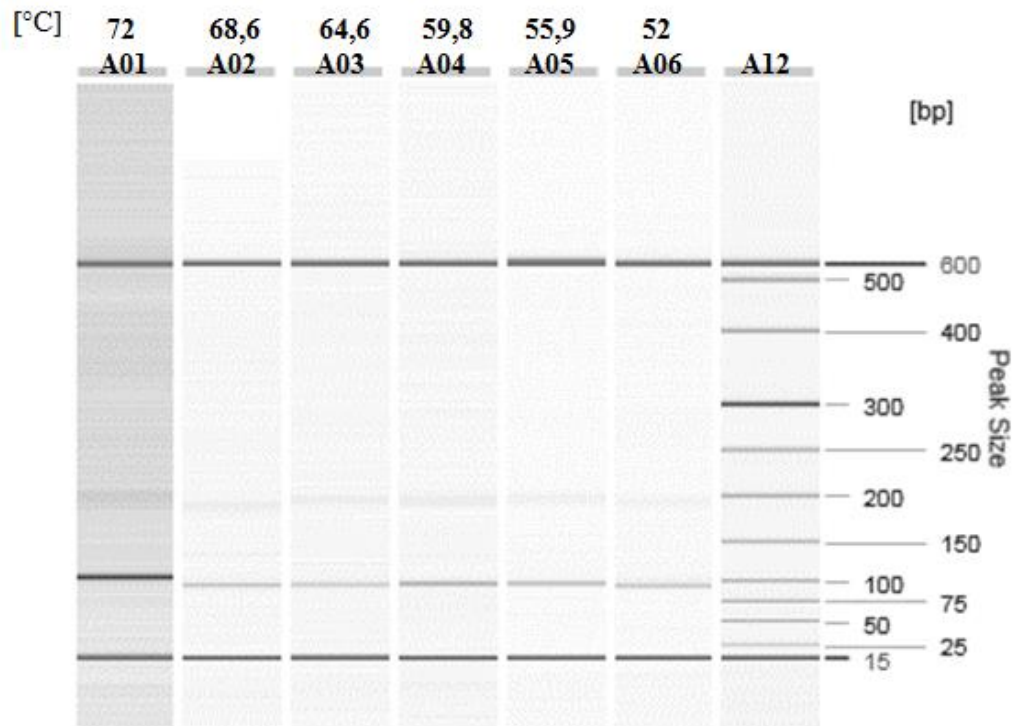
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných v PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a rôznych primerových párov pre cieľnú oblasť exónu 20 *EGFR*



Legenda: **A01** – v PCR použité primery 1848 a 1858. **A02** - v PCR použité primery 2064 a 2066. **A03** – v PCR použité primery 2065 a 2066. **A04** – negatívna kontrola s primerami 2065 a 2066. **A12** – marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).

Príloha 11

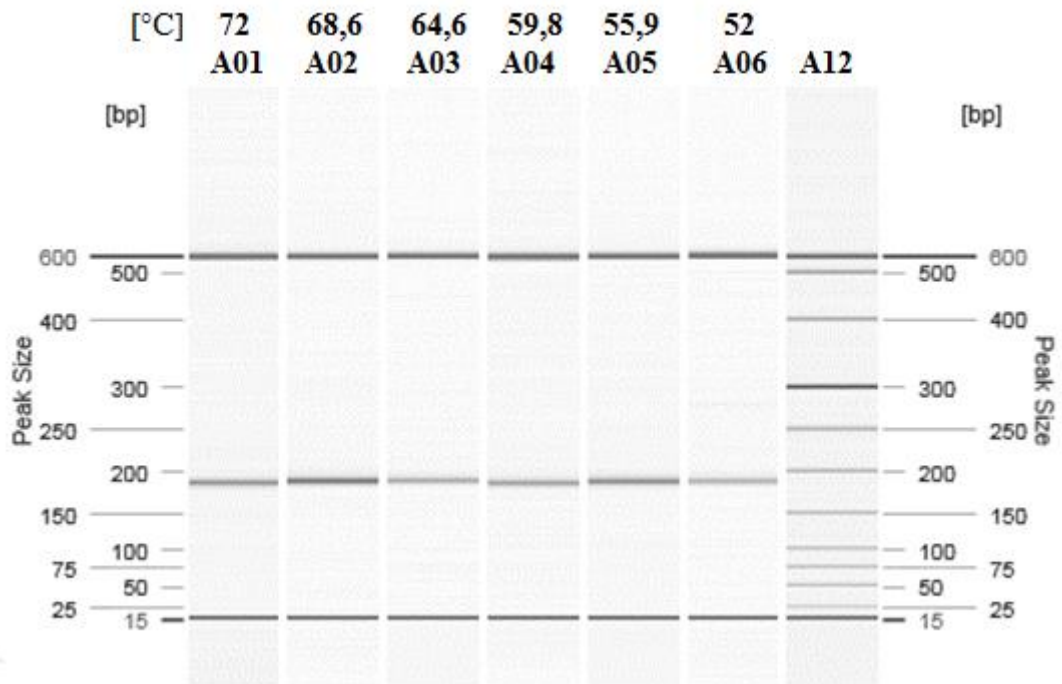
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy a primerov pre cielený úsek exónu 18 *EGFR*



Legenda: **A01–A06** – vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy s použitím primerov pre cielený úsek exónu 18 *EGFR*. **A12** – marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).

Príloha 12

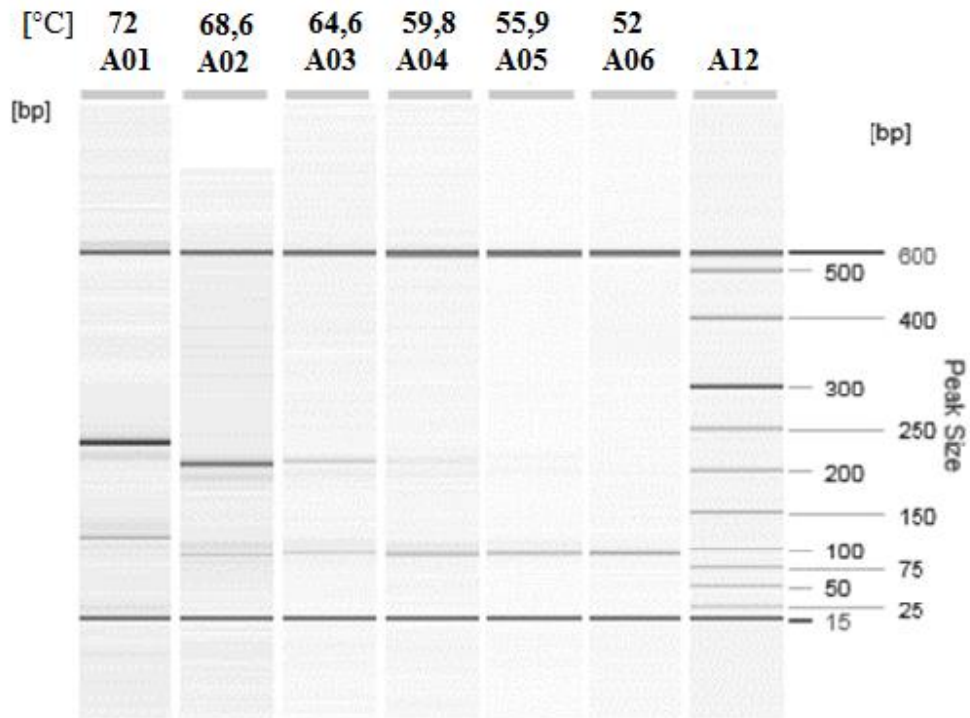
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy a primerov pre cielený úsek exónu 19 *EGFR*



Legenda: **A01–A06** – vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy s použitím primerov pre cielený úsek exónu 19 *EGFR*. **A12** – marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).

Príloha 13

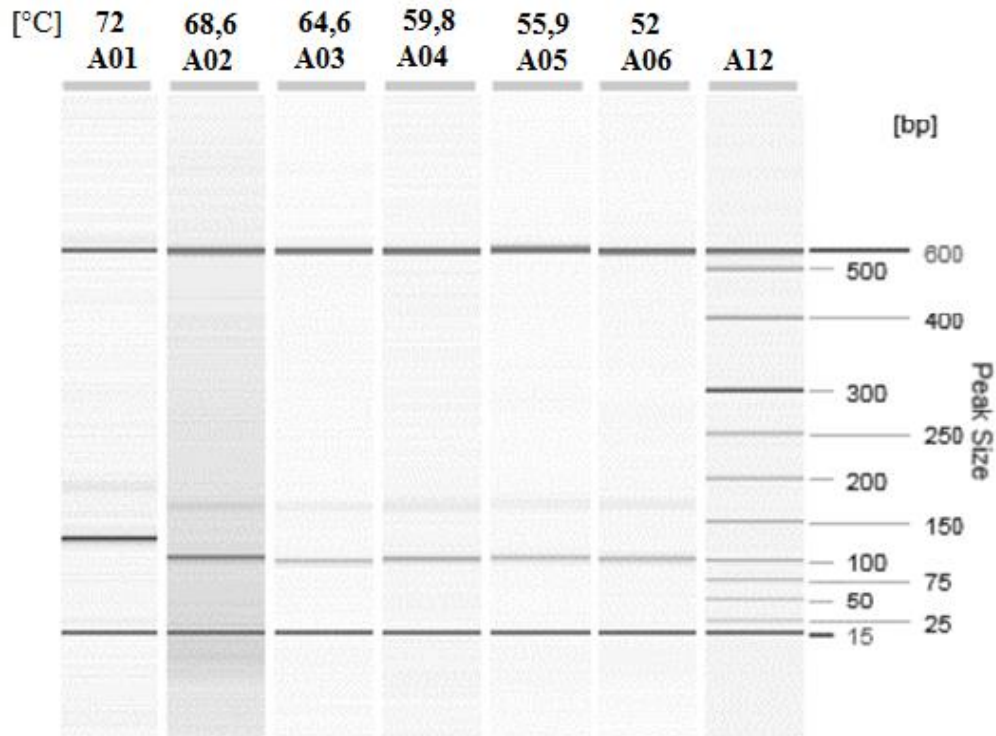
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy a primerov pre cielený úsek exónu 20 *EGFR*



Legenda: **A01–A06** – vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy s použitím primerov pre cielený úsek exónu 20 *EGFR*. **A12** – marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).

Príloha 14

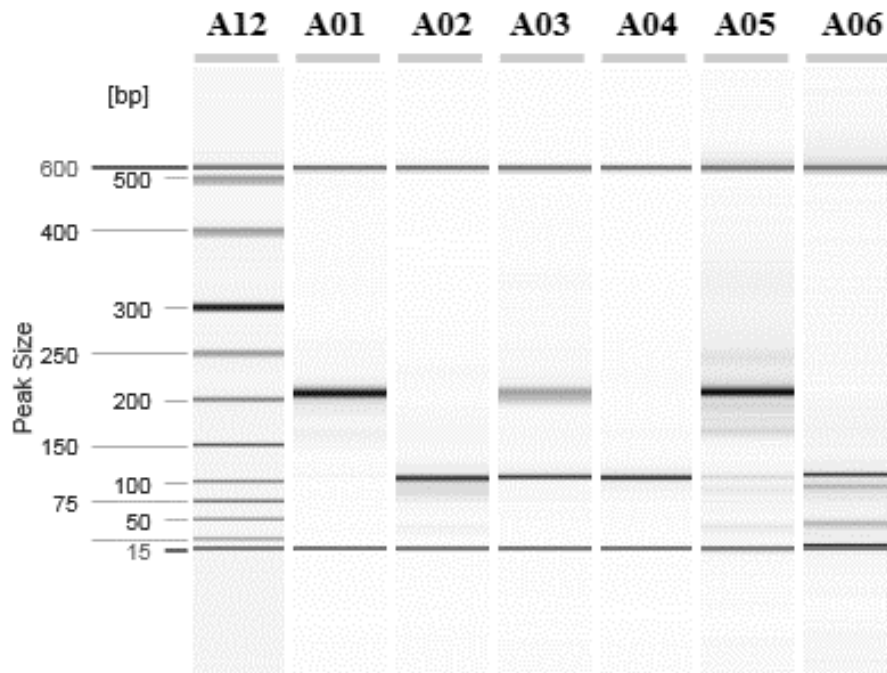
Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy a primerov pre cielený úsek exónu 21 *EGFR*



Legenda: **B2–B8** – vzorky amplifikované pri jednotlivých teplotách gradientu 1. annealingu v PCR s použitím Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy s použitím primerov pre cielený úsek exónu 21 *EGFR*. **A12** – marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).

Príloha 15

Separované fragmenty vzoriek amplifikovaných pomocou PCR s použitím polymeráz GoTaq® MDx Hot Start, Takara Ex Taq HS a FastStart™ High Fidelity PCR systému a primerov pre cielený úsek exónu 18 EGFR



Legenda: **A01** – vzorka s PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy a vzorky DNA (20 ng/μl). **A02** – vzorka s PCR s použitím GoTaq® MDx Hot Start polymerázy (negatívna kontrola). **A03** – vzorka s PCR s použitím *Takara Ex Taq* HS polymerázy a vzorky DNA (20 ng/μl). **A04** – vzorka s PCR s použitím *Takara Ex Taq* HS polymerázy (negatívna kontrola). **A05** – vzorka s PCR s použitím FastStart™ High Fidelity PCR systému a vzorky DNA (20 ng/μl). **A06** – vzorka s PCR s použitím FastStart™ High Fidelity PCR systému (negatívna kontrola). **A12** – marker relatívnej molekulovej hmotnosti (25–500 bp).