

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Klára Brožová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Optimalizace long-range PCR u pacientů
s hereditárními nádory.**

Bakalářská práce

Klára Brožová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Mária Janíková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů a pod vedením Mgr. Márie Janíkové, Ph.D.

V Olomouci.....

Podpis:.....

SOUHRN

Medicína zaměřena na onkologickou problematiku se v současnosti velice intenzivně vyvíjí, a to jak v oblasti diagnostické, tak v oblasti léčebné a preventivní. Do všech těchto oblastí zasahuje se svými stále většími možnostmi genetika. Ve své práci jsem se zabývala především specifickou podoblastí onkologie, a sice hereditárními nádory. Zaměřila jsem se na hereditární nádorové syndromy, především na hereditární karcinom prsu a ovarií. Pro nastavení účinné léčby pacientů jsou v oblasti genetiky zcela zásadní poznatky o struktuře a funkci genů *BRCA1* a *BRCA2*, jejich mutacích a také rutinních metodách vyšetřování těchto genů, jako jsou například detekce velkých přestaveb genů *BRCA1/2* pomocí polymerázové řetězové reakce dlouhých úseků (long-range PCR; LR-PCR).

Pro amplifikaci vybraných ampliconů *BRCA1/2* genů je velice důležité stanovení optimální teploty potřebné pro správné nasednutí primerů (T_a) v rámci LR-PCR. V této práci byla stanovena optimální T_a při LR-PCR pro 4 z 5 (80%) testovaných párů primerů genů *BRCA1/2* o délce PCR produktů od 5 778 do 14 010 bp při použití QIAGEN LongRange PCR Kitu. Po ověření těchto výsledků bude možno začlenit metodu LR-PCR do rutinního vyšetřování genů *BRCA1/2*.

SUMMARY

Medicine focused on oncology issues is currently developed very strongly, both in the area of diagnostics and in the therapeutic and preventive area. In all these areas, genetics is interfering with its ever-growing potential. In my work, I dealt primarily with a specific subgroup of oncology, namely hereditary tumors. I focused on hereditary cancer syndromes, especially on hereditary breast and ovarian cancer. In the field of genetics, knowledge about the structure and function of the *BRCA1* and *BRCA2* genes, their mutations, and also routine methods of investigation of these genes, such as the detection of large *BRCA1/2* gene transformations using the long-range polymerase chain reaction (LR-PCR), are essential for the purpose of setting effective treatment for patients.

For the amplification of selected *BRCA1/2* gene amplicons, it is very important to determine the optimal temperature required for proper primer annealing (T_a) during LR-PCR.

In this work, an optimal T_a was determined by the LR-PCR using the QIAGEN LongRange PCR Kit for 4 out of 5 (80%) tested primer pairs of *BRCA1/2* genes with the length of PCR product in the range of 5 778 to 14 010 bp. After verification of these results, it will be possible to incorporate the LR-PCR method into the routine investigation of *BRCA1/2* genes.

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Márii Janíkové, Ph.D. nejen za odborné rady a materiály, které mi poskytla při zpracování teoretické i experimentální části této bakalářské práce, ale i za ochotu a čas, který mi věnovala.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Co je to nádor	3
3.2	Rozdíly mezi sporadickými a hereditárními nádory	3
3.3	Hereditární nádorové syndromy	4
3.4	Hereditární karcinom prsu a ovarií	8
3.5	Struktura a funkce BRCA1 a BRCA2	11
3.6	Možnosti inaktivace BRCA1 a BRCA2	12
3.7	Rutinní metody vyšetřování genů <i>BRCA1</i> a <i>BRCA2</i>	14
3.8	Detekce velkých přestaveb genů <i>BRCA1/2</i> pomocí metody LR-PCR	19
3.9	Princip LR-PCR	20
3.10	Význam vyšetření hereditárních nádorových syndromů	21
4	Materiál a metody	23
4.1	Biologický materiál	23
4.2	Použité chemikálie, roztoky a soupravy	23
4.3	Použité laboratorní přístroje	25
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	26
4.4.1	Izolace DNA Millerovou metodou	26
4.4.2	PCR amplifikace genomické DNA	27
4.4.3	Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace	32
5	Výsledky	33
6	Diskuze	36
7	Závěr	38
8	Literatura	39

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	Adenin
<i>ATM</i>	“Ataxia telangiectasia mutated“
BARD1	“BRCA1-associated RING domain protein 1”
bp	Pár bází
<i>BRCA1</i>	“Breast cancer gene 1“
<i>BRCA2</i>	“Breast cancer gene 2“
<i>BRIP1</i>	“BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1“
BSA	albumin z bovinního séra
C	Cytosin
<i>CDH1</i>	“Cadherin 1 gene“
cDNA	Komplementární DNA
CZECANCA	“Czech cancer panel for clinical application“
<i>CHEK2</i>	“Checkpoint kinase 2 gene“
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosin trifosfát
ddCTP	2',3'-Dideoxycitidin trifosfát
ddGTP	2',3'-Dideoxyguanosin trifosfát
ddTTP	2',3'-Dideoxytimidin trifosfát
dNTP	Deoxynukleotidtrifosfát
ddNTP	Dideoxynukleotidtrifosfát
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
ESMO	Evropská společnost pro lékařskou onkologii
FAP	Familiární adenomatózní polypóza
G	Guanin
HBOC	Hereditární karcinom prsu a ovarií
HGMD	“Human gene mutation database“
HNPCC	Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
kb	Kilobáze
LFS	Li-Fraumeni syndrom
LOH	Ztráta heterozygotnosti
LR-PCR	Long-range PCR
<i>MLH1</i>	“mutL homolog 1 gene“
MLPA	“Multiplex ligation-dependent probe amplification“
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MSH2/6	“mutS homolog 2/6“
NCCN	Národní centrum pro výzkum rakoviny
NGS	Sekvencování nové generace
NMR	Nukleární magnetická rezonance
<i>PALB2</i>	“Partner and localizer of BRCA2 gene“

PCR	Polymerázová řetězová reakce
<i>RBI</i>	“Retinoblastoma gene“
RING	Motiv zinkového prstu (zinc-finger domain)
RNA	Ribonukleová kyselina
T	Thymin
TP53	Tumor protein 53

Seznam uvedených obrázků a tabulek

Obrázky

Obrázek 1: Typy poškození DNA, typ reparace a opravné enzymy.....	8
Obrázek 2: Schematické znázornění lokalizace genu <i>BRCA1</i> na chromozomu 17.....	11
Obrázek 3: Schematické znázornění lokalizace genu <i>BRCA2</i> na chromozomu 13.....	11
Obrázek 4: a) Funkční domény proteinu BRCA1. b) Funkční domény proteinu BRCA2.	12
Obrázek 5: Příklad elektroforeogramu ze sekvenace genu <i>BRCA1</i> metodou dle Sangera.	15
Obrázek 6: Princip MLPA metody.	18
Obrázek 7: Elektroforeogram testovaného vzorku genů <i>MSH2/MLH1</i> v porovnání s profilem referenčního vzorku.	18
Obrázek 8: Výsledný elektroforeogram první LR-PCR. a) Legenda ke Quick-load 1 kb extend DNA ladder. b) Výsledný elektroforeogram PCR produktů 5 vzorků za použití 5 párů primerů bez přidání Q-solution.....	33
Obrázek 9: Výsledný elektroforeogram PCR produktů 12 vzorků za použití 4 párů primerů bez přidání Q-solution.....	34
Obrázek 10: Výsledný elektroforeogram PCR produktů 4 vzorků za použití 4 párů primerů s Q-solution.....	35

Tabulky

Tabulka 1: Nejznámější hereditární nádorové syndromy.....	5
Tabulka 2: Příklady multiplexních genových panelů dostupných pro analýzu rizika vzniku hereditárních nádorů.....	10
Tabulka 4: Složky obsaženy v QIAGEN LongRange PCR kitu.....	25
Tabulka 5: Složení PCR reakční směsi pro 5 vzorků.....	27
Tabulka 6: Použitý teplotní gradient pro teploty nasedání primerů a umístění vzorků v termocykleru.....	28
Tabulka 7: Podmínky PCR v termocykleru.....	28
Tabulka 8: Složení PCR reakční směsi pro 4 vzorky s přidáním Q-solution.	29
Tabulka 9: Složení PCR reakční směsi pro 12 vzorků.	30
Tabulka 10: Použité primery, pořadí vzorků, jejich umístění v termocykleru a T_a	30
Tabulka 11: Použitý teplotní gradient.	31
Tabulka 12: Podmínky PCR v termocykleru.....	31
Tabulka 13: Složení PCR reakční směsi pro 4 vzorky.....	32
Tabulka 14: Výsledné hodnoty T_a pro jednotlivé páry primerů.....	35
Tabulka 15: Srovnání výsledků T_a získaných při LR-PCR a výsledků publikovaných v literatuře.....	37

1 Úvod

Onkologická problematika je v současnosti v popředí vědeckého výzkumu, a to především díky novým možnostem, které otvírají pokrok v genetice, a které lze využít k detekci a k cílené léčbě nádorových onemocnění. Moderní výzkum léčebných možností onkologických onemocnění je založen na cílené biologické terapii.

Polymerázová řetězová reakce dlouhých úseků (long-range PCR; LR-PCR) je moderní metoda, velice perspektivní především v tom, že dokáže zrychlit, zjednodušit a zlevnit detekci genových přestaveb, zvláště v kombinaci se sekvencováním nové generace (next generation sequencing - NGS). Kombinace těchto dvou metod vede ke zvýšení zachytu těchto přestaveb, což je zásadní faktor ovlivňující možnosti detekce a léčby nádorových onemocnění.

Tato sofistikovaná PCR však nemusí vždy proběhnout ideálně. Mezi nejčastější komplikace patří vznik více nežádoucích produktů než pouze produkt odpovídající amplifikovanému úseku, nedostatečná intenzita amplifikace a nebo, konečně, PCR neproběhne vůbec. Těmto komplikacím má zabránit úprava reakčních podmínek, tzv. optimalizace PCR. Ve své práci se zabývám optimalizací PCR prostřednictvím změny teploty nasedání primerů - *annealingu* a využití tzv. Q-solution.

2 Cíle práce

1. Literární rešerše na téma bakalářské práce.
2. Zvládnutí základních molekulárních technik.
3. Optimalizace "long-range" PCR.
4. Zpracování získaných výsledků.

3 Literární přehled

3.1 Co je to nádor

Nádor je uskupení abnormálních buněk, které vznikly bez zřejmé příčiny z již existujících tělesných buněk a rostou nezávisle na organismu. Nádorové buňky se liší od zdravých buněk tím, že mají větší schopnost množit se a růst, vyšší odolnost a delší životaschopnost.

Maligní nádor je genetickým onemocněním vznikajícím na podkladě mutací genů. Tyto mohou být vyvolány prostřednictvím fyzikálních (ionizující záření), chemických (genotoxické látky), či biologických (selhání endogenních procesů replikace, virové infekce) vlivů. Vznik maligního nádoru u postiženého jedince může být více nebo méně urychlen existencí hereditárních mutací. Pro účely této práce je pojem “mutace” brán jako “poškozující varianta”.

Buňky maligních nádorů jsou nediferencované, ztratily vzhled a funkci normální specializované buňky a jsou schopny invazivně růst, prorůstat do krevních cév, dát vzniknout novým nádorům, které mohou být krevním řečištěm zaneseny do kteréhokoliv jiného orgánu nebo tkáně. Invazí do lymfatických cév vznikají stejným principem metastázy v mízních uzlinách. Oba způsoby metastazování se obvykle kombinují. Progrese zhoubného nádoru, pro kterou je typický invazivní růst, výskyt metastáz a narušení funkce orgánů, může vést až ke smrti organismu. Nádory můžeme dělit na sporadické a hereditární (Klener *et* Klener jr., 2010).

3.2 Rozdíly mezi sporadickými a hereditárními nádory

Sporadické nádory vznikají bez rozhodující dědičné příčiny, vlivem mutací somatických buněk (Anderson, 1992). V těchto případech nebývá zaznamenán výskyt v rodině nebo se vyskytly jen u jednoho člena, převážně z okruhu nepřímých příbuzných. U přibližně 15% případů rakoviny prsu se však choroba vyskytuje jako součást dědičného syndromu, za co jsou zodpovědné germinální mutace (Antoniou *et* Easton, 2006).

Z klinického hlediska je typické spojení familiárních nádorů prsu s manifestací v mladším věku (<45 let) a s vyšší frekvencí oboustranného onemocnění, na rozdíl od pacientů se sporadickým onemocněním. Tyto rozdíly vedly k hypotéze, že familiární a sporadické karcinomy prsu jsou důsledkem dvou biologicky odlišných mechanismů, které mají

za následek jednak různé klinicko-patologické charakteristiky těchto nádorů, a také přítomnost jiných markerů, které se dají využít při identifikaci vysoce rizikových rodin a jedinců (Anderson, 1992).

Rozdíl mezi sporadickými a hereditárními nádory na genetickém podkladě vysvětluje tzv. teorie dvou zásahů publikovaná Knudsonem (Knudson, 1971, Knudson, 2011). Tato hypotéza "dvou zásahů", kterou popsal Knudson na základě jeho pozorování výskytu familiárního retinoblastomu, je široce akceptována jako mechanismus úplné inaktivace nádorově supresorových genů, a to jak u hereditárního, tak i u sporadického typu nádorů (Ryland, *et al.*, 2015). V hereditární formě je první zásah zděděn prostřednictvím germinálních buněk a k druhému zásahu dochází v somatických buňkách. Ve sporadické formě se oba zásahy vyskytují v somatických buňkách (Knudson 1971). Za vznik hereditárních nádorů zodpovídají mutace v tumor-supresorových genech, zatímco u sporadických nádorů mutace onkogenů.

3.3 Hereditární nádorové syndromy

Je popsána řada hereditárních nádorových syndromů vzniklých na podkladě genových mutací s velice rozmanitými fenotypovými projevy. Příklady některých jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Nejznámější hereditární nádorové syndromy.

Syndrom (zdroj)	Zodpovědný gen	Funkce genu
HBOC (Shiovitz <i>et Korde</i> , 2015)	<i>BRCA 1</i>	Tumor-supresorové geny, které se podílejí na reparaci genetických lézí tím, že transkripčně regulují geny účastníci se na opravě DNA, buněčném cyklu a apoptóze.
	<i>BRCA 2</i>	
	<i>CHEK2</i>	Protein kináza zapojená do regulace buněčného cyklu v G2 fázi. Rychlá fosforylace jako odpověď na poškozenou DNA. Aktivovaný <i>CHEK2</i> stabilizuje p53 a interaguje s <i>BRCA1</i> .
	<i>BRIP1</i>	Interakce s <i>BRCA1</i> C - Terminus (BRCT) doménou <i>BRCA1</i> genu.
	<i>ATM</i>	Protein kináza zahrnující monitorování a opravu dsDNA a regulaci <i>BRCA1</i> a <i>CHEK2</i> .
	<i>PALB2</i>	Asociace s genem <i>BRCA2</i> . Zapojení do jaderné lokalizace a stability.
Cowdenův syndrom (Shiovitz <i>et Korde</i> , 2015)	<i>PTEN</i>	Patří mezi tumor-supresorové geny, pomáhá udržovat buněčný růst.
Li - Fraumeni syndrom (Shiovitz <i>et Korde</i> , 2015)	<i>TP53</i>	Regulace buněčného cyklu, oprava nukleových kyselin, apoptóza, stabilita genomu v buňce.
Lynchův syndrom (Shiovitz <i>et Korde</i> , 2015)	<i>MLH1, MSH2, MSH6</i>	MMR geny kódují proteiny, které rozpoznávají a reparují poškozenou DNA. Jeden komplex proteinů, sestávající z proteinů <i>MSH2</i> a <i>MSH6</i> nebo <i>MSH3</i> , rozpozná poškozenou DNA a naváže se na ni v místě poškození.
Dědičná forma difúzního karcinomu žaludku (Shiovitz <i>et Korde</i> , 2015)	<i>CDH1</i>	Poskytuje pokyny pro vytvoření proteinu epiteliální kadherin. Tento protein se nachází uvnitř membrány, která obklopuje epiteliální buňky (např. vnitřek víček).
Peutz - Jeghersův Syndrom (Shiovitz <i>et Korde</i> , 2015)	<i>STK11</i>	Účastní se tvorby enzymu serin/threonin kináza 11. Patří mezi tumor-supresorové geny, pomáhá udržovat buněčný růst.
Xeroderma pigmentosum (Plevová <i>et al.</i> , 2009)	<i>XP</i>	Účastní se reparace poškozené DNA.
Familiární adenomatózní polypóza střeva (FAP) (Plevová <i>et al.</i> , 2009)	<i>APC</i>	Negativní regulátor, který kontroluje koncentrace beta-cateninu a interaguje s E- kadherinem, které se podílejí na adhezi buněk.
Retinoblastom (Plevová <i>et al.</i> , 2009)	<i>RB1</i>	Patří mezi tumor-supresorové geny, pomáhá udržovat buněčný růst.

Legenda: *ATM*: “ataxia telangiectasia mutated gene”, *BRCA1/2*: “Breast cancer gene 1/2”, *BRIP1*: “BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1”, *CDH1*: “Cadherin 1 gene”, FAP: “Familial adenomatous polyposis”, HBOC: “Hereditary breast ovarian cancer”, *CHEK2*: “Checkpoint kinase 2 gene”, *MLH1*: “mutL homolog 1”, *MSH2*: “mutS homolog 2”, *MSH6*: “mutS homolog 6”, *PALB2*: “Partner and localizer of *BRCA2* gene“, *PTEN*: “Phosphatase and tensin homolog”, *RB*: “Retinoblastoma gene”, *TP53*: “Tumor protein 53”, *STK11*: “Serine/threonine kinase 11”, *XP*: “Xeroderma pigmentosum”

Klinicky nejvýznamějším hereditárním syndromem, o kterém bych se chtěla ve své práci zmínit na prvním místě, a kterým se budu dále podrobněji zabývat, je syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií (HBOC). Tomuto syndromu je věnována následující kapitola.

Dalším příkladem je **retinoblastom**, který patří mezi nádory s výskytem v dětském věku. Jedná se o nitrooční nádor s výskytem 1 na 14 700–22 600 narozených dětí. Retinoblastom má dvě formy - hereditární, postihující obě oči, zapříčiněnou přítomností zárodečné mutace v *RBI* genu, a somatickou, postihující jen jedno oko s mutací *RBI* genu pouze v nádorové tkáni. Pro rozlišení hereditární od somatické formy se v rámci diagnostiky provádí genetické vyšetření krve pacienta (MacCarthy, 2006).

Familiární adenomatózní polypóza (FAP), dědičné onemocnění tlustého střeva s autozomálně dominantním typem dědičnosti. Za vznik tohoto onemocnění je zodpovědná zárodečná mutace genu *APC*. Na příkladu rozvoje tohoto onemocnění byl popsán model vícestupňové karcinogeneze, tzv. Vogelsteinův model (Fearon *et* Vogelstein, 1990), který umožnil lépe pochopit postupný vývoj maligních nádorů. Pro toto onemocnění je charakteristický výskyt více než 100 adenomatózních polypů tlustého střeva, zejména v rodinách s prokázanou FAP. Polypy se u klasické formy FAP začínají tvořit okolo 15. roku věku (s rozpětím 7–36 let), přičemž ve věku 35 let má polypy 95 % postižených osob. Onemocnění je spojeno s vysokým rizikem vývoje kolorektálního karcinomu, často vícečetného, ve velmi mladém věku. Onemocnění se projeví u 100 % pacientů s FAP do 50 let věku. U pacientů s prokázanou FAP se provádí pravidelná dispenzarizace, je podávána preventivní chemoterapie, pacient je podroben profylaktickým operacím (Plevová *et al.*, 2009).

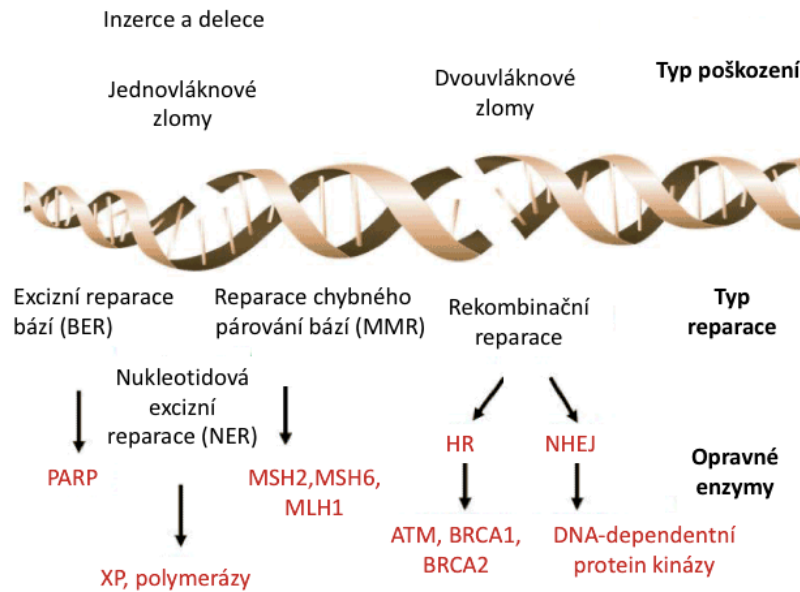
Dalším příkladem hereditárního onemocnění vzniklého na genetickém podkladě je **Lynchův syndrom** (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, HNPCC). Jedná se o dědičné onemocnění s autozomálně dominantním typem dědičnosti s vysokou penetrancí, při kterém dochází k časnému rozvoji kolorektálního karcinomu, endometriálního karcinomu a dalších malignit. Na podkladě Lynchova syndromu vzniká zhruba 1–3 % kolorektálních karcinomů a 2 % endometriálních karcinomů. Lynchův syndrom patří mezi nejběžnější formy dědičného kolorektálního karcinomu. U osob, v jejichž rodině se vyskytl Lynchův syndrom, se provádí genetické vyšetření na přítomnost mutací v zodpovědných genech. Jedná se o tyto tumor-supresorové geny pro opravu DNA: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*. Na základě výsledků těchto genetických

vyšetření se v rámci doporučených lékařských postupů provádí profylaktické operace tlustého střeva (Schneider *et al.*, 2012).

Jsou publikovány studie zkoumající souvislost výskytu karcinomu prsu u pacientů s Lynchovým syndromem (Ford, 2012). Lynchův syndrom je způsoben mutacemi v genech zodpovědných za opravu při nesprávném párování bází (tzv. DNA mismatch repair genů, MMR). MMR geny kódují proteiny, které rozpoznávají a reparují poškozenou DNA. Jeden komplex proteinů, sestávající z proteinů MSH2 a MSH6 nebo MSH3, rozpozná poškozenou DNA a naváže se na ni v místě poškození. Inaktivační mutace MSH2 znemožní rozpoznat poškozenou DNA, čímž blokuje funkci tohoto komplexu. Mutace MSH6 nebo MSH3 nejsou tak závažné, protože funkce těchto 2 proteinů se překrývají, takže nemusejí negativně ovlivňovat funkci celkového MMR systému (Shulman, 2010).

Posledním příkladem hereditárního onemocnění, o kterém bych se chtěla ve své práci zmínit, je **Li - Fraumeni syndrom** (LFS). Jedná se o dědičnou predispozici k rozvoji nádorů v raném věku. Genotypicky se jedná o mutaci *TP53* tumor-supresorového genu nacházejícího se na chromozomu 17 (17p13.1), s autosomálně dominantním typem dědičnosti. Fenotypicky se syndrom projevuje vznikem osteosarkomů a sarkomů měkkých tkání, karcinomů prsu, adenokarcinomů dřeně nadledvin, nádorů CNS a leukémií. Přestože není možné zabránit vzniku tumorů u pacientů s LFS, byly vyvinuty nové protokoly pro sledování včasné detekce nádorů, což vede k prodloužení doby přežití postižených pacientů (Guha *et Malkin*, 2017). Rovněž v rodinách s klasickými fenotypy LFS byli detekováni jedinci s mutacemi v genu *CHEK2* lokalizovaném na chromozomu 22q12.2. Ten, na rozdíl od *TP53*, kóduje serin/treoninovou proteinovou kinázu CHEK2, která fosforyluje p53, což vede k zastavení buněčného cyklu a umožnění reparace DNA. Proto mutace *CHEK2* podporují vývoj malignit inhibicí reparace DNA, podobně jako je tomu u MMR genů (Shulman, 2010).

Funkce jednotlivých genů zapojených do oprav DNA, a tedy do vývoje hereditárních nádorových syndromů, jsou zahrnuty v tabulce 1. Jejich zapojení do jednotlivých drah opravy DNA je schematicky znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1: Typy poškození DNA, typ reparační a opravné enzymy. Upraveno podle Toss *et Cortesi*, (2013).

Legenda: *ATM*: “ataxia telangiectasia mutated“, *BRCA1/2*: “Breast cancer gene 1/2“, *MLH1*: mutL homolog 1 gene, *MSH2*: “mutS homolog 2“, HR: homologní rekombinace, NHEJ: nehomologní spojování konců, PARP: poly(ADP-ribóza) polymeráza, *XP*: “Xeroderma pigmentosum gene”

3.4 Hereditární karcinom prsu a ovarií

Jak již jsem se zmínila výše, hereditární karcinom prsu a ovarií (HBOC) patří mezi klinicky nejvýznamnější, a tudíž nejintenzivněji zkoumané hereditární syndromy. Mezi geny zodpovědné za rozvoj tohoto syndromu patří zejména *BRCA1* a *BRCA2*.

Souvislost mezi přítomností mutace *BRCA1* genu a vznikem nádoru prsu byla publikována poprvé Mikim v roce 1994 (Miki *et al.*, 1994) a u *BRCA2* genu tímtož autorem v roce 1996 (Miki *et al.*, 1996). Mutace a s ní spojená ztráta funkce genů *BRCA1/2* výrazně zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu a ovarií (Yoshida *et Miki*, 2004, Petrucelli *et al.*, 2016).

Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu se pohybuje u nosiček mutací genů *BRCA1/2* od 40 do 85 %, přičemž do věku 40 let onemocní 19 % nosiček mutace genu *BRCA1* a 12 % nosiček mutace genu *BRCA2*. Riziko výskytu sekundárního nádoru prsu dosahuje až 60 %. Karcinom ovarií se vyskytuje u nosiček mutace genu *BRCA1* v 60 % a u nosiček mutace genu *BRCA2* v 10–20 %. Současné je také zvýšené riziko vzniku nádorů

vejcovodů. U nosiček *BRCA1* mutace je uváděno i zvýšené riziko vývoje nádorů dělohy a děložního čípku v porovnání s běžnou populací. Současně je zvýšené i riziko vzniku dalších malignit, jako například kolorektálního karcinomu, karcinomu prostaty u mužů, nádorů žaludku a slinivky. Riziko vzniku nádorů prsu je u mužských nosičů mutace v genu *BRCA2* až stonásobně vyšší a u *BRCA1* mutací padesátinásobně vyšší než u běžné populace (Plevová *et al.*, 2009).

Autozomálně dominantně děděný hereditární karcinom představuje zhruba 5–10% případů nádorů prsu (Newman *et al.*, 1988). Klinický syndrom, který je označován jako HBOC, se vyskytuje většinou u nosičů mutací genů *BRCA1/2*, ale také vzácně u pacientů *BRCA1* a *BRCA2* “wild-type” (Shiovitz *et Korde*, 2015). Stanovení diagnózy HBOC má zásadní vliv na další klinické sledování pacientů s tímto syndromem. Dle pokynů Evropské společnosti pro lékařskou onkologii (ESMO) a Národního centra pro výzkum rakoviny (NCCN), by se měly ženy s HBOC podrobit vyšetřením dle doporučeného schématu (viz kapitola 3.10) (Balmana *et al.*, 2011, <http://www.nccn.org>).

Některé studie identifikovaly ještě řadu dalších genů, které interagují s *BRCA1/2* a jsou zodpovědné za zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu v porovnání s běžnou populací. Mezi tyto geny patří *CHEK2* (“checkpoint kinase 2”) (Meijers-Heijboer *et al.*, 2002), *BRIP1* (“BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1”) (Seal *et al.*, 2006), *ATM* ataxia (“telangiectasia mutated”) (Renwick *et al.*, 2006) a *PALB2* (“partner and localizer of BRCA2 gene”) (Rahman *et al.*, 2007) (viz tabulka 1).

Dle Strattonovy studie (Stratton *et Rahman*, 2008) jsou výše uvedené geny zodpovědné za vznik hereditárních nádorů prsu u pacientů bez mutací v genech *BRCA1/2*. Z těchto informací vyplývá otázka, zda standardní genetické testy na identifikaci mutací v genech *BRCA1/2* jsou dostatečné, nebo zda by testování nemělo být rozšířeno o panel dalších genů (viz tabulka 2) zodpovědných za vznik karcinomu prsu.

Tabulka 2: Příklady multiplexních genových panelů dostupných pro analýzu rizika vzniku hereditárních nádorů.

Panel genů (Výrobce) (Zdroj)	Geny spojené se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu
BRCA Hereditary Cancer MASTR Plus (Multiplicom , Belgie) (http://www.genetica.cz/multiplicom--)	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, PALB2, CHEK2, BARD1, BRIP1, RAD51C, RAD51D, TP53, MRE11A, RAD50, NBN, FAM175A, STK11, MEN1, PTEN, CDH1, MUTYH, BLM, XRCC2, MLH1, MSH6, PMS2, MSH2, 3'EPCAM</i>
BreastNext (Spojené státy americké) (Shiovitz <i>et Korde</i> , 2015)	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, CDH1, PALB2, PTEN, STK11, TP53</i>
Hereditary breast and ovarian cancer (SOPHiA GENETICS, Švýcarsko) (https://www.sophiagenetics.com/list-of-diseases.html#illness-hereditary-cancer)	<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, FAM175A, MRE11A, NBN, PALB2, PIK3CA, RAD50, RAD51C, RAD51D, TP53, XRCC2</i>
CZECANCA (Česká republika) (Soukupová <i>et al.</i> , 2016)	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2, TP53, STK11, CDH11, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, APC, NBN, BLM, MEN1, CDKN2A, CDK4</i>

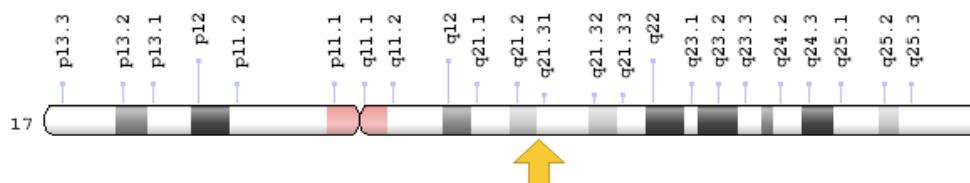
Legenda: *APC*: “adenomatous polyposis coli”, *ATM*: “ataxia telangiectasia mutated gene”, *BARD1*: “BRCA1 associated RING domain 1“, *BRCA1/2*: “Breast cancer gene 1/2”, *BLM*: “Bloom syndrome gene”, *BRIP1*: “BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1”, *CDH1*: “Cadherin 1 gene”, *CDK4*: “cyclin dependent kinase 4”, *CZECANCA*: “Czech cancer panel for clinical application”, *CHEK2*: “Checkpoint kinase 2 gene”, *MEN1*: “multiple endocrine neoplasia I”, *MLH1*: „mutL homolog 1”, *MRE11A*: “meiotic recombination 11 homolog A”, *MSH2*: “mutS homolog 2“, *MSH6*: “mutS homolog 6“, *MUTYH*: “mutY homolog”, *NBN*: “nibrin gene“, *PALB2*: “Partner and localizer of BRCA2 gene“, *PIK3CA*: “phosphoinositide-3-kinase”, *PMS2*: “postmeiotic segregation increased 2”, *PTEN*: “Phosphatase and tensin homolog”, *RAD51C/D*: “RAD51 homolog C/D”, *RB*: “Retinoblastoma gene”, *TP53*: “Tumor protein 53”, *STK11*: “Serine/threonine kinase 11

Přítomnost rozsáhlých přestaveb *BRCA1* genu nabízí slibný výhled v klinické praxi, zvláště u pacientů s předchozími negativními testy na přítomnost bodových mutací a krátkých inzercí/delecí v genech *BRCA1/2*. Jestliže je totiž určena příčinná mutace,

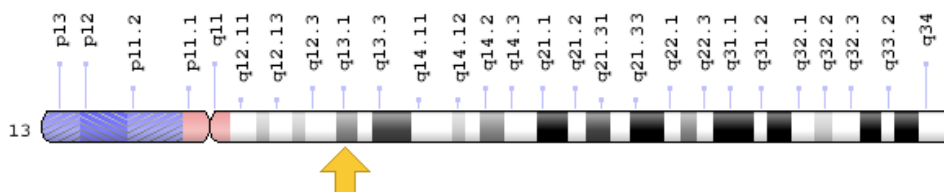
prediktivní testování může identifikovat členy rodiny, kteří mohou mít benefit ve formě vyššího přežívání chemoprevencí nebo v profylaktické chirurgii redukující riziko vzniku nádorů prsu a/nebo ovarií (Vašíčková *et al.*, 2007).

3.5 Struktura a funkce BRCA1 a BRCA2

Gen *BRCA1* (OMIM 113705) je lokalizován na chromozomu 17 (17q21) a zaujímá přibližně 81 kb genomové DNA. Gen *BRCA2* (OMIM 600185) je lokalizován na chromozomu 13 (13q12–13) a jeho velikost je asi 84 kb (viz obrázky 2 a 3) (Wooster *et al.*, 1994). Gen *BRCA1* kóduje protein o 1863 aminokyselinách, gen *BRCA2* o 3418 aminokyselinách. Přesná molekulární lokalizace dle referenční sekvence GRCh38 je u genu *BRCA1* 43 044 295 až 43 125 483 bp na chromozomu 17 a u genu *BRCA2* 32 315 480 až 32 399 672 bp na chromozomu 13. Gen *BRCA1* obsahuje 24 exonů a gen *BRCA2* obsahuje 27 exonů. Oba tyto geny kódují multidoménové proteiny a jejich sekvence jsou bohaté na repetitivní DNA. Jedná se o tumor-supresorové geny, které se podílejí na reparaci genetických lézí tím, že transkripčně regulují geny účastníci se na opravě DNA, buněčném cyklu a apoptóze (Yoshida *et Miki*, 2004, Petrucelli *et al.*, 2016).

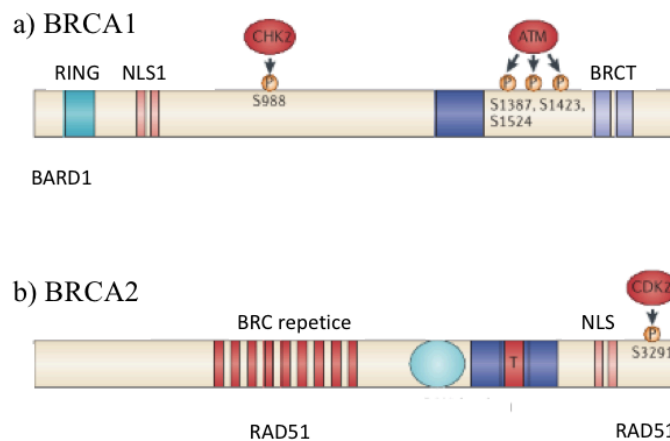


Obrázek 2: Schematické znázornění lokalizace genu *BRCA1* na chromozomu 17. Převzato z <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SLITRK6#location>.



Obrázek 3: Schematické znázornění lokalizace genu *BRCA2* na chromozomu 13. Převzato z <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SLITRK6#location>.

Gen *BRCA1* je složen z vícero funkčních domén. Na N-konci se nachází RING (“really interesting new gene”) doména a na C-konci jsou tandemově za sebou dvě BRCT (BRCA1 C-terminus) domény (Huyton *et al.*, 2000). Protein BRCA1 je jako monomer nestabilní a prostřednictvím RING domény asociuje s RING doménou proteinu BARD1 (“BRCA1-associated RING domain protein 1”), s kterou vytváří stabilní heterodimer (Meza *et al.* 1999). Jaderný lokalizační signál NLS1 je nezbytný pro translokaci nově nasyntetizovaného proteinu do jádra buňky. Gen *BRCA2* obsahuje opakující se strukturní motiv, nazývaný BRC (“BRCA C-terminal repeats”) doména. Šest BRC domén je vysoce konzervovaných a zprostředkovává interakci proteinu BRCA2 s RAD51 rekombinázou. Na C-konci proteinu BRCA2 se nachází jaderný lokalizační signál NLS (Yang *et al.*, 1999) viz obrázek 4.



Obrázek 4: a) Funkční domény proteinu BRCA1 b) Funkční domény proteinu BRCA2.

Převzato z Roy *et al.*, 2011.

Legenda: *ATM*: “ataxia telangiectasia mutated gene”, *BARD1*: “BRCA1 associated RING domain protein 1”, *BRCT*: “BRCA1 C-terminus doména”, *NLS1*: “nuclear localisation signal”, *CDK4*: “cyclin dependent kinase 4”, *CHEK2*: “Checkpoint kinase 2 gene”, *RING*: “really interesting new gene doména”

3.6 Možnosti inaktivace BRCA1 a BRCA2.

Je známo několik set odlišných mutací spojených s dědičnou predispozicí k nádorům prsu a ovarií, které byly identifikovány v genech *BRCA1/2*. Nejčastěji identifikované mutace jsou “nonsense” mutace, nukleotidové substituce a malé delece/inzerce způsobující zkrácení proteinů *BRCA1/2*. Ve většině vyšetřované populace byla pomocí v minulosti

dostupných screeningových technik zjištěna nižší frekvence variant *BRCA1* genu ve vysoko rizikových rodinách s karcinomem prsu než předpovídaly statistické analýzy. Patogenní mutace v kódujících oblastech nebo v místech sestřihu *BRCA1* genu byly nalezeny přibližně ve 2/3 *BRCA1* rizikových rodin. Tato zjištění vedla k předpokladu, že metody všeobecně používané pro detekci mutací selhávaly v detekci určitých typů *BRCA1* defektů germinální linie, jako jsou např. velké intragenní mutace. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že většina screeningových metod založených na PCR genomické DNA je více kvalitativní než kvantitativní. Může tak být přehlédnuta částečná nebo úplná ztráta exonů, nebo jejich amplifikace, protože přítomnost “wild-type” alely umožňuje při PCR její zmnožení, a tím zvyšuje možnost falešně negativního výsledku (Vašíčková *et al.*, 2007).

Bylo detekováno mnoho odlišných *BRCA1* germinálních mutací (Mazoyer, 2005). Většina z nich jsou delece, ale byly popsány i duplikace, triplikace nebo kombinované delece/inzerce. V několika studiích bylo zjištěno, že podíl genomových přeskupení v mutačním spektru *BRCA1* se pohybuje od 8 do 15% (Puget *et al.*, 1999, Hartmann *et al.*, 2004). Většina známých přeskupení vytváří posuny čtecích rámců, které vyústí v předčasné ukončení translace. Majorita mutací zavádějící nový stop kodon, bez ohledu na jejich typ, byla popsána jako příčina “nonsense-mediated” rozpadu mRNA (Vašíčková *et al.*, 2007).

Základní screening mutací genu *BRCA1/2* je zaměřen na exony a sestřihové oblasti. Kromě výše uvedených tyto alterace zahrnují nesynonymní (“missense”) a synonymní (“silent”) mutace. Avšak nedávno byly detekované další alterace *BRCA1/2* genu asociované se vznikem dědičných nádorů prsu, jako jsou inzerce nebo delece v intronických sekvencích (Jia *et al.*, 2014). Mutace v nekódujících oblastech představují skupinu nedostatečně detekovaných genetických alterací a vyžadují další zkoumání, protože právě intronové varianty mohou významně ovlivnit transkripci, stabilitu a zpracování mRNA (Jia *et al.*, 2014). Informace o všech dosud popsaných alteracích jsou uloženy v různých databázích, například ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), ARUP (<http://arup.utah.edu/database/BRCA/>), Breast Cancer Information Core internet web site (<https://research.nhgri.nih.gov/bic/>) a HGMD (The Human Gene Mutation Database).

Mezi genetické spouštěče karcinogeneze patří i ztráta heterozygotnosti - loss of heterozygosity (LOH). LOH je přítomna u mnoho dědičných nádorových syndromů.

LOH se podílí na vzniku nádorů mechanismem úplné inaktivace tumor-supresorových genů prostřednictvím ztráty “wild-type” alely (Ryland *et al.*, 2015), jak již bylo zmíněno výše u Knudsonovy teorie dvou zásahů. LOH je také klinicky užitečným biomarkerem, kterého nepřítomnost může predikovat primární rezistenci k chemoterapii u pacientů se zárodečnou mutací *BRCA1/2*. Absence LOH je spojena se sníženým přežíváním pacientů léčených *cis* platinou (Maxwell *et al.*, 2017).

Pro regulaci exprese genů je významná chemická modifikace nukleotidů přidáním methylové skupiny na cytosin (methylace) lokalizovaný v tzv. CpG ostrovech. Výskyt metylované DNA je spojen s represí (tlumením) transkripce (Snustad *et Simmons*, 2009). Hypermethylace cytosinových zbytků v CpG ostrovech promotorů mnoha tumor-supresorových genů je spojena s inaktivací genové exprese, což je hlavním mechanismem ztráty funkce tumor-supresorového genu během tumorogeneze. Hsu *et al.* detekovali methylaci promotoru *BRCA1* u 78 (56%) ze 139 nádorů prsu a současně ve své studii prokázali, že methylace promotoru *BRCA1* je významně spojena se špatným celkovým přežitím a výrazně zkráceným bezpříznakovým intervalem (DFI) (Hsu *et al.*, 2013).

Do zvláštní skupiny patří tzv. „BRCAness“ nádory vyskytující se u žen bez hereditární predispozice (nemají prokázanou zárodečnou *BRCA1/2* mutaci). Pro tyto nádory, které svými klinicko-patologickými charakteristikami připomínají nádory s *BRCA* mutacemi je typická dysfunkce DNA reparačního systému (Zimovjanová, 2009).

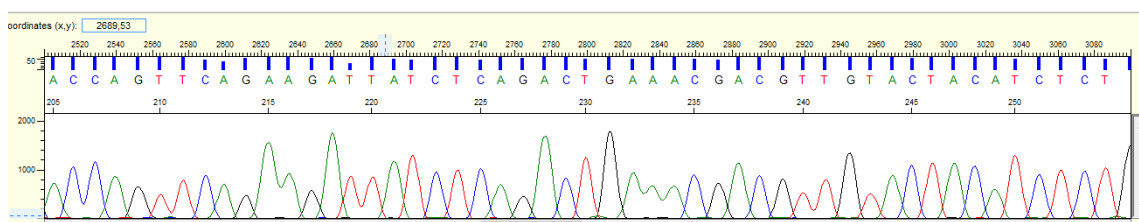
3.7 Rutinní metody vyšetřování genů *BRCA1* a *BRCA2*

Od objevu genetické predispozice k rakovině prsu na základě přítomnosti mutací genů *BRCA1/2* jsou vyvíjeny genetické testy k jejich identifikaci. Kromě toho jsou neustále vyvíjeny nové metody sekvencování využívající rozličné platformy (Miki *et al.*, 2004, Miki *et al.*, 2006).

Sekvencování slouží ke stanovení pořadí (sekvence) nukleotidů v molekule DNA. Automatizovaná metoda sekvencování DNA publikovaná Sangerem v roce 1977 je považována za technologii první generace sekvencování a novější metody se nazývají sekvencování příští generace - next generation sequencing (NGS) (Metzker, 2010).

Sangerovo sekvencování je definováno jako metoda sekvencování DNA, která je založena na začlenění dideoxynukleotidů ukončujících řetězce DNA polymerázou během *in vitro* syntézy DNA. DNA polymerázy kopírují monovláknové DNA templáty

přidáním nukleotidů k rostoucímu řetězci. Společným začátkem je 5'-konec sekvenačního primeru, což je oligonukleotid, který je komplementární k templátu. Deoxynukleotidy (dNTPs) přidané k prodlužovanému produktu jsou vybrány dle komplementarity bází, které odpovídají templátu. Součástí směsi přidaných nukleotidů jsou i radioaktivně či fluorescenčně značené dideoxynukleotidy (ddNTPs) postrádající 3'-hydroxylovou skupinu, která je potřebná pro prodloužení řetězců DNA, a proto nemůže vytvořit vazbu s 5'-fosfátem dalšího dNTP. Výsledkem je tvorba DNA řetězců všech možných délek, protože dideoxynukleotidy se náhodně začleňují, čímž se zastaví další prodlužování produktů. V případě starší metody využívající radioaktivního značení po proběhnutí čtyř paralelních reakcí obsahujících každou jednotlivou ddNTP bázi jsou výsledné produkty porovnány na čtyřech elektroforetických gelech odpovídajících jednotlivým bázím. Na výsledném autoradiografu je možno zjistit, jak za sebou následují nukleotidové sekvence v templátu, protože v příslušném elektroforetickém gelu bude přítomen radioaktivní pás v poloze odpovídající relativní molekulové hmotnosti produktu (Heather *et al.*, 2016). V současnosti se využívá hlavně fluorescenčního značení ddNTPs, což umožňuje průběh sekvenační PCR v jedné reakci, protože každý ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP a ddTTP) je označen jinou fluorescenční barvou. Získané PCR produkty jsou následně separovány pomocí kapilární elektroforézy. Ve výsledném elektroforeogramu jsou jednotlivé barevně odlišené píky řazeny dle nukleotidové sekvence analyzované DNA (Obrázek 5).



Obrázek 5: Příklad elektroforeogramu ze sekvenace genu BRCA1 metodou dle Sangera.

Legenda: A: adenin (zelená), C: cytosin (modrá), T: thymin (červená), G: guanin (černá)

Vzhledem k tomu, že Sangerovo sekvenování je relativně časovo a finančně náročné, byly vyvinuty nové technologie sekvenování DNA, které umožňují sekvenovat více genů, pacientů, případně i celý genom v jednom běhu. Označují se termínem sekvenování nové generace (NGS) nebo masivní paralelní sekvenování (Tan *et al.*, 2012, Knierim *et al.*, 2011).

NGS je komplexní metoda používaná k vyšetření genomu, která zahrnuje přípravu templátů, sekvencování a analýzu dat (Metzker, 2010). V současnosti existuje několik jedinečných kombinací specifických protokolů (platform), kde každá platforma představuje komplexní souhru enzymologie, chemie, optiky s vysokým rozlišením, hardwaru a speciálního softwaru. Toto umožňuje vysoce efektivní přípravu vzorků před sekvencováním DNA a zpracování dat, s následnými, významnými časovými úsporami a s minimálními požadavky na přidružená zařízení (Mardis, 2008). Jedinečná kombinace specifických protokolů odlišuje jednu technologii od druhé a určuje typ dat vytvořených z každé platformy. Tyto rozdíly v datovém výstupu mohou představovat určité obtíže při porovnávání jednotlivých platform (Metzker, 2010).

Pro konstrukci knihovny (výsledný vzorek obsahující všechny vyšetřované geny a pacienty) jsou pomocí postupů specifických pro každou metodu připraveny jednotlivé řetězce fragmentů a následně provedeny sekvenační reakce. Knihovny pro sekvenaci panelu vybraných genů mohou být připraveny dvojím způsobem. Buď jsou tyto geny amplifikovány pomocí PCR nebo je genomická DNA fragmentována a analyzované geny jsou pomocí specifických hybridizačních sond vychytány a následně upraveny. Řetězce fragmentů jsou spojeny s linkery (adaptéry) vlastními každé platformě a každý pacient je označen tzv. čárovým kódem (barcode - oligonukleotidová sekvence specifická pro jednotlivé pacienty v knihovně). Vzhledem k tomu, že díky přítomnosti adaptérových sekvencí mohou být fragmenty DNA selektivně amplifikovány pomocí PCR, není nutný žádný další krok (Mardis, 2008).

Nejčastěji používanými platformami sekvencování nové generace jsou:

Solexa (Illumina)

Princip metody: po amplifikaci templátů DNA a vytvoření shluků (klastrů) jsou následně přidávány jednotlivé fluorescenčně značené báze na každý templát. V každém cyklu jsou přidané značené báze na klastrech detekovány laserovým detektorem, který podle fluorescenčního signálu pozná, o kterou bázi se jedná (Kývalová, 2011).

Iont Torrent (Life Technologies)

Princip metody: přímé převádění chemicky kódovaných signálů do digitální podoby na polovodičovém čipu. Tato platforma využívá detekci vodíkových protonů uvolněných v průběhu syntézy nově vznikajícího řetězce. Při zabudování jednotlivých bazí dochází

tedy ke změně pH, což umožňuje měřit tyto změny konduktometricky (<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/ion-torrent.html>).

454 Roche

Princip metody: Čtení sekvence pomocí pyrosekvence - po navázání báze na templát je uvolněn pyrofosfát. Při použití enzymatické směsi (DNA polymerázy, ATP sulfurylázy a luciferázy) jsou detekovány světelné změny (fotony) v závislosti na množství pyrofosfátu, který je uvolňován po polymerázou zprostředkované adici dNTP na volném řetězci (Margulies *et al.*, 2005).

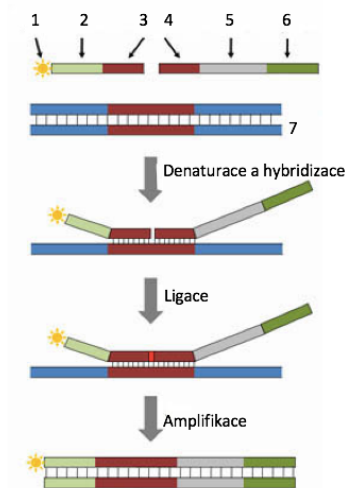
Mezi další používané platformy pro sekvencování patří např. Solid (Applied Biosystems), PacBio (Pacific Biosciences) a Oxford Nanopore (Kývalová, 2011).

NGS má široké využití v oblasti medicíny. V diagnostice zhoubných nádorů mohou být například detekovány specifické alely účastníci se karcinogeneze prostřednictvím “ultra-deep” sekvencování genomové DNA, a to především v případech, kdy předchozí detekce Sangerovým sekvencováním selhala (Schuster, 2007).

V současnosti se NGS využívá i pro geny *BRCA1/2*, kde studie potvrdily účinnost výše uvedených technologií pro genetický screening těchto genů (Ozcelik *et al.*, 2012). Pro confirmaci výsledků NGS se i nadále běžně používá Sangerovo sekvencování.

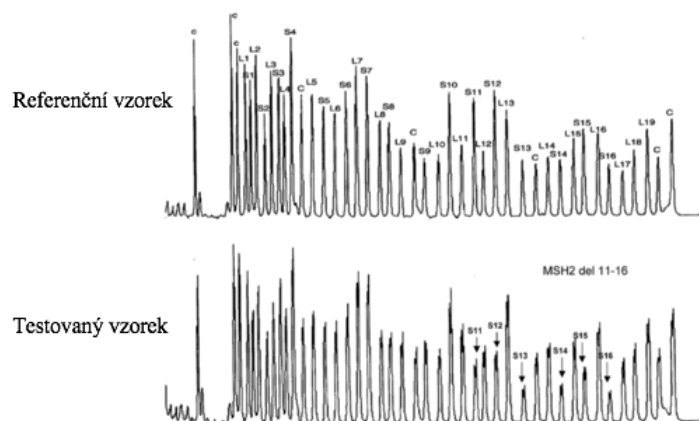
Další běžně využívaná metoda k určování velkých přestaveb (např. ztráta exonu) je **MLPA** (“Multiplex ligation-dependent probe amplification“). V praxi byla poprvé použita Gillem *et al.* v roce 2002 pro detekci delecí *MSH2* a *MLH1* genů (Matthijs *et al.*, 2016).

Princip metody MLPA: po specifické hybridizaci sond ke genomové DNA, a jejich ligaci následované amplifikací hybridizované sondy je provedena semikvantitativní fragmentační analýza výsledných PCR produktů pomocí kapilární elektroforézy (viz obrázky 6 a 7) (Sellner et Taylor, 2004).



Obrázek 6: Princip MLPA metody. Převzato z Crompton *et al.*, 2010.

Legenda: 1: fluorescenční barvivo, 2: sekvence “forward” primeru, 3+4: specifické oligonukleotidové próby, 5+6: sekvence “reverse” primeru, 7: cílová DNA



Obrázek 7: Elektroforeogram testovaného vzorku genů *MSH2/MLH1* v porovnání s profilem referenčního vzorku. Je znázorněn relativní pokles intenzity fluorescence u testovaného vzorku (znázorněn šipkou) demonstrujícího delecí exonů 11–16 genu *MSH2* ve spodním panelu. Převzato z Sellner *et Taylor*, 2004.

Legenda: *MLH1*: „mutL homolog 1”, *MSH2*: “mutS homolog 2“

Tato metoda je standardně používaná k detekci velkých přestaveb genů *BRCAl/2*, jak ukazují práce například Engertové *et al.*, provádějící screening v německé populaci pacientek s hereditárními karcinomy prsu (Engert *et al.*, 2008), v italské populaci

Montagniho *et al.* (Montagna *et al.*, 2003) a konečně v české populaci práce Vašíčkové *et al.* (Vašíčková *et al.*, 2007).

3.8 Detekce velkých přestaveb genů *BRCA1/2* pomocí metody LR-PCR

Mezi metody používané k detekci přestaveb genů *BRCA1/2* patří “southern blot” (Petrij-Bosch *et al.*, 1997), LR-PCR (Payne *et al.*, 2000), barevné barkódování genu *BRCA1* na “combed” DNA (Gad *et al.*, 2001), semikvantitativní multiplexní PCR (Casilli *et al.*, 2002), real-time PCR (Barrois *et al.*, 2004) a MLPA (Schouten *et al.*, 2002). Posledně uvedená metoda byla do praxe uvedena v roce 2003 a využívá se pro detekci relativního počtu kopií všech *BRCA1* exonů jak je podrobněji popsána výše (Hogervorst *et al.*, 2003).

Další často využívanou metodou v klinické praxi je LR-PCR. Jednou z klíčových výhod použití LR-PCR ve srovnání s klasickou PCR je schopnost detekovat velké genomové přestavby, jako jsou velké duplikace, inserce a delece. Kombinace LR-PCR se sekvencováním patří mezi efektivní nástroje genetického testování (senzitivita 99,8 %, specificita 95,4 %) genů *BRCA1/2* (Ozcelik *et al.*, 2012). Spojením LR-PCR se sekvencováním je dosaženo vyšší citlivosti a rychlejší a efektivnější detekce genetických variant (Tan *et al.*, 2012, Knierim *et al.*, 2011).

LR-PCR využívá multiplicitních LR-PCR polymeráz pro amplifikaci dlouhých genomových fragmentů. Některé z nich jsou schopné amplifikovat až 15 a více kb genomové DNA. I tato metoda má však určité nedostatky. Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.6, hrozí u heterozygotů riziko získání falešně negativního výsledku z důvodu přítomnosti “wild-type” alely (Vašíčková *et al.*, 2007).

Sekvenační analýza kódujících exonů a exon-intronových spojů zachytí cca 85% mutací genu *BRCA1* uvedených ve veřejně dostupné verzi mutační databáze HGMD (The Human Gene Mutation Database), přičemž metoda MLPA zachytí dalších cca 14% mutací velkého rozsahu (amplifikace/delece) genu *BRCA1*. V případě genu *BRCA2* sekvenační analýza kódujících exonů a exon-intronových spojů zachytí cca 95% mutací uvedených v této databázi (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

3.9 Princip LR-PCR

PCR je jedním z nejdůležitějších nástrojů molekulární biologie využívaná ke klonování malých fragmentů DNA. Byla poprvé popsána Mullisem v roce 1990 (Mullis, 1990). Klasická PCR je však limitovaná maximální velikostí amplifikovaných fragmentů kvůli efektivitě DNA polymerázy.

Principem PCR je namnožení určitého úseku DNA - templátu prostřednictvím enzymu DNA polymerázy. Pro správný průběh PCR je potřeba, mimo jiné, velmi přesná teplotní regulace jednotlivých reakčních kroků, která je zajišťována termocyklerem. PCR začíná počáteční denaturací (94–98 °C, 1–3 min), poté následuje několikanásobné opakování vlastního cyklu s denaturací (94–98 °C, 10–60 s), nasednutí primerů (52–58 °C, 30 s) a prodloužení řetězce (elongace) (většinou 70–80 °C, 1 min). Na konci bývá přidáván ještě další krok elongace sloužící k dosyntetizování získaných amplikonů (72 °C, 5–15 min). Při denuraci se dvoušroubovice DNA rozplétá na dva jednovláknové řetězce, poté se primery specificky párují s komplementární oblastí na templátové DNA. Následně probíhá syntéza DNA, dokončení syntézy částečných produktů a zchlazení (5 min a více, 4 °C) (Lorenz, 2012).

PCR nemusí vždy proběhnout ideálně. Mezi nejčastější komplikace reakce patří vznik více nežádoucích produktů než pouze produkt odpovídající amplifikovanému úseku, nedostatečná intenzita amplifikace anebo, konečně, PCR neproběhne vůbec. Těmto komplikacím má zabránit úprava reakčních podmínek, tzv. optimalizace PCR. Mezi jednotlivé kroky optimalizace patří například změna koncentrace DNA, zvýšení koncentrace MgCl₂, přidání aditiv (DMSO, formamid, betaine, glycerol, BSA,....), modifikace cyklu (např. prodloužení doby elongace), úprava tzv. ramping teploty (rychlosti přechodu z jedné teploty na druhou) a konečně změna teploty nasednutí primerů (*annealing*, T_a) (Lorenz, 2012).

V roce 1992 Barnes modifikoval PCR, která umožnila amplifikaci fragmentů o délce až 5 kb (Barnes, 1992). Termín long-range PCR byl poprvé použit v práci Chenga *et al.*, který v roce 1994 zdokonalením reakčních podmínek a modifikací polymeráz zvýšil velikost amplikonů z 3–5 kb na více než 30 kb (Cheng *et al.*, 1994). Tato modifikace zvýšila rychlost a jednoduchost PCR při genomovém mapování a sekvencování a usnadnila výzkum v molekulární genetice. LR-PCR je standardně používána ve studiích

zabývajících se mutační analýzou tumor-supresorových genů, např. *BRCA1/2* (Ozcelik *et al.*, 2012).

Pro klasickou PCR je používána DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Při LR-PCR je DNA polymeráza připravena jako mix enzymů obsahující směs vysoce čistých rekombinantních termostabilních DNA polymeráz a faktorů klonovaných v *E. coli* (QIAGEN® LongRange PCR Handbook).

Pro amplifikaci dlouhých genomických fragmentů u LR-PCR je velice důležitý správný výběr multiplicitních "long-range" DNA polymeráz a vytvoření optimálních experimentálních podmínek pro jejich činnost. Touto velice důležitou problematikou správného výběru a fungování polymeráz se zabývá práce Jia (Jia *et al.*, 2014), který srovnává činnost šesti enzymů používaných v komerčních setech - Invitrogen SequalPrep, Invitrogen AccuPrime, TaKaRa PrimeSTAR GXL, TaKaRa LA Taq Hot Start, KAPA Long Range HotStart and QIAGEN LongRange PCR Polymerase. Tato práce zdůrazňuje nezbytnost optimalizace experimentálních podmínek, jako je nasednutí primerů a čas syntézy DNA pro správnou činnost jednotlivých polymeráz k dosažení úspěšné amplifikace DNA fragmentů. Právě problematika optimalizace podmínek pro správné nasednutí primerů za využití termostabilní DNA polymerázy "QIAGEN LongRange PCR Polymerase" při amplifikaci vybraných regionů genů *BRCA1/2* je náplní této bakalářské práce (viz praktická část).

3.10 Význam vyšetření hereditárních nádorových syndromů

Vysoký podíl malignit je možno diagnostikovat již v počátečním stadiu HBOC při použití multimodálního přístupu, který zahrnuje lékařské vyšetření, nácvik správného samovyšetření a mamografický screening (Scheuer *et al.*, 2002). Standardní doporučený preventivní program rizikových pacientů zahrnuje samovyšetřování prsů jednou měsíčně od 18 let, celkové fyzikální vyšetření onkologem od 25 let, ultrazvukové nebo NMR vyšetření prsů jednou ročně od 25 let, (vhodné indikovat individuálně, zhodnotí radiodiagnostik dle typu žlázy), mamografie jednou ročně od 30 let (možnost zařazení určí radiodiagnostik dle typu žlázy) a ultrazvukové vyšetření břicha jednou ročně od 30 let. V případě potřeby je možno vykonat i profylaktickou mastektomii a/nebo adnexektomii (Plevová *et al.*, 2009).

Součástí preventivního vyšetření je i genetické vyšetření ohrožených jedinců a jejich rodinných příslušníků. Za předpokladu, že je frekvence výskytu onemocnění 1/345, v celkové populaci v USA až 950 000 jedinců nese mutace *BRCA1/2* tumor-supresorových genů. U nosičů mutace *BRCA1/2* je riziko vzniku rakoviny prsu vyšší až 20násobně a riziko vzniku rakoviny ovarií až 9násobně ve srovnání se zdravou populací (Scheuer *et al.*, 2002).

Co se týče terapie, jsou pacienti s karcinomem prsu léčeni standardními léčebnými metodami - chirurgicky, radioterapií a chemoterapií. Avšak budoucnost léčby těchto onemocnění je v cílené terapii, která je v současnosti intenzivně vyvíjena a testována. Je zkoušena celá řada nových preparátů, mezi které patří, mimo jiné, i chemické inhibitory poly(ADP-ribóza) polymeráz (PARP) (Annunziata *et Bates*, 2010). Zvýšené hladiny exprese receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) u nádorů s *BRCA1* mutací by mohly předpovídat vyšší citlivost k anti-EGFR terapii, blokující EGFR signální transdukcí. Jsou publikovány klinické studie kombinující terapii blokátorem EGFR - cetuximabem v kombinaci s ixabepilonem u metastazujícího "triple-negativního" karcinomu prsu (tj. ty, které neexprimují receptor estrogenu, progesteronu a lidského epidermálního růstového faktoru Her2) (Zimovjanová, 2009).

V léčebné praxi se v Evropské unii od roku 2015 pro léčbu karcinomu ovarií využívá PARP inhibitor olaparib (Lynparza, Roche). Tento preparát byl testován i ve FN Olomouc u "triple negativních" karcinomů prsů a v současnosti probíhá vyhodnocování výsledků klinických zkoušek (osobní sdělení).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Genomická DNA pro optimalizaci LR-PCR byla získaná ze vzorků pacientů vyšetřovaných v Ústavu lékařské genetiky FN v Olomouci. V rámci vstupního vyšetření pacienti podepsali informovaný souhlas, ve kterém souhlasili s využitím jejich DNA pro výzkum. Genomická DNA byla z krve izolována laborantkou metodou dle Millera. Pro účely této bakalářské práce byla DNA naředěna do PCR vody na koncentraci v rozmezí 25–250 µg/ml.

4.2 Použité chemikálie, roztoky a soupravy

Použité chemikálie

- Agarosa DNA grade (Electran®, katalogové číslo: 232-731-8)
- Deionizovaná voda
- GoodView™ GelRed Nucleic Acid Stain (SBS Genetech, katalogové číslo: 41002)
- Quick - Load 1 kb Extend DNA ladder (Biolabs, katalogové číslo: N3239S)
- Vzorkovací roztok (0,1% bromfenolová modř v 30 % glycerínu / H₂O)

Použité primery

- DNA oligonukleotidy (Sigma Aldrich) (viz tabulka 3)

Tabulka 3: Primery použité pro amplifikaci vybraných exonů genů *BRCA1/2*, jejich nukleotidová sekvence a délka ampliconů.

Gen	Exon	Sekvence primerů (5'→3')	Velikost ampliconu [bp]
<i>BRCA1</i>	7–5	F: 5'-GCCATGGCACCCAGCTGAAGTA-3' R: 5'-CTGGGAGCGATACCCCATGCT-3'	8 932
<i>BRCA1</i>	24–21	F: 5'-ACCCCAACATTGATTCCTTTC-3' R: 5'-CACAGGGAGAAAGTCTGCAAG-3'	12 869
<i>BRCA2</i>	17–20	F: 5'-GGCCTTATGGTAGATTCTCCCCG-3' R: 5'-TGGGCCTCCACATATTTTGCTGCTT-3'	11 780
<i>BRCA2</i>	25	F: 5'-CAGAAGGGGAATCAGGATCA-3' R: 5'-GCTGATAGGGAGAGGGGAAC-3'	14 010
<i>BRCA2</i>	26–27	F: 5'-TTAATTGCCCATGAACCTCAG-3' R: 5'-TATTGACTTGTATTGTGTTCGCTGT-3'	5 778

Legenda: F: “forward”, R: “reverse”, sekvence primerů převzaty ze studie Ozcelik *et al.*, 2012.

Použité soupravy

- QIAGEN LongRange PCR Kit (20) (QIAGEN, katalogové číslo: 206401) (viz tabulka 4)

Tabulka 4: Složky obsaženy v QIAGEN LongRange PCR kitu.

Složky PCR kitu	Koncentrace	Objem [μ l]
Long-range PCR enzym mix	5U/ μ l	8
Long-range PCR pufr s ionty MgCl ₂	10 x	100
dNTP mix	10 nm	50
Q-Solution®*	5x	400
Voda zbavená RNáz	-	1900

* QIAGEN LongRange PCR Kit obsahuje Q-Solution, tj. PCR přísadu, která usnadňuje amplifikaci templátů modifikací teploty tání (T_m , melting temperature) DNA. To usnadňuje průběh PCR a na rozdíl od jiných běžně používaných aditiv PCR, jako je DMSO, se Q-Solution používá pouze při jedné pracovní koncentraci, je netoxický a zaručuje čistotu PCR.

Použité roztoky

- 0,5x TBE pufr: 27 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris), 13,75 g kyseliny borité (H₃BO₃), 1 ml roztoku EDTA (0,5 mol/l, pH 8,0), doplněno deionizovanou vodou do 5 l
- NLB pufr: (Nucei lysisbuffer): 1,211 g Tris-HCl (10 mM), 23,376 g NaCl (400 mM), 0,745 g EDTA (2 mM), pH 7,3 - 7,4, doplněno deionizovanou vodou do 1 l
- LB pufr (Lysisbuffer): 8,825 g NH₄Cl (155 mM), 1,001 g KHCO₃ (10 mM), 0,372 g EDTA (1 mM), pH 7,3–7,4 upraveno přidáním cca 800 μ l konc. NaOH, doplněno deionizovanou vodou do 1 l
- TE pufr: 2,5 ml Tris, 0,5 ml EDTA (0,5 M), doplněno deionizovanou vodou do 250 ml

4.3 Použité laboratorní přístroje

- Automatické mikropipety 0,5–10 μ l, 2–20 μ l, 20–200 μ l (EPPENDORF)
- Analytické váhy (BOECO)
- Centrifuga Rotanta 460 (HETTICH)
- Elektroforetická komůrka S2 (WHATMAN BIOMETRA)
- Elektroforetický zdroj LKB (PHARMACIA)

- Chladnička kombinovaná (ELECTROLUX)
- Inkubátor Model B5001 (HERAEUS)
- Mikrovlnná trouba (HEATWAVE)
- Minicentrifuga Mikro 2000 (HETTICH ZENTRIFUGEN)
- NanoDrop ND-2000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- Termocyklér C1000 Touch (BIORAD)
- UV transiluminátor G:Box, dokumentační systém GeneSnap (SYNGENE)
- Vortex FVL - 2400N (BIOSAN)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace DNA Millerovou metodou

1. 9 ml periferní krve v 300 μ l 0,5M EDTA (pH 8).
2. Krev přelít do zkumavky typu Falcon, dolít do 50 ml chlazeným LB pufrem, nechat lyzovat při pokojové teplotě (RT) 15 min.
3. Krev centrifugovat při 1000 g 30 min a supernatant slít.
4. Přidat 5 ml chlazeného LB pufru, sediment s LB pufrem důkladně protřepat, centrifugovat při 1000 g 10 min. Supernatant slít, sediment jemně opláchnout chlazeným LB pufrem a nechat zkumavky otočené dnem nahoru okapat.
5. K sedimentu přidat 3 ml NLB, 50 μ l proteinasy K (20 μ g/ μ l), 150 μ l 20% SDS, důkladně protřepat.
6. Inkubovat přes noc v termostatu při 37 °C.
7. Přidat 1000 μ l 6M NaCl, 15 s důkladně protřepávat.
8. Centrifugovat při 5000 g 15 min.
9. Supernatant slít do 10ml zkumavky a centrifugovat při 5000 g 15 min.
10. Supernatant slít do čisté 15ml zkumavky a doplnit vychlazeným 96% ethanolem.
11. Pomalu převracet zkumavku až do vysrážení DNA.
12. Sraženou DNA přenést do 1,5 ml zkumavky se 70% lihem a centrifugovat při 14000 g 5 min.
13. Opatrně etanol slít a nechat volně uschnout.
14. DNA rozpustit v TE pufru (na 1 ml výchozí krve přidat 50 μ l TE pufru) a uchovávat při -20 °C.

4.4.2 PCR amplifikace genomické DNA

Celkově bylo použito 5 párů “Forward” (F) a “Reverse” (R) primerů (viz tabulka 3) o pracovní koncentraci 0,4 μ M.

- **Provedení LR-PCR dle publikace - Ozcelik *et al.*, 2012**

Součástí každé reakce byla amplifikace genomické DNA s jedním párem testovaných primerů, které byly přidány do PCR reakční směsi. Jejich charakteristika je uvedena v tabulce 3. PCR reakční směs byla připravena pro 5 vzorků. Postup práce byl následující:

1. Po rozmražení složky PCR mixu zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Napipetovat reagentie do 1,5ml mikrozkuavek podle tabulky 5 a získanou PCR reakční směs zvortexovat a zcentrifugovat.
3. Do 5 připravených PCR mikrozkuavek rozpipetovat po 22 μ l PCR reakční směsi.
4. Do každé PCR mikrozkuavky připipetovat 1 μ l primeru F a 1 μ l primeru R v pořadí podle tabulky 3 a přidat 1 μ l genomické DNA pacienta.
5. Mikrozkuavky vložit do pozic v termocykleru podle tabulky 6 s časovým a teplotním profilem nastaveným dle tabulky 7.

Tabulka 5: Složení PCR reakční směsi pro 5 vzorků.

Složky PCR mixu	Objem pro 1 vzorek [μ l]	Objem pro 5 vzorků [μ l]
Voda zbavená RNáz	18,05	90,25
Long-range PCR pufr s ionty MgCl ₂	2,50	12,50
Roztok dNTPs	1,25	6,25
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	0,20	1,00
Celkem	22,00	110,00

Tabulka 6: Použitý teplotní gradient pro teploty nasedání primerů a umístění vzorků v termocykleru.

Termocykler - pozice	Teplota [°C]	Vzorek
A	63,0	-
B	62,5	-
C	61,3	BRCA2_E17–20
D	59,4	-
E	56,9	-
F	55,0	BRCA1_E7–5, BRCA2_E25, BRCA2_E26–27
G	53,7	-
H	53,0	BRCA1_E24–21

Tabulka 7: Podmínky PCR v termocykleru.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	93	3 min	1
Denaturace	93	15 s	9
Nasedání primerů	53–63	30 s	
Elongace	68	14 min	
Denaturace	93	15 s	28
Nasedání primerů	53–63	30 s	
Elongace	68	14 min + 20 s/cyklus	
Chlazení	4	∞	

- **Provedení LR-PCR dle podmínek z publikace - Ozcelik *et al.*, 2012 s přidáním Q-solution**

Následně byla PCR provedena pro 4 vzorky s přidáním Q-solution. Postup práce byl stejný jako u předchozí reakce, ale reakční směs byla napipetována podle tabulky 8 a byl vynechán pár primerů BRCA2_E26–27.

Tabulka 8: Složení PCR reakční směsi pro 4 vzorky s přidáním Q-solution.

Složky PCR mixu	Objem pro 1 vzorek [μl]	Objem pro 4 vzorky [μl]
Voda zbavená RNáz	13,05	52,20
Long-range PCR pufr s ionty MgCl ₂	2,50	10,00
Roztok dNTPs	1,25	5,00
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	0,20	0,80
Q-solution	5,00	20,00
Celkem	22,00	88,00

- **Optimalizace teploty nasedání primerů bez Q-solution**

Každá reakce sestávala z amplifikace genomické DNA od pacienta s jedním párem testovaných primerů. Postup práce byl stejný jako u předchozí reakce, ale bylo připraveno celkem 12 vzorků (3 vzorky pro každý ze 4 párů primerů). Reakční směs byla připravena podle tabulky 9 a primery o objemu 1 μl byly připipetovány do očíslovaných mikrozkušavek podle tabulky 10. Teplotní gradient T_a byl zvolen v rozmezí 50–70 °C podle tabulky 11. Mikrozkušavky byly vloženy do pozic v termocykleru podle tabulky 10 s časovým a teplotním profilem nastaveným dle tabulky 12.

Tabulka 9: Složení PCR reakční směsi pro 12 vzorků.

Složky PCR mixu	Objem pro 1 vzorek [μ l]	Objem pro 12 vzorků [μ l]
Voda zbavená RNáz	18,05	216,60
Long-range PCR pufr s ionty MgCl ₂	2,50	30,00
Roztok dNTPs	1,25	15,00
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	0,20	2,40
Celkem	22,00	264,00

Tabulka 10: Použité primery, pořadí vzorků, jejich umístění v termocykleru a T_a.

Použité primery	Vzorek	Pozice v termocykleru	T _a [° C]
BRCA1_E7-5	1	A	70,0
	2	C	66,6
	3	D	62,6
BRCA1_E24-21	4	E	57,8
	5	F	53,9
	6	H	50,0
BRCA2_E17-20	7	A	70,0
	8	C	66,6
	9	D	62,6
BRCA2_E25	10	A	70,0
	11	C	66,6
	12	D	62,6

Tabulka 11: Použitý teplotní gradient.

Termocykler	Teplota [°C]	Vzorek
A	70,0	BRCA1_E7–5
B	68,8	-
C	66,6	BRCA1_E24–21
D	62,6	-
E	57,8	BRCA2_E17–20
F	53,9	-
G	51,3	-
H	50,0	BRCA2_E25

Tabulka 12: Podmínky PCR v termocykleru.

Počáteční denaturace	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	93	3 min	1
Denaturace	93	15 s	9
Nasedání primerů	50-70	30 s	
Elongace	68	6 min	
Denaturace	93	15 s	28
Nasedání primerů	50-70	30 s	
Elongace	68	14 min + 20 s/cyklus	
Chlazení	4	∞	

- **Optimalizace teploty nasedání primerů s přidáním Q-solution**

Následně byla PCR provedena pro 4 vybrané vzorky (1, 5, 7 a 12 dle tabulky 10) s přidáním Q-solution. Postup práce byl stejný jako u předchozí reakce. Reakční směs byla připravena podle tabulky 13, použitý teplotní gradient a umístění vzorků v termocykleru podle tabulky 11 a podmínky v termocykleru podle tabulky 12.

Tabulka 13: Složení PCR reakční směsi pro 4 vzorky.

Složky PCR mixu	Objem pro 1 vzorek [μl]	Objem pro 4 vzorky [μl]
Voda zbavená RNáz	13,05	52,20
Long-range PCR pufr s ionty MgCl ₂	2,50	10,00
Roztok dNTPs	1,25	5,00
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	0,20	0,80
Q-solution	5,00	20,00
Celkem	22,00	88,00

4.4.3 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace

Po každé amplifikaci genomické DNA následovala separace PCR produktů pomocí agarózové elektroforézy. Postup pro přípravu 0,7% agarózového gelu a provedení agarózové elektroforézy PCR produktů:

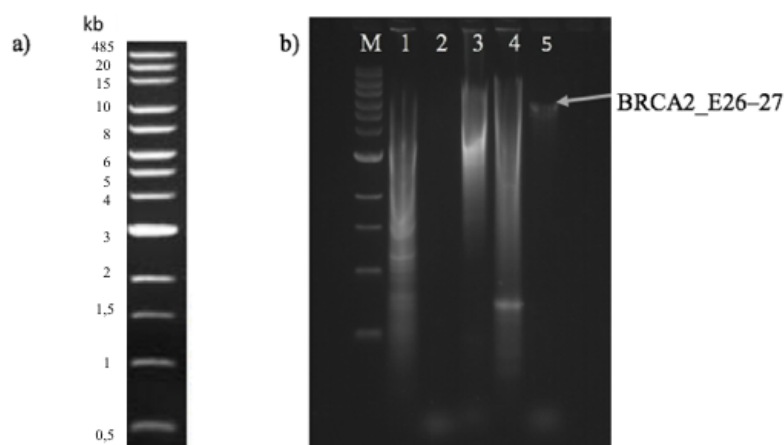
1. Navážit 1,68 g agarózy, rozpustit ve 240 ml 1x TBE pufru a následně rozpustit v mikrovlnné troubě (cca 4 minuty).
2. Do 240 ml rozvařeného agarózového gelu (cca 50 °C) přidat 12 μl pracovního roztoku GoodView (GoodView™ GelRed Nucleic Acid Stain, SBS Genetech), promíchat, nalít do připravené vaničky a nechat ztuhnout.
3. Do první jamky pipetovat 10 μl standardu relativní molekulového hmotnosti (Quick - Load 1 kb Extend DNA ladder, Biolabs). 10 μl PCR produktu smíchat s 3 μl vzorkovacího roztoku a napipetovat do dalších jamek v gelu (13 μl/jamka).
4. Elektroforetickou separaci nechat probíhat přibližně 3 hodiny při stejnosměrném napětí 50 V a 2 hodiny při stejnosměrném napětí 60 V.
5. PCR produkty vizualizovat pomocí UV transiluminátoru (G:Box, Syngene), zhotovit fotografii gelu digitální kamerou s využitím softwaru Gelcapture (DNR BIO IMAGY SYSTEM).

5 Výsledky

Tato bakalářská práce byla zaměřena na získání hodnot optimální teploty pro nasednutí primerů při LR-PCR k amplifikaci vybraných úseků DNA. Bylo testováno 5 párů primerů vybraných oblastí genů *BRCA1/2*, a to konkrétně a) primer BRCA1_E7–5, b) primer BRCA1_E24–21, c) primer BRCA2_E17–20, d) primer BRCA2_E25 a za e) primer BRCA2_E26–27. Optimalizace LR-PCR spočívala v proběhnutí PCR při různých teplotách nasedání primerů a ve využití tzv. Q-solution.

- **Provedení LR-PCR dle publikace - Ozelik *et al.*, 2012**

Při první LR-PCR, kdy byly dodrženy stejné podmínky jako ve výše uvedené publikaci, byl identifikován specifický amplikon pouze v případě při použití primerů BRCA2_E26–27, kterých T_a byla 55 °C (viz obrázek 8).



Obrázek 8: Výsledný elektroforeogram první LR-PCR. a) Legenda ke Quick-load 1 kb extend DNA ladder, b) Výsledný elektroforeogram PCR produktů 5 vzorků za použití 5 párů primerů bez přidání Q-solution.

Legenda: kb: kilobáze, M: Quick-load 1 kb extend DNA ladder; 1: primer BRCA1_E7–5; 2: primer BRCA1_E24–21, 3: primer BRCA2_E17–20, 4: primer BRCA2_E25, 5: primer BRCA2_E26–27

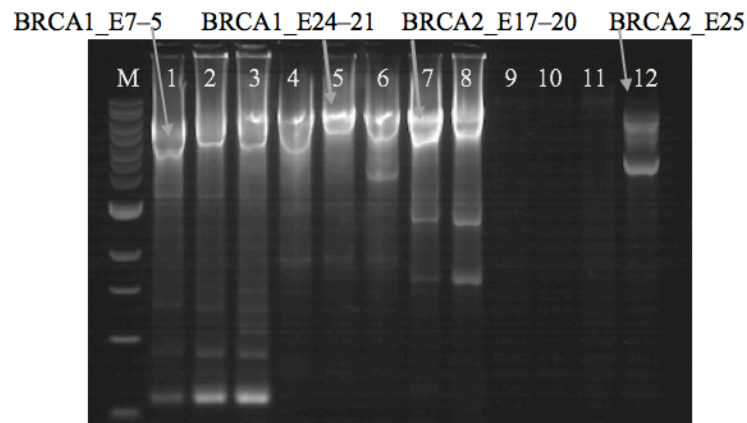
Z důvodu přítomnosti nespecifických “pruhů” u dalších vzorků jsme se rozhodli zkusit zvýšit specifitu reakce využitím Q-solution za dodržení stejných podmínek reakce.

- **Provedení LR-PCR dle publikace - Ozelik *et al.*, 2012 s přidáním Q-solution**

Následující PCR probíhala při stejných teplotách, ale s přidáním Q-solution do reakční směsi, přičemž došlo k inhibici celé reakce a nebyl viditelný žádný produkt. Proto jsme upustili od publikovaných podmínek a rozhodli se otestovat různé T_a .

- **Optimalizace teploty nasedání primerů bez Q-solution**

Při LR-PCR, která probíhala při T_a 50–70 °C, byl identifikován amplicon exonů 7–5 genu *BRCA1* při T_a 70 °C, amplicon exonů 24–21 genu *BRCA1* při T_a 53,9 °C, amplicon exonů 17–20 genu *BRCA2* při T_a 70 °C a amplicon exonu 25 genu *BRCA2* T_a 62,6 °C (viz obrázek 9).



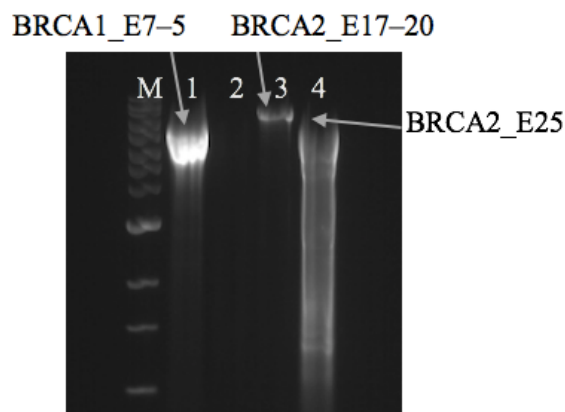
Obrázek 9: Výsledný elektroforeogram PCR produktů 12 vzorků za použití 4 párů primerů bez přidání Q-solution.

Legenda: M: Quick-load 1 kb extend DNA ladder; 1,2,3: primer BRCA1_E7–5; 4,5,6: primer BRCA1_E24–21, 7,8,9: primer BRCA2_E17–20, 10,11,12: primer BRCA2_E25, 5: primer BRCA2_E26–27

Kvůli vzniku nespecifických produktů byly tyto 4 páry primerů použity i v následující LR-PCR, ale s přidáním Q-solution do reakční směsi, protože Q-solution zvyšuje specifitu reakce.

- **Optimalizace teploty nasedání primerů s přidáním Q-solution**

Podmínky, při kterých v předchozí reakci vznikly PCR produkty, byly využity pro další testování primerů na zvyšování specifity reakce pomocí přídatku Q-solution do reakce (viz obrázek 10).



Obrázek 10: Výsledný elektroforeogram PCR produktů 4 vzorků za použití 4 párů primerů s Q-solution.

Legenda: M: Quick-load 1 kb extend DNA ladder; 1: primer BRCA1_E7-5; 2: primer BRCA1_E24-21, 3: primer BRCA2_E17-20, 4: primer BRCA2_E25

Po provedení výše uvedených reakcí byly získány specifické produkty pro 4 z 5 (80%) testovaných párů primerů. Výsledné vhodné podmínky pro LR-PCR jsou přehledně shrnuty v tabulce 14.

Tabulka 14: Výsledné hodnoty T_a pro jednotlivé páry primerů.

Číslo	Gen	Amplifikované exony	Délka amplikonu [bp]	Zjištěná vhodná T_a [°C]
1	<i>BRCA1</i>	7-5	8 933	70,0*
2	<i>BRCA1</i>	24-21	12 869	53,9
3	<i>BRCA2</i>	17-20	11 780	70,0*
4	<i>BRCA2</i>	25	14 010	62,6*+
5	<i>BRCA2</i>	26-27	5 778	55,0

Legenda: * do PCR reakční směsi byl přidán Q-solution, + přítomnost nespecifických PCR produktů.

6 Diskuze

HBOC bývá v relativně velké míře zapříčiněn mutacemi v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Část z těchto mutací představují velké přestavby daných genů. Z tohoto důvodu je nutné v rámci běžné diagnostiky testovat i tyto varianty. Jako jedna z metod vhodných pro tento účel se využívá LR-PCR (Shiovitz *et Korde*, 2015).

PCR je laboratorní metoda, která zahrnuje několik na sebe navazujících kroků (denaturace, nasednutí primerů, syntéza DNA) vyžadujících dodržení přesných parametrů (fyzikálních i chemických) k jejímu zdárnému průběhu. Velice důležité je stanovení optimální teploty potřebné pro optimální nasednutí primerů - tzv. *annealing* teploty (T_a). Jestliže T_a nedosahuje správné hodnoty, mohou vzniknout nespecifické produkty a dojde ke zkreslení výsledku (příliš nízká T_a), anebo se produkt vůbec nenasyntetizuje (příliš vysoká T_a). Mimo jiné je závislá na obsahu G+C bází, délce primerů a teplotě tání PCR produktu (Šmarda *et al.*, 2005). Nesprávně provedena optimalizace má vliv na nepřesný průběh amplifikace, projevující se přítomností nespecifických pruhů, nízké účinnosti a v tvorbě tzv. primer - dimerů (Průša, 1997).

Nejdřív jsem se rozhodla otestovat podmínky doporučené autory publikace, ze které jsem původně vycházela (Ozcelik *et al.* 2012). Z pěti mnou testovaných párů primerů odpovídal nastaveným podmínkám pouze 1 (20 %), konkrétně BRCA2_E26-27 při T_a 55 °C. V případě neúspěšné amplifikace jsem u dalších čtyř párů primerů pokračovala v optimalizaci reakce, a to hlavně ve hledání vhodné T_a . Specifické produkty jsem získala pro primery BRCA1_E7–5 a BRCA2_17–20 při T_a 70 °C a BRCA1_E24–21 při T_a 53,9 °C.

Pro shodné délky ampliconů o velikosti 12,9 kb a 5,8 kb byl v práci Jia *et al.* při použití stejných primerů hodnocen průběh PCR při výrobcem doporučené T_a rovněž za použití PCR kitu QIAGEN. (Jia *et al.*, 2014). Hodnoty T_a byly 54 °C pro 12,9 kb a 54,5 °C pro 5,8 kb. Výsledný produkt byl identifikován pouze pro velikost ampliconu 5,8 kb a ne pro 12,9 kb. Ve srovnání s hodnotami získanými v naší práci se T_a pro primery BRCA2_E26–27 s délkou ampliconu 5,8 kb odlišuje pouze o 0,5 °C (55°C vs. 54,5 °C). Pro primery BRCA1_E24–21 s délkou ampliconu 12,9 kb pouze o 0,1 °C (53,9 °C vs. 54 °C). Výsledné hodnoty T_a jsou téměř shodné se mnou získanými hodnotami (viz tabulka 15).

Odlišné jsou však hodnoty T_a v práci Ozcelika (Ozcelik *et al.*, 2012), ze které jsem vycházela. Ozcelik *et al.* získali specifické amplikony délky 8,9 kb při 55°C, 12,9 kb při 60 °C, 11,8 kb při 61 °C, 14 kb a 5,8 kb při 55 °C. Ve srovnání se mnou naměřenými hodnotami je rozdíl v T_a téměř pro všechny amplikony, kromě již zmíněného amplikonu délky 5,8 kb (viz tabulka 15). Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben použitím rozdílných reakčních kitů obsahujících odlišné polymerázy (Invitrogen vs. QIAGEN).

V další srovnávané práci (Hernan *et al.*, 2012) autorka prováděla měření při T_a stanovené výrobcem (Expand Long Template PCR System Roche), avšak při použití jiných primerů. T_a pro jednotlivé amplikony *BRCA1/2* genů byla 61 °C pro 11,6 kb (primer BRCA1_E20–24), 62,8 °C pro 9,4 kb (primer BRCA1_E2–3) a 63,2 °C pro 12,7 kb (primer BRCA1_E11–13) viz tabulka 15. Průměrná odchylka teplot ve srovnání se mnou získanými hodnotami je výrazná (až 10 °C). Toto zjištění však není překvapující, protože jimi použité primery s odlišnou sekvencí mají rozdílnou teplotu tání (T_m), a tedy i T_a .

Tabulka 15: Srovnání výsledků T_a získaných při LR-PCR a výsledků publikovaných v literatuře.

Délka amplikonu [bp]	Zjištěná T_a [°C]	T_a - Jia [°C]	T_a - Ozcelik [°C]	T_a - Hernan [°C]
Výrobce kitu	QIAGEN	QIAGEN	Invitrogen	Roche
8 933	70,0	-	55,0	62,8
12 869	53,9	54,0 - bez produktu	60,0	63,2
11 780	70,0	-	61,0	61,0
14 010	62,6	-	55,0	-
5 778	55,0	54,5	55,0	-

Pro přesnější porovnání a zhodnocení mnou získaných T_a bude potřeba tyto reakční podmínky u výše uvedených reakcí ověřit na větším souboru vzorků. Jestli se mé výsledky potvrdí, bude možno zařadit takto zoptimalizovanou LR-PCR do běžných vyšetřovacích postupů genů *BRCA1* a *BRCA2* na Ústavu lékařské genetiky v Olomouci.

7 Závěr

Problematika detekce hereditárních nádorů je v současnosti velmi aktuální, jak pro volbu adekvátní léčby, tak pro volbu správného preventivního programu pro pacienta i pro nejbližší rodinné příslušníky. Vzhledem k tomu, že onemocnění vznikající v rámci hereditárních nádorů postihují především mladé jedince a jsou velmi agresivní, má včasná detekce a léčba rozhodující vliv na přežití pacienta. V práci jsem vypracovala přehled problematiky týkající se genů zodpovědných za vznik hereditárních nádorů a metody detekce jejich poškození. Poté jsem v praxi provedla optimalizaci LR-PCR vybraných exonů *BRCA1/2* genů. Konkrétně byla optimalizována T_a při LR-PCR pomocí gradientu a následně byla provedena agarózová elektroforéza k separaci a vizualizaci získaných amplikonů.

Při zhotovení reakce dle publikace Ozcelik *et al.*, byl identifikován specifický amplikon pouze při použití primeru BRCA2_E26–27, kdy byla zjištěna T_a 55 °C. Následně byla optimalizována teplota nasedání primerů bez Q-solution, kdy byl identifikován specifický amplikon při použití primerů BRCA1_E7–5 při T_a 70 °C, primerů BRCA1_E24–21 při T_a 53,9 °C a primerů BRCA2_E17–20 při T_a 70 °C

Na optimalizaci PCR má rovněž vliv délka amplikonů, vlastnosti primerů, koncentrace Mg^{2+} iontů a DNA polymerázy dané výrobcem, které však v rozsahu mé práce nebyly testovány.

8 Literatura

- Anderson, D. E. (1992). Familial versus sporadic breast cancer. *Cancer*, 70(S4), 1740-1746.
- Annunziata, C. M., Bates, S. E. (2010). PARP inhibitors in BRCA1/BRCA2 germline mutation carriers with ovarian and breast cancer. *F1000 biology reports*, 2.
- Antoniou, A. C., Easton, D. F. (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*, 25(43), 5898-5905.
- ARUP Scientific Resource for Research and Education. [online] [navštíveno dne 21.3.2018] Dostupné z <http://arup.utah.edu/database/BRCA/>
- Barrois, M., Bieche, I., Mazoyer, S., Champème, M. H., Bressac-de Paillerets, B., Lidereau, R. (2004). Real-time PCR-based gene dosage assay for detecting BRCA1 rearrangements in breast-ovarian cancer families. *Clinical genetics*, 65(2), 131-136.
- Balmana, J., Diez, O., Rubio, I. T., Cardoso, F., ESMO Guidelines Working Group. (2011). BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology*, 22 (suppl_6), vi31-vi34.
- Barnes, W. M. (1992). The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene*, 112(1), 29-35.
- BRCA Hereditary Cancer MASTR Plus. [online] [navštíveno dne 4.1.2018] Dostupné z <http://www.genetica.cz/multiplicom-->
- Breast Cancer Information Core internet web site. [online] [navštíveno dne 4.1.2018] Dostupné z <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>
- Casilli, F., Di Rocco, Z. C., Gad, S., Tournier, I., Stoppa-Lyonnet, D., Frebourg, T., Tosi, M. (2002). Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Human mutation*, 20(3), 218-226.
- ClinVar. [online] [navštíveno dne 4.1.2018] Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

Crompton, D., Rehal, P. K., MacPherson, L., Foster, K., Lunt, P., Hughes, I., Brady, A. F., Pike, M. G., De Greesi, S., Morgan, N. V., Hardy, C., Smith, M., MacDonald, F., Maher, E. R., Kurian, M. A (2010). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis is an effective tool for the detection of novel intragenic PLA2G6 mutations: implications for molecular diagnosis. *Molecular genetics and metabolism*, 100(2), 207-212.

Engert, S., Wappenschmidt, B., Betz, B., Kast, K., Kutsche, M., Hellebrand, H., Goecke, T. O., Kiechle, M., Niederacher, D., Schmutzler, R. K., Meindl, A. (2008). MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. *Human mutation*, 29(7), 948-958.

Fearon, E. R., Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767.

Ford, J. M. (2012). Is breast cancer a part of Lynch syndrome?. *Breast Cancer Research*, 14(4), 110.

Gad, S., Aurias, A., Puget, N., Mairal, A., Schurra, C., Montagna, M., Caux, V., Mazoyer, S., Bensimon, A., Stoppa-Lyonnet, D. (2001). Color bar coding the BRCA1 gene on combed DNA: a useful strategy for detecting large gene rearrangements. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 31(1), 75-84.

Genetic home reference. [online] [navštíveno dne 22.2.2018] Dostupné z <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SLITRK6#location>

Gille, J. J. P., Hogervorst, F. B. L., Pals, G., Wijnen, J. T., Van Schooten, R. J., Dommering, C. J., Meijer, G.A., Craanen, M. E., Nederlof, P. M., de Jong, D., McElgunn C. J., Schouten, J. P., Menko F. H. (2002). Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *British journal of cancer*, 87(8), 892.

Guha, T., Malkin, D. (2017). Inherited TP53 Mutations and the Li-Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a026187.

Hartmann, C., John, A. L., Klaes, R., Hofmann, W., Bielen, R., Koehler, R., Janssen, B., Bartram, C. R., Arnold, N., Zschocke, J. (2004). Large BRCA1 gene deletions are found in 3% of German high-risk breast cancer families. *Human mutation*, 24(6), 534-534.

- Heather, J. M., Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8.
- Hernan, I., Borràs, E., de Sousa Dias, M., Gamundi, M. J., Mañé, B., Llorc, G., Agúndez, J. A., Blanca, M., Carballo, M. (2012). Detection of genomic variations in BRCA1 and BRCA2 genes by long-range PCR and next-generation sequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 14(3), 286-293.
- Hogervorst, F. B., Nederlof, P. M., Gille, J. J., McElgunn, C. J., Grippeling, M., Pruntel, R., Regnerus, R., van Welsem, T., van Spaendonk, R., Menko, F. H., Kluijdt, I., Dommering, C., Verhoef, S., Schouten, J.P., van't Veer, L. J., Pals, G. (2003). Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer research*, 63(7), 1449-1453.
- Hsu, N. C., Huang, Y. F., Yokoyama, K. K., Chu, P. Y., Chen, F. M., Hou, M. F. (2013). Methylation of BRCA1 promoter region is associated with unfavorable prognosis in women with early-stage breast cancer. *PLoS One*, 8(2), e56256.
- Huyton, T., Bates, P.A., Zhang, X., Sternberg, M.J., Freemont, P.S. (2000) The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. *Mutation Research/DNA Repair*, 460(3-4), 319-332.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., Higuchi, R. (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5695-5699.
- Jia, H., Guo, Y., Zhao, W., Wang, K. (2014). Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. *Scientific reports*, 4, 5737.
- Klener, P., Klener jr, P. (2010). Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Grada Publishing as., Praha.
- Knierim, E., Lucke, B., Schwarz, J. M., Schuelke, M., Seelow, D. (2011). Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. *PloS one*, 6(11), e28240.
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820-823.

- Knudson, A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(2), 157-162.
- Kývalová M. (2011): Sekvenační metody nové generace: jejich principy a potenciální využití v genetice člověka, etické aspekty. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (63).
- MacCarthy, A., Draper, G. J., Steliarova-Foucher, E., Kingston, J. E. (2006). Retinoblastoma incidence and survival in European children (1978–1997). Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer*, 42(13), 2092-2102.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Human Genetics*, 9, 387-402.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376.
- Matthijs, G., Souche, E., Alders, M., Corveleyn, A., Eck, S., Feenstra, I., Race, V., Sijm, E., Sturm, M., Weiss, M., Yntema, H., Bakker, E., Scheffer, H., Bauer, P., EuroGentest, European Society of Human Genetics. (2016). Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *European Journal of Human Genetics*, 24(1), 2.
- Maxwell, K. N., Wubbenhorst, B., Wenz, B. M., De Sloover, D., Pluta, J., Emery, L., Barrett, A., Kraya, A. A., Anastopoulos, I. N., Yu, S., Jiang, Y., Chen, H., Zhang, N. R., Hackman, N., D'Andrea, K., Daber, R., Morrissette, J. J. D., Mitra, N., Feldman, M., Domchek, S. M., Nathanson, K. L. (2017). BRCA locus-specific loss of heterozygosity in germline BRCA1 and BRCA2 carriers. *Nature communications*, 8(1), 319.

Mazoyer, S. (2005). Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Human mutation*, 25(5), 415-422.

Meijers-Heijboer, H., Van den Ouweland, A., Klijn, J., Wasielewski, M., de Snoo, A., Oldenburg, R., Hollestelle, A., Houben, M., Crepin, E., van Veghel-Plandsoen, M., Elstrodt, F., van Duijn, C., Bartels, C., Meijers, C., Schutte, M., McGuffog, L., Thompson, D., Easton, D., Sodha, N., Seal, S., Barfoot, R., Mangion, J., Chang-Claude, J., Eccles, D., Eeles, R., Evans, D. G., Houlston, R., Murday, V., Narod, S., Peretz, T., Peto, J., Phelan, C., Zhang, H. X., Szabo, C., Devilee, P., Goldgar, D., Futreal, P. A., Nathanson, K. L., Weber, B., Rahman, N., Stratton, M. R., CHEK2-Breast Cancer Consortium (2002). Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2* 1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nature genetics*, 31(1).

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies-the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31.

Meza, J. E., Brzovic, P. S., King, M. C., Klevit, R. E. (1999). Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. *Journal of Biological Chemistry* 274(9), 5659-5665.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266(5182), 66-71.

Miki, Y., Katagiri, T., Kasumi, F., Yoshimoto, T., Nakamura, Y. (1996). Mutation analysis in the BRCA2 gene in primary breast cancers. *Nature genetics*, 13(2), 245-247.

Montagna, M., Palma, M. D., Menin, C., Agata, S., De Nicolo, A., Chieco-Bianchi, L., D'andrea, E. (2003). Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Human molecular genetics*, 12(9), 1055-1061.

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) [online] [navštíveno dne: 6.1.2018] Dostupné z https://www.tri-kobe.org/nccn/guideline/gynecological/english/genetic_familial.pdf

Newman, B., Austin, M. A., Lee, M., King, M. C. (1988). Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(9), 3044-3048.

Ozcelik, H., Shi, X., Chang, M. C., Tram, E., Vlasschaert, M., Di Nicola, N., Kiselova A., Yee D., Goldman, A., Dowar, M., Sukhu, B., Kandel, R., Siminovitch, K. (2012). Long-range PCR and next-generation sequencing of BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 14(5), 467-475.

Payne, S. R., Newman, B., King, M. C. (2000). Complex germline rearrangement of BRCA1 associated with breast and ovarian cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 29(1), 58-62.

Petrucelli, N., Daly, M. B., Pal, T. (2016). BRCA1-and BRCA2-associated hereditary breast and ovarian cancer.

Petrij-Bosch, A., Peelen, T., van Vliet, M., van Eijk, R., Olmer, R., Drüsedau, M., Hogervorst, F. B., Hageman, S., Arts, P. J., Lightenberg, M. J., Meijers-Heijboer, H., Klijn, J. G., Vasen, H. F., Cornelisse, C. J., van't Veer L. J., Bakker, E., van Ommen, G. J., Devilee, P. (1997). BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nature genetics*, 17(3), 341.

Plevová, P., Novotný, J., Petráková, K., Palácová, M., Kalábová, R., Schneiderová, M., Foretová, L. (2009). Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií. *Klinická Onkologie*, 22, 8-11.

Průša, R. (1997). *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*, 2. lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED spol. s r. o., Praha.

Puget, N., Stoppa-Lyonnet, D., Sinilnikova, O. M., Pagès, S., Lynch, H. T., Lenoir, G. M., Mazoyer, S. (1999). Screening for germ-line rearrangements and regulatory mutations in BRCA1 led to the identification of four new deletions. *Cancer research*, 59(2), 455-461.

QIAGEN® LongRange PCR Handbook. [online] [navštíveno dne 28.1.2018]

<https://www.qiagen.com/mx/resources/resourcedetail?id=e90c8e4b-f3c4-4876-a320-9890aaec1e17&lang=en>

- Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T., Jayatilake, H., McGuffog, L., Hanks, S., Evans, D. G., Eccles, D.; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton, D. F., Stratton, M. R. (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature genetics*, 39(2), 165-167.
- Renwick, A., Thompson, D., Seal, S., Kelly, P., Chagtai, T., Ahmed, M., North, B., Jayatilake, H., Barfoot, R., Spanova, K., McGuffog, L., Evans, D. G., Eccles, D.; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton, D. F., Stratton, M. R., Rahman, N. (2006). ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nature genetics*, 38(8), 873-875
- Roy, R., Chun, J., Powell, S. N. (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*, 12(1), 68.
- Ryland, G. L., Doyle, M. A., Goode, D., Boyle, S. E., Choong, D. Y., Rowley, S. M., Li, J.; Australian Ovarian Cancer Study Group, Bowtell, D.D., Tothill, R.W., Campbell, I.G. Goringe, K.L. (2015). Loss of heterozygosity: what is it good for?. *BMC medical genomics*, 8(1), 45.
- Seal, S., Thompson, D., Renwick, A., Elliott, A., Kelly, P., Barfoot, R., Chagtai, T., Jayatilake, H., Ahmed, M., Spanova, K., North, B., McGuffog, L., Evans, D. G., Eccles, D, Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton, D. F., Stratton, M. R., Rahman, N., Easton, D.F., Stratton, M.R., Rahman, N. (2006). Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Natural Genetics*, 38(11), 1239.
- Sellner, L. N., Taylor, G. R. (2004). MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Human mutation*, 23(5), 413-419.
- SOPHiA GENETICS. [online] [navštíveno dne 28.1.2018] Dostupné z <https://www.sophiagenetics.com/list-of-diseases.html#illness-hereditary-cancer>
- Shiovitz, S., Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*, 26(7), 1291-1299.
- Shulman, L. P. (2010). Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): clinical features and counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch syndrome, Cowden syndrome, and Li-Fraumeni syndrome. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 37(1), 109-133.

Scheuer, L., Kauff, N., Robson, M., Kelly, B., Barakat, R., Satagopan, J., Ellis, N., Hensley, M., Boyd, J., Borgen, P., Norton, L., Offit, K. (2002). Outcome of preventive surgery and screening for breast and ovarian cancer in BRCA mutation carriers. *Journal of Clinical Oncology*, 20(5), 1260-1268.

Schneider, R., Schneider, C., Kloor, M., Fürst, A., Möslin, G. (2012). Lynch syndrome: clinical, pathological, and genetic insights. *Langenbeck's archives of surgery*, 397(4), 513-525.

Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research*, 30(12), e57-e57.

Schuster, S. C. (2007). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature methods*, 5(1), 16.

Soukupová, J., Zemánková, P., Kleiblová, P., Janatová, M., Kleibl, Z. (2016). CZE CANCA: CZEch CAncer paNel for Clinical Application—návrh a příprava cíleného sekvenčního panelu pro identifikaci nádorové predispozice u rizikových osob v České republice. *Klinická Onkologie*, 29.

Stratton, M. R., Rahman, N. (2008). The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature genetics*, 40(1), 17-22.

Snustad, D. P., Simmons, M. J. (2009). Genetika. 5. aktualizované vydání. Masarykova Univerzita, Brno

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (2005). Metody molekulární biologie. 1. vydání. Masarykova univerzita, Brno

Tan, Y. C., Michael, A., Blumenfeld, J., Donahue, S., Parker, T., Levine, D., Rennert, H. (2012). A novel long-range PCR sequencing method for genetic analysis of the entire PKD1 gene. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 14(4), 305-313.

The human gene mutation database (HGMD®). [online] [navštíveno dne 28.1.2018] Dostupné z <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

Thermo Fischer scientific. [online] [navštíveno dne 28.1.2018] Dostupné z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/ion-torrent.html>

- Toss, A., Cortesi, L. (2013). Molecular mechanisms of PARP inhibitors in BRCA-related ovarian cancer. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 5(11), 409-416.
- Vašíčková, P., Macháčková, E., Lukešová, M., Damborský, J., Horký, O., Pavlu, H., Kuklová, J., Kosinová, V., Navrátilová, M., Foretová, L. (2007). High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic. *BMC medical genetics*, 8(1), 32.
- Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., , Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., Fields, P. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265(5181), 2088-2091.
- Yang, X., Lippman, M. E. (1999) BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *Breast Cancer Research and treatment* 54(1), 1-10.
- Yoshida, K., Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer science*, 95(11), 866- 871.
- Zimovjanová, M. (2009). Hereditární karcinom prsu. *Onkologie*, 3(6), 348-350.