

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2018**

**Gabriela Janýšková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Charakterizace zlomových míst intragenových  
přestaveb genů *BRCA1* a *BRCA2***

**Bakalářská práce**

**Gabriela Janýšková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2018**

**Vedoucí práce: Mgr. Spiros Tavandzis**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala pod vedením Mgr. Spirose Tavandzise samostatně a uvedla všechny literární a odborné zdroje.

V Olomouci dne .....

.....

Gabriela Janýšková

## Souhrn

Cílem této bakalářské práce bylo zjištění přesných pozic zlomů DNA, vedoucích k velkým intragenovým přestavbám v genech reparačního systému *BRCA1*, *BRCA2* a *CHEK2*. Práce vychází z intragenových přestaveb, které byly zachyceny v diagnostické laboratoři při rutinních vyšetřeních a je rozdělena do dvou částí. Teoretická část se věnuje literární rešerši jednotlivých genů, jejich struktuře a funkci a shrnuje záchyty různých přestaveb v těchto genech v rámci Evropy i ve světě. Zároveň uvádí možné důvody vzniku těchto změn v DNA ve vztahu k přítomnosti repetitivních sekvencí v genech. Je zde také stručně shrnutá struktura lidského genomu, zvláště pseudogenů a *Alu* elementů, které se v těchto genech vyskytují. V poslední části teoretického úvodu jsou charakterizovány metody molekulární biologie využívané při analýze intragenových přestaveb.

V experimentální části jsou uvedeny výsledky charakterizace zlomových míst ve výše zmíněných třech tumor supresorových genech, včetně obrázků elektroforetických gelů, Sangerových sekvenací a popisu oblastí tvořících přestavbu. V rámci práce byla popsána také intragenová delece genu *BRCA2*, která byla zachycena v ČR poprvé v laboratoři v Novém Jičíně. Ze čtyř záchyťů zjištěných pomocí metody multiplex ligation-dependent probe amplification jsme u tří případů metodami molekulární biologie přesně popsali zlomová místa.

## Summary

The point of this bachelor thesis was to find exact positions of DNA breakpoints, which leads to large genomic rearrangement (LRG) in DNA repair genes *BRCA1*, *BRCA2* and *CHEK2*. This thesis is based on LRGs, which were detected in the diagnostic laboratory during routine examinations and is divided into two parts.

The theoretical part is focused on the literary search of the above mentioned genes, their structure and function, and summarizes the results of various LRGs detected in these genes within Europe and around the world. Thesis subsequently states the possible reasons for these changes in DNA in relation to the presence of repetitive sequences in the genes and briefly summarizes the structure of the human genome, especially pseudogenes and *Alu* elements found in these genes. In the last part of the theoretical introduction, the molecular biology methods used in the analysis of intragenic reconstructions are characterized.

In the experimental part, the results of the characterization of the breakpoints in three tumor suppressor genes, including the images of the electrophoretic gels, the Sanger sequencing results and the description of the regions forming the rearrangement, are presented. The work also described the intragenic deletion of the *BRCA2* gene, which was detected for the first time in Czech Republic. Of the four LRGs detected using the multiplex ligation-dependent probe amplification method, in three cases, molecular biology methods accurately described breakpoints.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Spirovi Tavandzisoovi za odborné vedení, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích. Děkuji také Ing. Petře Cibulkové, Ing. Arpádu Bódayovi a celému týmu za poskytnutí zpracování experimentální části práce na oddělení lékařské genetiky - laboratoře molekulární biologie, Laboratoři Agel a.s. v Novém Jičíně.

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce .....	2
3	Současný stav řešené problematiky .....	3
3.1	Geny reparačních systémů (homologní rekombinace).....	3
3.1.1	Gen <i>BRCA1</i> .....	5
3.1.2	Gen <i>BRCA2</i> .....	6
3.1.3	Gen <i>CHEK2</i> .....	7
3.2	Frekvence výskytu intragenových přestaveb genů <i>BRCA1</i> a <i>BRCA2</i> v různých populacích..	9
3.3	Struktura lidského genomu.....	12
3.4	Pseudogeny .....	13
3.5	Tandemové repetice .....	13
3.5.1	Satelity.....	13
3.5.2	Minisatelity.....	13
3.5.3	Mikrosatelity .....	14
3.6	Rozptýlené repetice - Transpozony .....	14
3.6.1	DNA transpozony.....	15
3.6.2	Retrotranspozony .....	15
3.7	Metody molekulární biologie používané při analýze intragenových přestaveb .....	20
3.7.1	Polymerázová řetězová reakce .....	20
3.7.2	Elektroforetická separace produktů.....	21
3.7.3	Sangerovo sekvenování.....	21
3.7.4	MLPA.....	21
3.7.5	Long-range PCR.....	23
4	Materiál a metodika .....	24
4.1	Použitý materiál a přístroje .....	26
4.1.1	Speciální reagenty.....	26
4.1.2	Běžné reagenty a spotřební materiál .....	27
4.1.3	Použité přístroje.....	27

4.2	Postupy použité při výzkumu .....	28
4.2.1	Navržení primerů v programu PrimerExpress.....	28
4.2.2	Koncentrace a čistota DNA.....	29
4.2.3	Příprava PCR reakční směsi .....	30
4.2.4	Gradientová PCR.....	30
4.2.5	Příprava 1% agarózového gelu.....	32
4.2.6	Agarózová gelová elektroforéza – nanášení PCR produktů na gel .....	32
4.2.7	Vyřezání a extrakce PCR produktu z agarózového gelu .....	33
4.2.8	Enzymatické přečištění PCR produktů.....	33
4.2.9	Sekvenační PCR.....	34
4.2.10	Přečištění sekvenačních produktů magnetickými kuličkami.....	35
4.2.11	Sekvenování na analyzátoru ABI PRISM 3100 Avant .....	35
5	Výsledky .....	36
5.1	Kontrola koncentrace a kvality použité DNA .....	36
5.2	Výsledek charakterizace delece exonů 18-19 genu <i>BRCA1</i> .....	37
5.3	Výsledek charakterizace delece exonů 21-22 genu <i>BRCA1</i> .....	40
5.4	Výsledek charakterizace delece exonů 22-24 genu <i>BRCA2</i> .....	43
5.5	Výsledek charakterizace delece exonů 9-10 genu <i>CHEK2</i> .....	45
6	Diskuze.....	47
7	Závěr .....	50
8	Seznam použité literatury .....	51



## Seznam použitých zkratk

<b><i>Ψ BRCA1</i></b>	pseudogen genu <i>BRCA1</i>
<b>Ala</b>	Alanin
<b>Asp</b>	Asparagová kyselina
<b><i>ATM</i></b>	gen ataxia telangiectasia mutated
<b>blank</b>	slepý vzorek
<b>bp</b>	pár bází
<b><i>BRCA1</i></b>	breast cancer type 1 susceptibility gene
<b><i>BRCA2</i></b>	breast cancer type 2 susceptibility gene
<b>BRCT doména</b>	<i>BRCA1</i> C-koncová doména (BRCA1 C-terminal domain)
<b><i>BRIP1</i></b>	<i>BRCA1</i> interacting protein C-terminal helicase 1
<b>cDNA</b>	komplementární deoxyribonukleová kyselina
<b>dNTP</b>	deoxyribonukleotidtrifosfát
<b>ddNTP</b>	dideoxyribonukleotidtrifosfát
<b>del</b>	delece
<b>delins</b>	inserčně-deleční mutace
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>EDTA</b>	ethylendiamintetraoctová kyselina
<b>ER</b>	estrogenový receptor
<b>ERVs</b>	endogenní retroviry
<b>HER2</b>	transmembránový receptor
<b><i>CHEK2</i></b>	checkpoint kinase 2
<b>Ile</b>	Isoleucin
<b>Ins</b>	inserce
<b>kb</b>	kilobáze
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>Leu</b>	Leucine
<b>LINE-1</b>	long interspersed nuclear elements
<b>LR-PCR</b>	long – range PCR
<b>LRG</b>	large genomic rearrangement
<b>LTR</b>	dlouhé terminální repetitivní sekvence

<b>Mb</b>	megabáze
<b>MLPA</b>	multiplex ligation-depedent probe amplification
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA
<b><i>NBR2</i></b>	neighbor of <i>BRCA1</i> gene 2
<b>NBS1</b>	nijmegen breakage syndrome 1
<b>NLS</b>	jaderný lokalizační signal ( <i>nuclear localization signal</i> )
<b>ORF</b>	otevřený čtecí rámec ( <i>open reading frame</i> )
<b>p53</b>	regulační protein, transkripční faktor
<b><i>PALB2</i></b>	Partner and localizer of <i>BRCA2</i>
<b>Phe</b>	Fenylalanin
<b>PR</b>	progesteronový receptor
<b><i>PTEN</i></b>	Phosphatase and tensin homolog
<b><i>RAD50</i></b>	gen pro udržení genomové integrity
<b><i>RAD51</i></b>	protein účastnící se reparace DNA
<b>Rcf</b>	relativní odstředivá síla
<b>RING</b>	N-konc. doména proteinu <i>BRCA1</i> (really interesting new gene)
<b>SINE</b>	short interspersed nuclear elements
<b>SNS</b>	sympatický nervový systém
<b>SRP</b>	signal recognition particle
<b>STRs</b>	short tandem repeats
<b>Ta</b>	teplota nasedání primerů
<b>TAE</b>	Tris-acetát-EDTA
<b>TBE</b>	Tris-borát-EDTA
<b>TEs</b>	transpozony
<b>Thr</b>	Threonin
<b>Tm</b>	teplota tání
<b>TNBC</b>	triple negativní karcinom prsu
<b><i>TP53</i></b>	tumor supresorový gen
<b>UTR</b>	nepřekládaná oblast ( <i>untranslated region</i> )

## 1 Úvod

Nádor prsu je multifaktoriální onemocnění, za jehož vznik je zodpovědné genetické pozadí organismu a vliv okolního prostředí. V naší populaci je to velmi časté onemocnění, přibližně každá desátá žena onemocní během svého života karcinomem prsu. Velice důležitou roli zde hraje i rodinná anamnéza. Patří mezi nejčastější nádorová onemocnění u žen, nejen v České republice.

Převážná většina nádorů prsu vzniká spontánně v důsledku náhodných genetických událostí v průběhu života. Jen za malou část je zodpovědná genetická predispozice, která je spojená s germinálním poškozením významných tumor supresorových genů *BRCA1* (breast cancer type 1 susceptibility gene) a *BRCA2* (breast cancer type 2 susceptibility gene). Poškození těchto genů vede k vysokému celoživotnímu riziku vzniku nejenom nádorového onemocnění prsu, ale také vaječníků a k vzniku jiných typů nádorů. Patogenní změny DNA vyskytující se v obou genech jsou jednonukleotidové záměny, malé duplikace a delecce nebo velké intragenové přestavby. Tyto velké intragenové přestavby způsobují rozsáhlé delecce nebo inserce celých exonů i intronů a vedou tak k závažnému poškození struktury genů. Protein je při těchto změnách často těžce poškozen, nefunkční nebo nedojde vůbec k jeho syntéze v důsledku předčasné degradace RNA mutované alely.

V rutinní diagnostické laboratoři se standartně neprovádí charakterizace zlomových míst u zjištěných rozsáhlých intragenových přestaveb. Tyto změny nelze detekovat PCR, proto se k jejich odhalení využívá metoda MLPA (multiplex ligation-depedent probe amplification). Na záchyty velkých delecí v genech *BRCA1*, *BRCA2* a *CHEK2* (checkpoint kinase 2), zjištěných při rutinní laboratorní diagnostice pomocí MLPA, navazuje přesná charakterizace těchto míst, která je cílem této bakalářské práce.

## **2 Cíle práce**

1. Sepsat literární přehled o genech reparačního systému *BRCA1*, *BRCA2* a *CHEK2*.
2. Zjistit frekvenci výskytu velkých intragenových přestaveb těchto genů v Evropě a ve světě.
3. Co nejpřesněji charakterizovat zlomová místa velkých intragenových přestaveb genu *BRCA1* a *BRCA2* popř. *CHEK2*, které byly dříve zachyceny metodou MLPA u pacientek s karcinomem prsu.

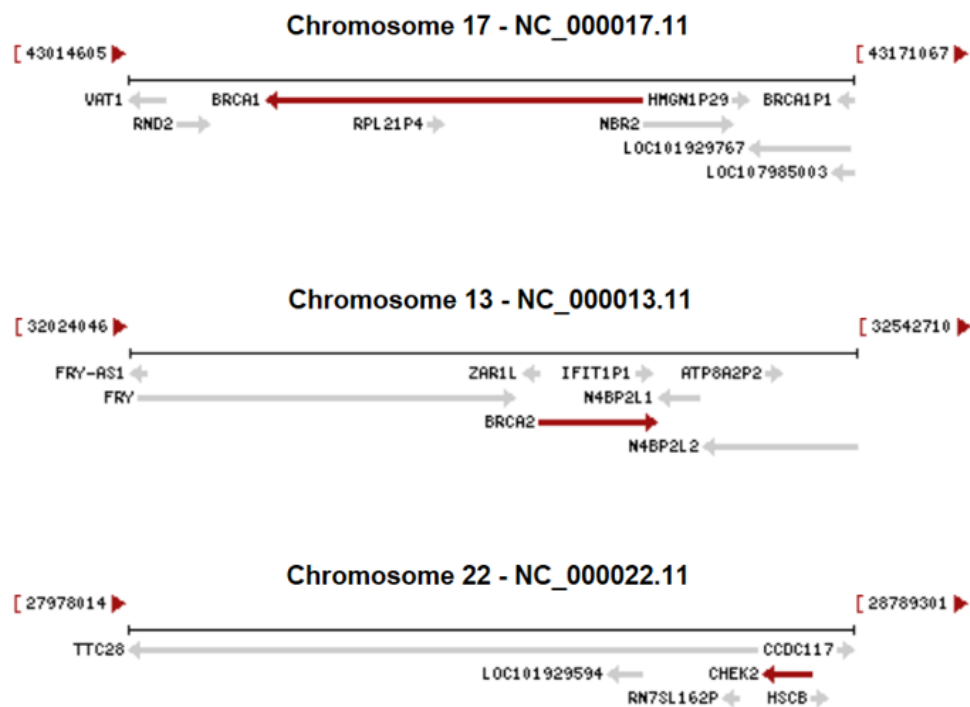
### 3 Současný stav řešené problematiky

#### 3.1 Geny reparačních systémů (homologní rekombinance)

Geny *BRCA1* a *BRCA2* jsou dva z nejvýznamnějších predispozičních genů pro vznik karcinomu prsu nebo vaječníku. Ženy s mutacemi zárodečné linie vykazují zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu a vaječníku (Tinelli *et al.*, 2010). Vznik nádorového onemocnění u jedinců s embryonálními mutacemi genů *BRCA1* a *BRCA2* vyžaduje somatickou inaktivaci zbývajících funkčních alely, což naznačuje, že oba geny jsou nádorovými supresory (Smith *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1995). Fenotypy obou genů jsou si velmi podobné. Kromě žen může karcinom prsu ve vzácných případech postihnout i muže, obvykle ve věku 60-70 let. Rizikovými faktory jsou ozařování, rodinná anamnéza výskytu karcinomu prsu a vysoká hladina estrogenu (Pisanò *et al.*, 2011). Přibližně u 80 % jedinců s mutací *BRCA1* nebo *BRCA2* genu se vyvine karcinom prsu do 70 let věku, zatímco u 40 % jedinců s mutací v genu *BRCA1* a 20 % v genu *BRCA2* se objeví karcinom vaječníku (Begg *et al.*, 2008; Stratton *et al.*, 2008). Bodové mutace se vyskytují v celé kódující sekvenci obou genů a tvoří 10 % až 50 % zárodečných mutací dědičné formy karcinomu prsu a vaječníku (Agata *et al.*, 2005; Vašíčková *et al.*, 2007). Oba geny jsou zapojeny do základních buněčných procesů sloužících k udržení genomové integrity a transkripční regulace (Welsh *et al.*, 2001). Produkty obou genů zároveň regulují transkripci jiných genů zapojených do dalších buněčných funkcí (Harkin *et al.*, 1999).

Karcinomy prsu a vaječníků jsou spojeny se zárodečnými mutacemi i v jiných genech, jejichž produkty jsou jaderné proteiny, které se podílejí na udržení genomové integrity, jako jsou například geny *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *NBS1*, *RAD50*, *BRIP1* a *PALB2*. Jedním z těchto genů je také gen *CHEK2*, ve kterém se vyskytují rozsáhlé intragenové delece a jehož popis je uveden v kapitole 3.1.3. Lokalizace vybraných genů *BRCA1*, *BRCA2* a *CHEK2* v lidském genomu jsou uvedeny na Obrázku 1.

**Obrázek 1:** Pozice genů *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* a ostatních sousedících genů na jednotlivých chromozomech lidského genomu.



Převzato a upraveno z:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(brca1\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[orgn\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(brca1[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[orgn])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight) ,  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(brca2\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[orgn\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(brca2[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[orgn])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight) ,  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(chek2\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[orgn\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(chek2[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[orgn])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight)

### 3.1.1 Gen *BRCA1*

*BRCA1* je tumor supresorový gen, který vykazuje autozomálně dominantní dědičnost s vysokou penetrancí. Je lokalizován na dlouhém raménku 17. chromozomu v pozici 17q21. Kóduje 1863 aminokyselin a je mimo jiné zapojen do regulace genové exprese (Zhang *et al.*, 2010). Gen *BRCA1* byl identifikován na počátku roku 1990 (Hall *et al.*, 1990) a následně byl o 4 roky později klonován (Miki *et al.*, 1994). Obsahoval původně 24 exonů (Smith *et al.*, 1996), ale podle novějších informací uvedených v LRG databázi je těchto exonů 23 ([ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/lrgex/LRG\\_292.xml](ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/lrgex/LRG_292.xml)). Nejzrůslehlejší je exon 11, jehož délka je 3,5 kilobáze (kb) a obsahuje nejčastější mutace. *BRCA1* gen má extrémně vysokou hustotu *Alu* repetitivních sekvencí v oblasti intronů a obsahuje pseudogen v duplikované promotorové oblasti. Pseudogen je nefunkční gen, který ztratil schopnost kódovat proteiny. Tento pseudogen vede ke vzniku takzvaných hotspot míst, ve kterých dochází častěji k nerovnoměrným homologním rekombinacím (Smith *et al.*, 1996; Puget *et al.*, 2002).

Ženy s mutací v *BRCA1* genu mají více než 60% celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu a cca 40% riziko karcinomu vaječníku. Mohou se však vyskytnout také jiné typy nádorů, jako jsou karcinomy slinivky břišní, prostaty u mužů a dalších, ale jíž s nižším rizikem vzniku (King *et al.*, 2003; Metcalfe *et al.*, 2010). Velké genomové přestavby tohoto genu mohou tvořit až jednu třetinu všech mutací způsobujících onemocnění v různých populacích. Tyto přestavby jsou výsledkem homologních rekombinací mezi *BRCA1* genem a homologními pseudogenovými sekvencemi (Hansen *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2010). Zárodečné přestavby genu *BRCA1*, mají charakterizovaná zlomová místa, která jsou roztroušená po celém genu a většina z nich jsou delece a duplikace (Ewald *et al.*, 2009).

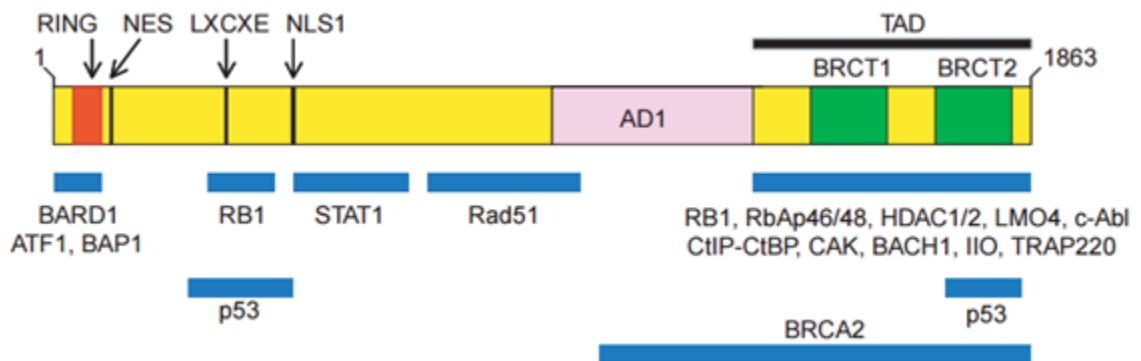
#### 3.1.1.1 Struktura a proteinové interakce genu *BRCA1*

Gen *BRCA1* obsahuje RING (*really interesting new gene*) finger doménu, která zprostředkovává interakce proteinů a vykazuje činnost E3 ubiquitin ligázy na svém N-konci (aminokyseliny 20-64) a C-terminální kyselou transkripční aktivační doménu (TAD, aminokyseliny 1560-1863) (Miki *et al.*, 1994; Monteiro *et al.*, 1996). Druhá doména (AD1, aminokyseliny 1293-1560), kterou lze nezávisle aktivovat transkripcí s C-terminální TAD (Hu *et al.*, 2002) je také transaktivační (Obrázek 2, Obrázek 3). *BRCA1* je jaderný protein, a proto je pro jeho správnou funkci důležitá oblast označovaná jako jaderný lokalizační signal NLS (*nuclear localization signal*), který po proteosyntéze

směřuje protein z cytoplasmy do jádra. Produkt genu *BRCA1* se účastní reparace poškozené DNA, regulace buněčného cyklu, apoptózy, transkripce a udržuje integritu genomu (Rosen *et al.*, 2006).

RING finger jsou malé domény vázající atomy zinku a nacházejí se v mnoha různých funkčních proteinech. Doména BRCT (*BRCA1 C-terminal domain*) se skládá ze dvou 90–100 aminokyselinových repetitivních sekvencí v uspořádání “head-to-tail”, které jsou si strukturně podobné. Tato doména se nachází v C-terminální oblasti, interaguje s různými proteiny včetně p53 nebo *BRCA2* (Obrázek 2) a je nezbytná pro správnou tumor supresorovou funkci *BRCA1* proteinu (Chapman *et Verma*, 1996; Ouchi *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Chai *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2012; de Sousa Dias *et al.*, 2013). Mutace vedoucí k posunu čtecího rámce nebo ke vzniku předčasného terminačního kodonu v BRCT doméně jsou asociovány s časným nástupem vzniku karcinomu prsu (Friedman *et al.*, 1994; Futreal *et al.*, 1994; Miki *et al.*, 1994; Gayther *et al.*, 1996).

**Obrázek 2:** Struktura proteinu *BRCA1* a lokalizace proteinových interakcí.



Legenda: Obrázek ukazuje jednotlivé funkční domény proteinu včetně NLS, RING a BRCT domény. Jsou zde zobrazeny interagující proteiny jako např. *BRCA2*, *p53*, *RB1*. Převzato a upraveno z: (Rosen *et al.*, 2006)

### 3.1.2 Gen *BRCA2*

*BRCA2* je velkým tumor supresorovým genem, který je lokalizován na dlouhém raménku 13. chromozomu v pozici 13q12-13. Byl objeven v roce 1994 profesorem Michaelem Strattonem a doktorem Richardem Woosternem (Institute of Cancer Research, UK) (Pisanò *et al.*, 2011). Vykazuje stejně jako gen *BRCA1* autozomálně dominantní dědičnost s vysokou penetrancí. Obsahuje 27 exonů a největším je exon 11. Protein kódovaný tímto genem je dlouhý 3418 aminokyselin a hraje důležitou roli v bezchybných



opravách dvouřetězcových zlomů DNA a opravách pomocí homologní rekombinace podobně jako BRCA1 (Venkitaraman, 2002; Pisanò *et al.*, 2011).

Mutace v genu *BRCA2* jsou příčinnou predispozice ke vzniku nádoru prsu a vaječníku u 1/3 případů vysoce rizikových rodin (Ford *et al.*, 1998). Nosič mutace v *BRCA2* genu má vysoké celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu, vaječníku a zvýšené riziko vzniku nádorů prostaty, slinivky, žlučníku, žlučových cest, karcinomu žaludku a melanomu (Breast Cancer Linkage Consortium, 1999). V genu *BRCA2* jsou méně často pozorované velké genomové přestavby (Hansen *et al.*, 2009). V ČR byl dosud zachycen pouze jediný typ přestavby v tomto genu (nepublikovaný údaj z laboratoře).

### 3.1.2.1 Struktura a funkce genu *BRCA2*

Gen *BRCA2* kóduje protein o velikosti 3418 aminokyselin. Obsahuje osm opakujících se sekvencí, nazývaných BRC opakování, které kóduje exon 11 (Bork *et al.*, 1996; Bignell *et al.*, 1997). Šest z těchto konzervovaných BRC opakování (BRC 1-4, BRC7 a BRC8) je zapojených do interakce mezi proteiny BRCA2 a RAD51 (Mizuta *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Marmorstein *et al.*, 1998) (Obrázek 3). RAD51 je protein, který je nezbytný pro homologní rekombinace a opravy DNA (Baumann *et al.*, 1996). RAD51 vazebné místo se nachází v blízkosti C-terminálního konce genu *BRCA2* (Mizuta *et al.*, 1997; Sharan *et al.*, 1997). Nedostatečná funkce BRCA2 proteinu vede ke spontánním chromozomovým přestavbám a radiosensitivitě (Patel *et al.*, 1998; Veronica *et al.*, 2000).

### 3.1.3 Gen *CHEK2*

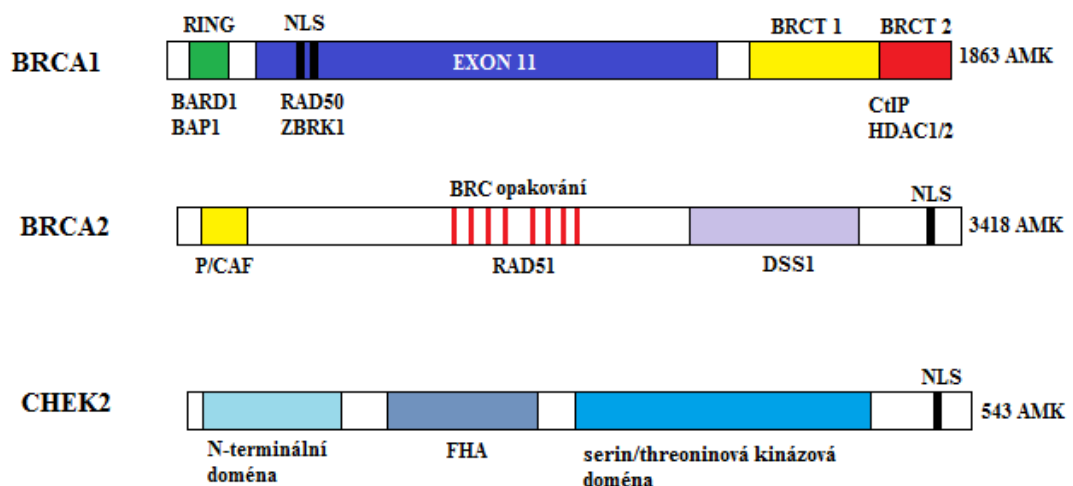
*CHEK2* je gen, lokalizovaný na dlouhém raménku 22. chromozomu v pozici 22q12.1 (Bartek *et al.*, 2001), nicméně v genomu lze nalézt také 5 vysoce homologních oblastí, pseudogenů, lokalizovaných na různých chromozomech. Skládá se ze 14 exonů a jeho přibližná velikost je 50 kb (Nevanlinna *et Bartek*, 2006). Patří mezi nízcenetrantní geny (Cybulski *et al.*, 2004). *CHEK2* gen kóduje lidský analog kvasinkové kinázy, která se účastní regulace oprav DNA a replikace (Matsuoka *et al.*, 1998). *CHEK2* byl poprvé popsán v roce 1999, kdy byly objeveny tři zárodečné mutace tohoto genu v rodinách s Li-Fraumeniho syndromem (Bell *et al.*, 1999). Tento gen zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu až 4krát a souvisí rovněž s výskytem jiných nádorů jako je karcinom štítné žlázy, plic, vaječníků, mozku a karcinomu prostaty u mužů (Plevová *et al.*, 2009).

CHEK2 protein se účastní odpovědi na poškození DNA u mnoha typů buněk. Aktivace tohoto proteinu, v odezvě na poškození DNA, brání buňce vstoupit do mitózy (Cybulski *et al.*, 2004). Somatické mutace se v genu *CHEK2* vyskytují vzácně. Byly detekované u různých typů nádorů, jako například v některých nádorech prsu (Sullivan *et al.*, 2002), osteosarkomu, karcinomu vaječníků, plic (Miller *et al.*, 2002), močového měchýře (Bartkova *et al.*, 2004; Bartkova *et al.*, 2005) a vulvy (Reddy *et al.*, 2002). Celosvětově rozšířená mutace c.1100delC se vyskytuje převážně v heterozygotním stavu a je charakterizovaná jako nízko penetrantní alela, zvyšující riziko vzniku karcinomu prsu 2-4 krát (Offit *et al.*, 2003).

### 3.1.3.1 Struktura genu *CHEK2*

Gen *CHEK2* kóduje protein o velikosti 543 aminokyselin. Skládá se ze tří domén, kterými jsou N-terminální doména (aminokyselinové zbytky dlouhé 20–75), serin/threoninové kinázová doména (225–490 zbytky) a FHA doména. FHA doména je tvořena 112-175 aminokyselinovými zbytky a je zapojena do interakce s jinými fosforylovanými proteiny, na jejich fosfothreoninovém zbytku (viz Obrázek 3). Katalytická kinázová doména zaujímá téměř celou karboxylovou terminální polovinu proteinu *CHEK2*, včetně aktivační smyčky s jinými serin/threoninovými kinázami (Nevanlinna *et Bartek*, 2006). Protein obsahuje i jaderný lokalizační signál NLS.

**Obrázek 3:** Struktura genů *BRCA1*, *BRCA2* a *CHEK2*.



**Legenda:** RING: N-koncová doména; NLS: jaderný lokalizační signál; BRCT1/2: C-koncové domény; RAD51: protein důležitý pro opravu DNA; FHA: doména

Převzato a upraveno z: [http://www.nature.com/onc/journal/v19/n53/fig\\_tab/1203968f1.html](http://www.nature.com/onc/journal/v19/n53/fig_tab/1203968f1.html),  
[http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n12/fig\\_tab/nrc2251\\_F2.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n12/fig_tab/nrc2251_F2.html)

### 3.2 Frekvence výskytu intragenových přestaveb genů *BRCA1* a *BRCA2* v různých populacích

Ženy, nosičky mutací v genech *BRCA1* nebo *BRCA2* mají celoživotní vysoké riziko vzniku karcinomu prsu nebo vaječníku. Nejčastějšími mutacemi jsou malé delece nebo duplikace, o velikosti několika párů bází (bp) nebo jednonukleotidové substituce, jejichž výsledkem je vznik předčasného terminačního stop kodonu (Perrin-Vidoz *et al.*, 2002; Narod *et Foulkes*, 2004). Velké intragenové přestavby v tumor supresorových genech u rodin s hereditární formou karcinomu prsu nebo vaječníků představují menší část z celkového počtu změn DNA. Tyto intragenové přestavby jsou většinou patogenní a způsobují tvorbu poškozeného proteinu a poruchu jeho funkce (Preisler-Adams *et al.*, 2006). Dědičná forma karcinomu prsu je považována za vysoce heterogenní genetické onemocnění (Walsh *et al.*, 2006; Walsh *et King*, 2007).

Velké intragenové přestavby jsou často nezjistitelné metodami založenými na PCR. K jejich odhalení je nutné využít kvantitativní metody jako je např. MLPA (Armour *et al.*, 2002). V České republice bylo detekováno několik druhů těchto změn, jedná se zejména o delece exonů 1A/1B-2, exonů 5–14, exonů 11–12, exonů 18–19, exonu 20 a exonů 21–22 genu *BRCA1* (Vašíčková *et al.*, 2007). Četnost těchto změn se však v jednotlivých populacích liší. Například v severoitalské populaci tvoří genomové přestavby až 40 % všech sekvenčních změn zachycených v genu *BRCA1* (Montagna *et al.*, 2003), zatímco ve francouzsko-kanadské populaci žádné takové přestavby nebyly nalezeny (Moisan *et al.*, 2006). Jejich výskyt v iránské, francouzské a nizozemské populaci se pohybuje od 0 % do 27 % (Hogervorst *et al.*, 2003; Pietschmann *et al.*, 2005). Podle některých prací tvoří v Nizozemsku genomové přestavby genu *BRCA1* 27 % až 36 % všech zárodečných mutací (Petrij-Bosch *et al.*, 1997; Hogervorst *et al.*, 2003). V dánských rodinách se přestavby *BRCA1* genu objevují u 3,8 % populace s karcinomem prsu nebo vaječníku (Thomassen *et al.*, 2006). V americké populaci je prevalence od 12 % do 12,7 % (Hendrickson *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2006). Ve Finsku se mezi 82 rodinami se středním až vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu a vaječníku nepodařilo přítomnost přestaveb prokázat (Lahti-Domenici *et al.*, 2001). Podobně je tomu v kanadské populaci (Moisan *et al.*, 2006). Ve francouzské populaci byly popsány velké genomové přestavby, které zahrnovaly delece exonů 8-13 (Gad *et al.*, 2002), v hispánské populaci USA delece exonů 9-12 (Weitzel *et al.*, 2007) a v belgické populaci duplikace exonu 11 (Teugels *et al.*, 2005).

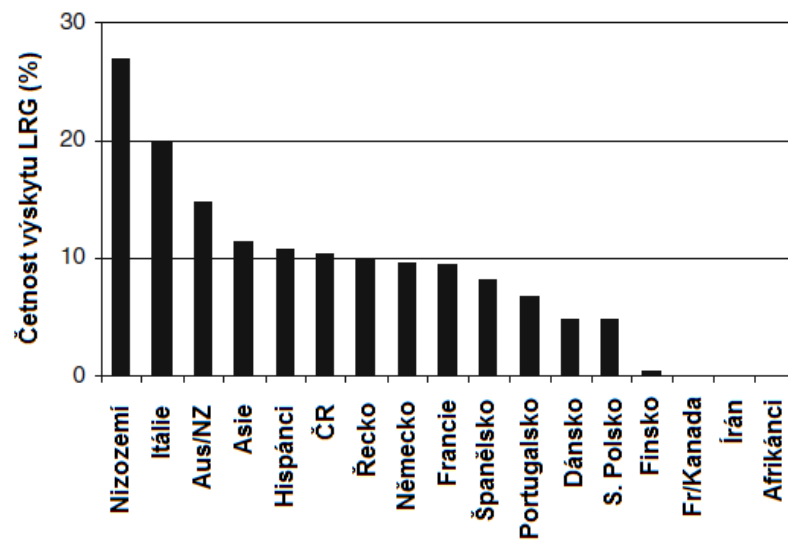
V tabulce 1 a grafu 1 je uveden souhrn celosvětového výskytu velkých genomových přestaveb, včetně delecí a duplikací jednoho či více exonů.

**Tabulka 1:** Frekvence výskytu genomových přestaveb *BRCA1* a *BRCA2* v různých populacích.

Země	Studovaný gen	Prev BRCA	Prevalence	Proportion *	Popsané přestavby	Reference
Austrálie	<i>BRCA1/2</i>	Ano	2 %	-	BRCA1: Del. ex 3, ex 5, ex 21–23 BRCA2: Del. ex 1–2, ex 14–16	Woodward <i>et al.</i> , (2005)
Česká Republika	<i>BRCA1</i>	Ano	6 %	-	Del. ex 1A/1B-2, ex 5–14, ex 11–12, ex 18–19, ex 20, ex 21–22	Vašíčková <i>et al.</i> , (2007)
Dánsko	<i>BRCA1/2</i>	Ano	1,3 %	3,8 %	BRCA1: Del. ex 3–16, ex 13–15	Thomassen <i>et al.</i> , (2006)
Finsko	<i>BRCA1/2</i>	Ano	0 %	0 %	žádný	Lahti-Domenici <i>et al.</i> , (2001)
Itálie	<i>BRCA1</i>	Ano	23 %	40 %	Del. ex 1A/1B-2, ex 9–19, ex 18–19, ex 20	Montagna <i>et al.</i> , (2003)
Itálie	<i>BRCA2</i>	Ano	2,5 %	-	Del. ex 17–18, ex 8–11, ex 20	Agata <i>et al.</i> , (2005)
Kanada	<i>BRCA1/2</i>	Ano	0 %	0 %	žádný	Moisan <i>et al.</i> , (2006)
Německo	<i>BRCA1/2</i>	Ano	1,7–5,7 %	8 %	BRCA1: Del. ex 1A/1B-2, ex 5, ex 5–7, ex 17; Dupl. exon13	Hofmann <i>et al.</i> , (2003), Hartmann <i>et al.</i> , (2004); Preisler-Adams <i>et al.</i> , (2006)
Nizozemí	<i>BRCA1</i>	Ano	7–9,1 %	27–36 %	Del. ex 8, ex 13, ex 20–22, ex 22; Dupl. ex 13, ex 21–23; Tripl. ex 17–19	Petrij-Bosch <i>et al.</i> , (1997); Hogervoest <i>et al.</i> , (2003)
Polsko	<i>BRCA1/2</i>	Ano	4,7 %	4,5 %	<b>BRCA1: Del. ex 1A/1B-2, ex 17–19</b>	<b>Ratajska <i>et al.</i>, (2008)</b>
Portugalsko	<i>BRCA1</i>	Ano	9,6 %	-	Del. ex 1–22, ex 8–13, ex 15–16; Dupl. ex 3–8, ex 18–20	Casilli <i>et al.</i> , (2002)
Portugalsko	<i>BRCA1/2</i>	Ano	1,1 %	6,7 %	BRCA1: Del. ex 11–15	Peixoto <i>et al.</i> , (2006)
Portugalsko	<i>BRCA2</i>	Ne	8 %	-	Dupl. exon 3	Machado <i>et al.</i> , (2007)
Portugalsko	<i>BRCA1/2</i>	Ano	1,1 %	6,7 %	BRCA1: Del. ex 11–15	Peixoto <i>et al.</i> , (2006)
Singapur	<i>BRCA1/2</i>	Ano	3 %	14,3 %	BRCA1: Del. ex 13–15; Dupl. ex 13 BRCA2: Dupl. ex 4–11	Lim <i>et al.</i> , (2007)
Španělsko	<i>BRCA2</i>	Ano	1,5 %	-	Del. ex 2, ex 10–12, ex 15–16; Dupl. ex 20	Gutierrez-Enriquez <i>et al.</i> , (2007)
USA	<i>BRCA1</i>	Ano	12,7 %	-	Del. ex 14–20, ex 22, ex 13; Dupl. ex 13	Hendrickson <i>et al.</i> , (2005)
USA	<i>BRCA1/2</i>	Ano	12 %	-	BRCA1: Del. ex 1A/1B-2, ex 3, ex 8–9, ex 17, ex 20; Dupl. ex 13, mezi ostatními	Walsh <i>et al.</i> , (2006)
USA hispánská komunita	<i>BRCA1</i>	Ano	3,8 %	-	Del. ex 9–12	Weitzel <i>et al.</i> , (2007)

**Legenda:** **Prev BRCA:** dříve negativní pacienti, **Prevalence:** prevalence přestaveb ve studovaných rodinách, **Proportion:** podíl přestaveb ve vztahu ke všem mutacím, (\*): ve většině studií nebyly bodové mutace vyloučeny. **Del:** delece, **Dupl:** duplikace, **Ex:** exon, **Tripl:** triplikace. Převzato a upraveno z: (Petroni *et al.*, 2009)

**Graf 1:** Shrnutí frekvence výskytu patogenních genomových přestaveb genu *BRCA1* v různých populacích.

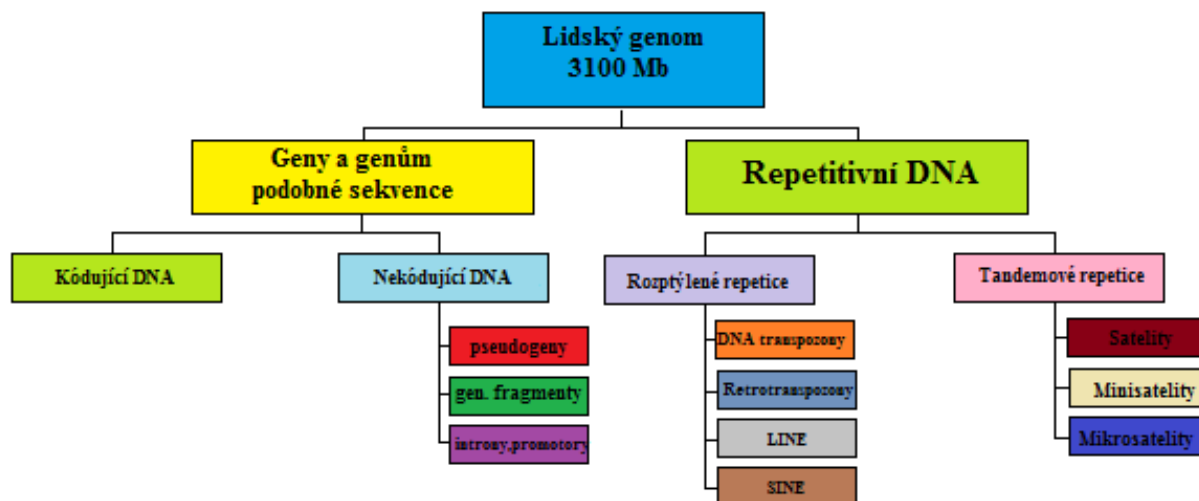


Převzato a upraveno z: (Sluiter *et van Rensburg*, 2011)

### 3.3 Struktura lidského genomu

Roku 1977 Phillip Sharp a Richard J. Roberts zjistili, že geny eukaryot jsou složeny z intronů a exonů. Za tento objev získali Nobelovu cenu v roce 1993. Haploidní lidský genom je velký přibližně 3 100 mega bází (Mb). Skládá se ze sady dlouhých lineárních molekul DNA ve formě 23 chromozomů a obsahuje cca 25 000 genů. Genom je kromě genů složen z genům podobných sekvencí a negenových sekvencí (viz Obrázek 4). Kódující oblasti nesou informace potřebné pro syntézu proteinů a jsou tvořeny exony. Ty jsou přerušovány nekódujícími oblastmi intronů, které jsou posttranskripčně vystřiženy, což vede ke vzniku mediátorové RNA (mRNA). V rámci velkých intragenových přestaveb mohou být exony i introny deletovány, duplikovány nebo v nich může dojít k inserci části jiného genu. Mechanismy vzniku těchto přestaveb jsou asociovány s přítomností repetitivních sekvencí, např. *Alu* repetice, nebo vysoce homologních sekvencí typů pseudogenů. V dalších odstavcích se proto zaměřím na popis oblastí nekódující DNA, konkrétně na pseudogeny a rozdělení repetitivní DNA.

**Obrázek 4:** Struktura a uspořádání genů v genomu.



Převzato a upraveno z: <http://www.carolguze.com/text/442-1-humangenome.shtml>

### 3.4 Pseudogeny

Příčinou nerovnoměrné rekombinace v kódující oblasti některých genů může být přítomnost pseudogenů, tj. nefunkčních kopií genů s vysokou homologií k původní sekvenci. Pseudogeny jsou příbuzné známých genů, které ztratily schopnost kódovat proteiny (Vanin, 1985). Puget *et al.*, (2002) podali první zprávu o tomto mutačním mechanismu pro *BRCA1* gen. U dvou rodin s rakovinou prsu a vaječníků, tito autoři ukázali, že první exony (1A, 1B) v genu, byly nahrazeny pseudogenem *BRCA1* ( $\Psi$  *BRCA1*). Bylo prokázáno, že tento pseudogen dříve ležel 30 kb proti proudu *BRCA1* genu (Barker *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996). Identifikaci dvou různých rekombinačních událostí týkajících se homologní oblasti, umístěné v *BRCA1* genu a  $\Psi$  *BRCA1*, vedl autory k předpokladu, že tyto oblasti jsou silné hotspots místa pro rekombinaci (Ewald *et al.*, 2009).

### 3.5 Tandemové repetice

Tandemové repetice patří spolu s rozptýlenými repeticemi mezi repetitivní DNA. Jsou to krátké tandemově uspořádané opakující se sekvence, které mohou vznikat delecí či inzercí. Mohou být jednoduché od 1–10 nukleotidů nebo středně dlouhé od desítek až stovek nukleotidů. Bloky těchto repetic se nacházejí v různých částech genomu (Ewald *et al.*, 2009). Tandemové repetice jsou také součástí satelitů, čímž jsou sekundární konstrikcí oddělené struktury, které se podílí na vytvoření jádérka a obsahují geny pro syntézu ribozomální RNA.

Podle délky repetitivní jednotky dělíme tandemové repetice na satelity, minisatelity a mikrosatelity.

#### 3.5.1 Satelity

Satelitní DNA tvoří většinu heterochromatických oblastí genomu. Vyskytují se v blízkosti centromery. Skládají se z velkých bloků tandemově repetitivní DNA dlouhých až několik Mb (Ewald *et al.*, 2009).

#### 3.5.2 Minisatelity

Minisatelity jsou krátké tandemové repetice o velikosti 6 až 100 bp. Minisatelity jsou vysoce polymorfní multialelické markery využívané pro vazebné studie (Nakamura *et al.*, 1987) nebo k identifikaci osob (Jeffreys *et al.*, 1985). Jejich vysoký polymorfní potenciál vyplývá z rozdílů v počtu opakování. Velmi často se vyskytují v subtelomerických oblastech chromozomů.

### 3.5.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity (STRs = short tandem repeats) jsou typem tandemové repetice, která je dlouhá cca 1–9 bp (Goldstein *et Pollock*, 1997; Schlötterer *et al.*, 1998). Zároveň jsou nejčastější formou repetitivních sekvencí. Mikrosatelity jsou charakteristické především mendelovskou dědičností a kodominancí. V lidském genomu jsou rovnoměrně rozmístěny a mezi jednotlivci se liší v počtu opakujících se repetice podobně jako je tomu u minisatelitů (Goldstein *et Pollock*, 1997). U lidí jsou často spojovány s non-LTR retrotranspozony LINE-1 (long interspersed nuclear elements) (Nadir *et al.*, 1996; Kelkar *et al.*, 2011). Mikrosatelity jsou somaticky stabilní a využívají se jako molekulární markery, především v rostlinném genetickém výzkumu nebo při identifikaci osob. Uplatňují se také v mnoha dalších oblastech, jako je například populační genetika, řízení a zabezpečení genofondu (Tautz, 1989; Jarne *et Lagoda*, 1996; Zane *et al.*, 2002).

### 3.6 Rozptýlené repetice - Transpozony

Transpozony (TEs) jsou úseky nukleových kyselin (sekvence DNA), které se pohybují z jednoho místa na druhé uvnitř genomu. Tato schopnost je zprostředkována DNA transponázou nebo reverzní transkriptázou. Tyto TEs jsou označovány jako autonomní. V jiných případech jsou nekódující transpozony označovány jako neautonomní, které se dokážou přenášet jen s pomocí příbuzných autonomních elementů. Autonomní i neautonomní transpozony tvoří více než 50 % savčího genomu a z toho až dvě třetiny lidského genomu (Smit, 1996; Smit, 1999; Lander, 2001; de Koning *et al.*, 2011).

V roce 1956 Barbara McClintock položila základy pro výzkum transpozonů (McClintock, 1956). Tyto sekvence existují téměř u všech živých organismů a jsou zdrojem velkého počtu mutací. Považují se za jednu z hlavních příčin genetických nemocí u lidí (Belancio *et al.*, 2008), nebo u octomilky, kde jsou zodpovědné za více než 80 % spontánních mutací (Green, 1988).

U počátečního výzkumu sekvence lidského genomu se odhadovalo, že přibližně 45 % naší genomové DNA je odvozeno od TEs (Lander, 2001). Většina těchto sekvencí odpovídá fragmentům nebo neaktivním elementům, které ztratily schopnost pohybovat se v genomu v důsledku několika mutací, zejména prostřednictvím epigenetických mechanismů.



Transpozony se dělí do dvou tříd, podle způsobu pohybu v genomu (Finnegan, 1989; Wicker *et al.*, 2007). První třídou jsou DNA transpozony a druhou třídu tvoří retrotranspozony.

### **3.6.1 DNA transpozony**

DNA transpozony jsou pohyblivé sekvence DNA, které se mobilizují prostřednictvím mechanismu vystřížení a vložení. Jsou vyříznuty ze svého původního místa a pohybují se k místu druhému. Některé geny v lidském genomu jsou odvozeny od DNA transpozonů (Lander, 2001).

### **3.6.2 Retrotranspozony**

Retrotranspozony jsou repetitivní DNA elementy tvořící 10 % lidského genomu. Zahrnují prvky k přesunu mechanismem vystřížení a vložení, které obsahují RNA meziproduct (Boeke *et al.*, 1985; Garfinkel *et al.*, 1985). Využívají RNA polymerázy II nebo III, díky kterým jsou přepsány do RNA a původní kopie DNA transpozonů zůstávají na svém místě. Retrotranspozony zůstávají v lidském genomu aktivní (Kazazian *et al.*, 1988; Wallace *et al.*, 1991; Ostertag *et al.*, 2003).

Mezi retrotranspozony patří endogenní retroviry, LINE-1 a SINE (short interspersed nuclear elements), které se dělí podle přítomnosti nebo nepřítomnosti dlouhé terminální repetitivní sekvence (LTR) na svých koncích. Ty, které neobsahují LTR se dále dělí na autonomní a neautonomní. Mezi autonomní patří LINE-1, které kódují enzymy umožňující pohyb, a neautonomní SINE využívají enzymy, které jsou produkovány jinými elementy.

#### **3.6.2.1 LTR retrotranspozony- Endogenní retroviry**

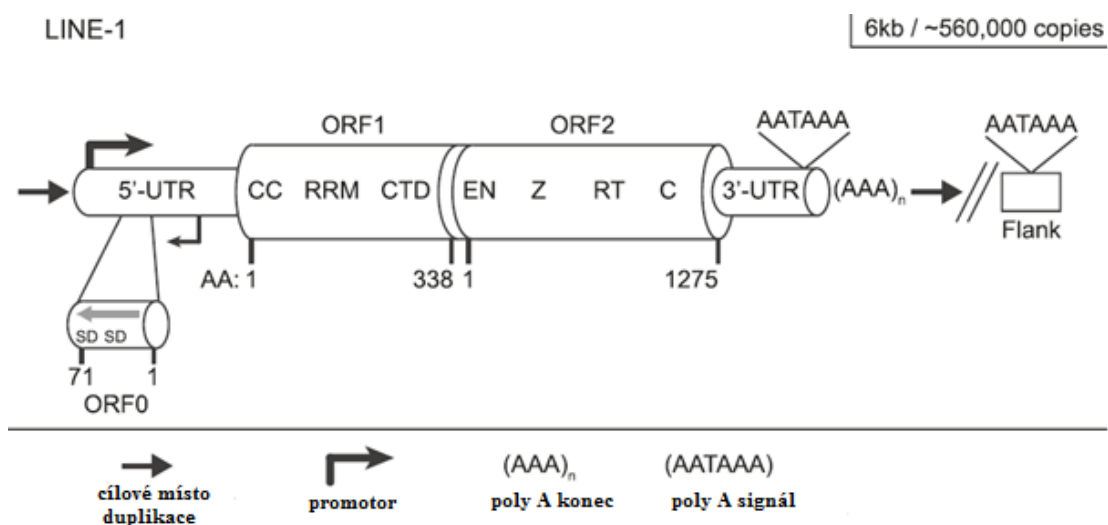
Endogenní retroviry (ERVs) jsou podobné strukturou retrovirům, jako je například HIV. Obsahují na svých koncích dlouhé terminální repetitivní sekvence. ERVs tvoří 8 % lidského genomu (Lander, 2001). V některých případech může dojít k opětovné aktivaci těchto virových elementů a vzniku patologie v průběhu embryonálního vývoje (Schlesinger *et Goff*, 2013).

### 3.6.2.2 Non-LTR retrotraspozony- LINE-1

LINE-1 je autonomní retrotranspozon. Genom obsahuje víc než 500 000 LINE-1 sekvencí, přičemž většina z nich je neaktivních z důvodu přítomnosti bodových mutací, přestaveb a zkrácení 5' konce (Scott *et al.*, 1987; Lander., 2001; Ostertag *et Kazazian*, 2001; Szak *et al.*, 2002).

Jen malá část (80-100 LINE-1) je považována za aktivní (Sassaman *et al.*, 1997; Brouha *et al.*, 2003) a liší se mezi jednotlivci (Beck *et al.*, 2010). Aktivní LINE-1 je dlouhý 6 kb (Dombroski *et al.*, 1991), obsahuje 5' nepřekládaný konec (UTR-untranslated region), který funguje jako protomor a 3' UTR obsahující signál k polyadenylaci. Dále obsahuje dva otevřené čtecí rámce ORF1 a ORF2 (viz Obrázek 5). LINE-1 je transkribován z vlastního promotoru s použitím RNA polymerázy II (Swergold, 1990), jehož délka je 900 bp a nachází se v 5'UTR. ORF2 je 150 kilodaltonu (kDa) dlouhý protein s endonukleázovou (Feng *et al.*, 1996) a zpětnou transkriptázovou aktivitou (Mathias *et Scott*, 1991). ORF1 je 40 kDa dlouhý protein (Holmes *et al.*, 1992) s RNA vazebnou oblastí (Kolosha *et Martin*, 2003; Khazina *et Weichenrieder*, 2009) a chaperonovou činností (Martin *et Bushman*, 2001). Denli *et al.*, (2015) identifikovali novou ORF0, která je dlouhá 70 aminokyselin a byla nalezena na antisense vlákně v oblasti 5'UTRs. Transkripce LINE-1 je ukončena interním slabým polyadenylačním signálem (AATAAA), který se nachází 200 bp v oblasti 3'UTR (Grimaldi *et al.*, 1984; Moran *et al.*, 1996; Moran *et al.*, 1999).

**Obrázek 5:** Autonomní aktivní LINE-1.



**Legenda:** LINE-1 o délce 6 kb. Kóduje tři proteiny, z nichž dva (ORF1p a ORF2p) jsou nezbytně nutné pro retrotranspozici v sympatickém nervovém systému (SNS). V současné době je role ORF0 nejasná. Transkripce LINE-1 je poháněna vlastním promotorem (černá ohnutá šipka), který se nachází v oblasti 5'UTR. 5'UTR kóduje i slabší antisense promotor (malá ohnutá šipka). Ukončení LINE-1 transkripce je zprostředkováno signálem polyA, který se nachází v oblasti 3'UTR.

Převzato a upraveno z: (Hancks *et al.* Kazazian, 2016)

### 3.6.2.3 SINE

SINE je neautonomní retrotranspozon, kratší než 500 bp a nemá kódující potenciál. Nejvýznamnější a hlavní třídou u člověka jsou *Alu* elementy.

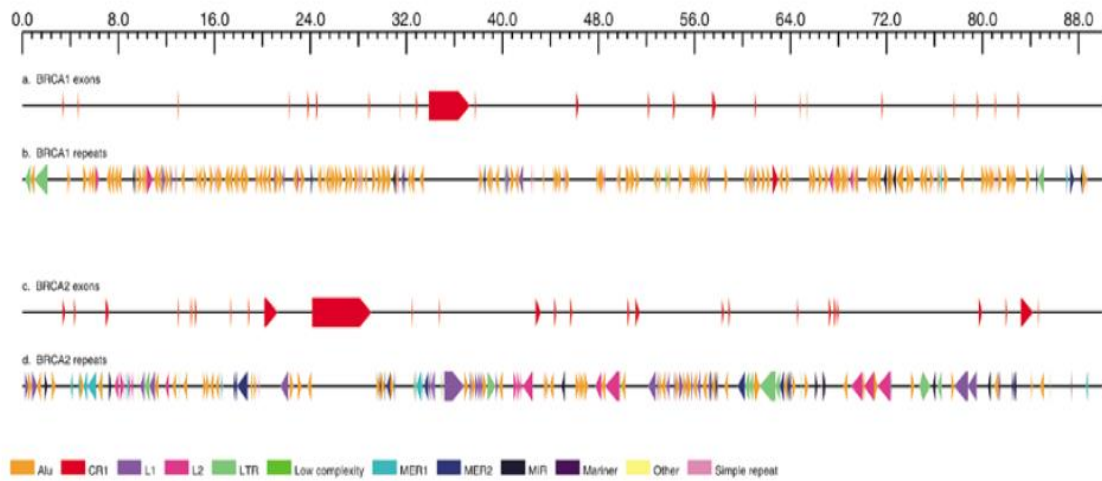
#### Alu elementy

*Alu* elementy jsou repetitivní DNA ve vysoké hustotě, které zprostředkovávají chromozomální přestavby a homologní rekombinace. Díky těmto přestavbám může docházet k translokacím, delecím, duplikacím nebo inzercím (Kolomietz *et al.*, 2002; Tancredi *et al.*, 2004). Tyto sekvence jsou pojmenovány podle restriční bakteriální endonukleázy *Alu-I*, kterou je většina štěpena. Skupiny *Alu* elementů vykazují navzájem vysokou homologii, ale nemají identické sekvence. *Alu* elementy sdílí konsenzus 282 bp, který je odvozený z RNA podjednotky SRP (signal recognition particle). Má přesně definovaný 5' konec, který sdílí většina členů a je divergentním tandemovým dimerem, ve kterém se nachází dva monomery odděleny oblastí bohatou na adenin (Schmid, 1996).

Bylo identifikováno cca 500 000 *Alu* elementů, které společně tvoří 3 % lidského genomu (Ewald *et al.*, 2009). Přítomnost repetitivní sekvence, obsahující vysokou homologii, je dalším destabilizujícím faktorem, který zvyšuje pravděpodobnost vzniku intragenové přestavby (Flores-Rozas *et al.*, 2000; Michel, 2000). Více než třetina lidského genomu se skládá z opakujících se sekvencí, které jsou všude přítomné. Většina těchto rozptýlených repetitivních sekvencí je odvozena z retropozice RNA meziproductu a následného vložení výsledné kódující sekvence DNA (cDNA) do genomu (Kolomietz *et al.*, 2002). Lidské *Alu* repetice jsou rozděleny do podskupin, jejichž relativní stáří lze odhadnout na základě analýzy odlišnosti sekvence od jaderné funkční sekvence spojené s transpozicí (Smit, 1996). Obsah G-C párů *Alu* elementů je devětkrát větší než průměrný obsah v DNA, což nabízí potenciál pro genomické methylace těchto úseků (Schmid, 1998). *Alu* sekvence tvoří hotspot místa a jsou považovány za genomové nestabilní faktory odpovědné za rekombinaci v některých genech. Velmi často jsou umísťovány do exonů během meiózy v důsledku nehomologní rekombinace (Ewald *et al.*, 2009).

Ve většině případů jsou charakterizované přestavby zachycené MLPA výsledkem nerovnoměrných rekombinací mezi *Alu* sekvencí. Pokrývají cca 42 % intronových oblastí *BRCA1* genu (Gad *et al.*, 2001). Smith *et al.*, (1996) identifikovali 138 jednotlivých *Alu* elementů v celém genu *BRCA1*. V genu *BRCA2* jsou přestavby méně časté. Frekvence *Alu* sekvencí je zde také nižší, tvoří cca 17 % až 20 % genu (Ewald *et al.*, 2009). Kromě *Alu* repetitivních sekvencí se v *BRCA2* genu vyskytuje také 27 % LINE a MER repetitivní DNA (Welch *et al.*, 2001) (viz Obrázek 6).

**Obrázek 6:** Repetitivní DNA element v genu *BRCA1* a *BRCA2*.



**Legenda:** **A.** Genomová struktura genu *BRCA1*, která pokrývá 84 kb sekvenční chromozomu 17.

**B.** Rozdělení repetitivních elementů v genu *BRCA1*. *Alu* elementy, které jsou zvýrazněny žlutě, tvoří 42 % z genu a všechny repetitivní elementy tvoří 47 % genu.

**C:** Genomová struktura genu *BRCA2*, která pokrývá 86 kb sekvenční chromozomu 13.

**D:** Distribuce repetitivních elementů v genu *BRCA2*. LINE a MER elementy jsou označeny červeně, modře a fialově tvoří 27 % genu. *Alu* elementy obsahují 20 % genu a všechny ostatní repetitivní elementy tvoří 48 % genu.

Převzato z: (Welch *et al.* King, 2001)

## 3.7 Metody molekulární biologie používané při analýze intragenových přestaveb

### 3.7.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je základní metodou molekulární biologie, molekulární evoluce genetiky a forenzní biologie (Erlich *et Arnheim*, 1992). PCR je citlivá metoda určená pro amplifikaci malých fragmentů DNA (Jia *et al.*, 2014). Objevitelem této metody byl v roce 1987 Kary Mullis. V roce 1993 mu za tento objev byla udělena Nobelova cena v chemii. Pro svou první PCR použil obyčejnou DNA polymerázu, kterou přidával do každé zkumavky v každém cyklu, z důvodu nízké odolnosti vůči vysokým teplotám. O dva roky později byla získána termostabilní DNA polymeráza izolována z bakterie *Thermus aquaticus*. V dnešní době se nejčastěji využívá termostabilní Taq polymeráza, která se přidává do reakční směsi společně s ostatními reagensy (Lodish *et al.*, 2008).

PCR master mix obsahuje důležité komponenty, bez kterých reakce neproběhne. Obsahuje molekulu DNA, forward a reverse primery, čímž jsou jednořetězové úseky DNA, které nasedají na různá vlákna a směřují 3' konci proti sobě. Dále jsou důležité deoxyribonukleotidy (dNTP) a DNA polymeráza, která je termostabilní a díky ní dochází k vytvoření kopií DNA. Mezi další reagensy patří pufr, hořčík a DMSO, které slouží pro optimalizaci reakce (Lodish *et al.*, 2008).

PCR se skládá ze 3 základních kroků. V prvním kroku dochází k denaturaci. Směs se zahřeje na cca 95 °C, poruší se vodíkové můstky ve dvouvláknové molekule DNA a stanou se z ní dvě jednovláknové. Ve druhém kroku se směs ochladí na 50 °C až 60°C a dochází k nasednutí primerů na specifická místa molekuly DNA. Primery tak ohraničují oblast, která nás zajímá. Ve třetím kroku se zvýší teplota na 72 °C. Při této teplotě dochází k připojení DNA polymerázy na 3' konce každého primeru a elongaci nového řetězce DNA na základě komplementarity k šablónové DNA. Na konci cyklu jsou přítomny 4 vlákna molekuly DNA. Ve čtvrtém kroku znovu dochází ke zvýšení teploty na 90 °C až 95 °C. Tímto krokem začíná druhé kolo cyklu. Dochází k opakování do doby, než dostaneme několik milionů nových kopií dvouvláknových molekul DNA (Brown, 2007, Lodish *et al.*, 2008).

### 3.7.2 Elektroforetická separace produktů

Elektroforéza je separační metoda, využívána pro analýzu nukleových kyselin a bílkovin. Princip spočívá v rozdílné pohyblivosti fragmentů v elektrickém poli, která je dána jejich různou velikostí. Nukleová kyselina je záporně nabitá, díky fosfátovým zbytkům, které jsou součástí kostry molekuly DNA či RNA. V elektrickém poli dochází k pohybu molekul od záporného ke kladnému pólu. Separace se provádí v elektroforetických gelech a nejběžněji se používají agarozové nebo polyakrylamidové gely. Pro určení velikosti fragmentů porovnáváme jejich elektroforetickou pohyblivost s pohyblivostí standardu o známé velikosti (Šmarda *et al.*, 2005).

### 3.7.3 Sangerovo sekvenování

Sekvenování DNA s využitím fluorescenčního značení dideoxynukleotidů vynalezl Frederik Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Jedná se o metodu pro přesné určení pořadí nukleotidů v primární struktuře DNA do velikosti fragmentů až 1000 bp. Má velmi malou chybovost a vytváří tak velmi spolehlivé sekvenační výsledky (Choulet *et al.*, 2014). Cílem sekvenování je zjištění přesného pořadí nukleotidových bází.

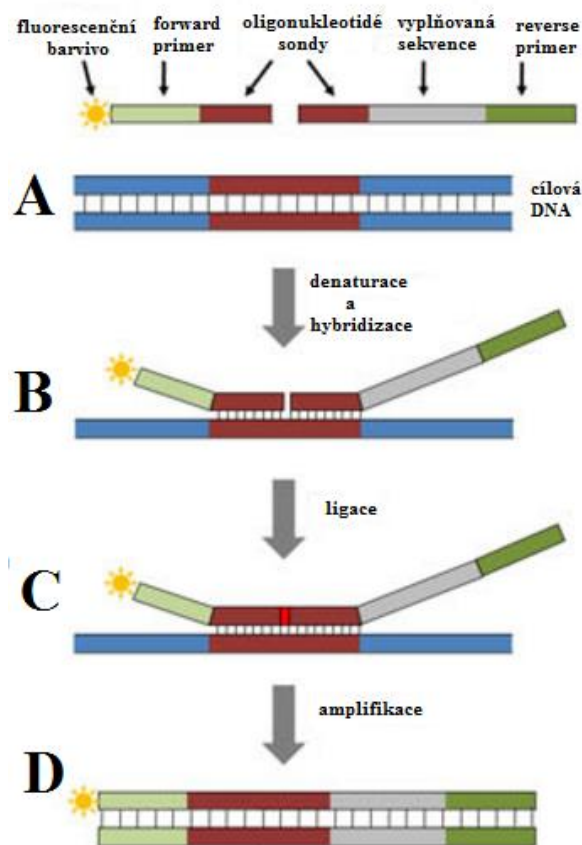
Sangerovo sekvenování je schopno detekovat většinu zárodečných mutací spojených s dědičnou formou rakoviny prsu. Ty se skládají převážně z nesmyslných a ztrátových mutací, malých duplikací a delecí (Mancini-DiNardo *et al.*, 2014).

### 3.7.4 MLPA

MLPA patří mezi další metodu molekulární biologie, která slouží k detekci změněného počtu kopií různých genomových sekvencí převážně cDNA (Ewald, *et al.*, 2009). Tato metoda je levná, citlivá, výkonná a poměrně jednoduchá (Hogervorst *et al.*, 2003; den Dunnen *et White*, 2006; Ratajska *et al.*, 2008). Používají se sondy, které se skládají ze dvou oligonukleotidů (viz Obrázek 10). Pokud dojde k hybridizaci s cílovou sekvencí, obě sondy jsou ligovány k sobě navzájem. Všechny ligované sondy mají identické sekvence na svém 5' a 3' konci, aby mohla proběhnout amplifikace jediným párem primerů. Produkty získané amplifikací každé sondy mají různé velikosti, vzhledem k rozdílům v délce tzv. výplňových sekvencí tvořících sondu (Ewald *et al.*, 2009). Produkty amplifikace jsou od sebe separovány pomocí kapilární elektroforézy (Schouten *et al.*, 2002).

Metoda MLPA se primárně využívá pro detekci velkých intragenových přestaveb a přesného umístění delece či duplikace, které sahají hluboko do intronové oblasti (Staaf *et al.*, 2008). V ojedinělých případech může dojít k falešně pozitivním výsledkům z důvodu výskytu bodové mutace v místě nasednutí MLPA sondy (Gomez *et al.*, 2009). Jedinou její nevýhodou je velká citlivost na kontaminaci. Díky této metodě dochází k odhalení velkých intragenových přestaveb v genu *BRCA1* (Montagna *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2004), genu *BRCA2* (Woodward *et al.*, 2005), ale i jiných genů, včetně genu *CHEK2*.

**Obrázek 10:** Zobrazení jednotlivých kroků při analýze vzorků DNA metodou MLPA.



Legenda: A. struktura sondy, B. hybridizace sondy složené ze dvou částí, z níž jedna je fluorescenčně značená, C. ligace dvou částí sondy po hybridizaci k cílové sekvenci, D. amplifikace ligované sondy univerzálním párem primerů.

Převzato a upraveno z: <http://www.applied-maths.com/applications/multiplex-ligation-dependent-probe-amplification-mlpa-analysis>



### 3.7.5 Long-range PCR

Long - range PCR (LR-PCR) je velmi flexibilní, rychlá a účinná metoda pro sekvenování velkých genomových oblastí u malého počtu vzorků (Jia *et al.*, 2014). Tato metoda hraje důležitou roli při sekvenování repetitivních nebo duplikovaných oblastí genomu, které nemohou být analyzovány pomocí standartní genomické amplifikace (Harismendy *et al.*, 2009).

Používají se kombinace DNA polymeráz a jsou navrženy tak, aby byly schopny amplifikovat až 15 kb dlouhé úseky DNA. Díky tomuto pokroku se usnadnilo studium molekulární genetiky a zvýšila rychlost a jednoduchost PCR genomického mapování a sekvenování (Cheng *et al.*, 1994; de Sousa Dias *et al.*, 2013). Při využití k dalšímu sekvenování tak dosáhneme vyšší citlivosti a poskytne nám rychlejší a efektivnější detekci genetické variability (Knierim *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2012).

DNA polymerázy jsou komerčně dostupné a určeny pro amplifikaci dlouhých genomových fragmentů. Nedílnou součástí je optimalizace teploty nasedání ( $T_a$ ) a prodloužení času podle velikosti amplikonu (Jia *et al.*, 2014). Doba elongace musí být dostatečná, aby mohlo dojít ke kompletní syntéze v každém PCR cyklu. V neposlední řadě musí chránit templátovou DNA proti teplotnímu poškození v průběhu cyklů a zachování specifčnosti, která je nutná pro jednu kopii genové amplifikace z genomové DNA (Cheng *et al.*, 1994).

Omezením LR- PCR je nutná pečlivost v návrhu primerů až po zajištění amplifikace jednořetězcových sekvencí. LR-PCR je aplikovatelná na všechny geny, ve kterých došlo k deleci bez ohledu na to, zda se v genech vyskytují pseudogeny (Tan *et al.*, 2012).

## 4 Materiál a metodika

K bakalářské práci byly vybrány DNA pacientek s diagnózou karcinomu prsu, u nichž byla dříve metodou MLPA zachycena rozsáhlá intragenová přestavba v některém z úseků genu *BRCA1* a genu *BRCA2*. Pacientky byly do rutinní analýzy obou genů zařazeny po splnění aktuálních indikačních kritérií (viz Tabulka 2). Pokud to bylo možné, byla zjištěna i rodinná anamnéza. Pacientky byly zařazeny do analýzy pouze v případě souhlasu s anonymním využitím jejich DNA pro výzkumné účely.

Pro analýzu byla využita zmražená dříve vyizolovaná DNA, u níž byla opětovně změřena koncentrace (viz Odstavec 4.2.2.). Primery byly navrženy v programu PrimerExpress tak, aby pokryly předpokládané deletované oblasti. PCR produkty byly vizualizovány na 1% agarózovém gelu s využitím komerčně dostupných velikostních standardů. Elektroforéza probíhala podle podmínek uvedených u jednotlivých postupů. V případě výskytu nespecifit byla provedena izolace PCR produktu z gelu dle doporučení výrobce použité izolační soupravy. Pro přesnou charakterizaci zlomových míst byla použita metoda přímé sekvenace dle Sangera s odpovídajícími primery.

**Tabulka 2:** Indikační kritéria pro zařazení pacientek do analýzy genu *BRCA1* a genu *BRCA2* vycházející z doporučení NCCN (National Comprehensive Cancer Guidelines 2015) schválených Společností lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP.

<p><b>Sporadické formy:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Epitelové karcinomy vaječníků, vejcovodů a peritoneální karcinom bez ohledu na věk</li> <li>- Triple negativní karcinom prsu (TNBC) (receptory ER, PR a HER2 negativní) do 60 let (medulární karcinomy prsu se téměř vždy shodují s TNBC)</li> <li>- Unilaterální karcinom prsu do 45 let (pokud není známá rodinná anamnéza do 50let)</li> <li>- Dva samostatné primární karcinomy prsu, první do 50 let, nebo oba do 60 let (bilaterální nebo ipsilaterální/synchronní nebo metachronní)</li> <li>- Duplicita karcinomu prsu a slinivky bez věkového omezení</li> <li>- Karcinom prsu u muže bez věkového omezení</li> </ul>
<p><b>Familiární formy</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Karcinom vaječníků, vejcovodů nebo primární peritoneální karcinom v rodinné anamnéze je vždy indikací k testování</li> <li>- Alespoň 3 příímí příbuzní, včetně probandky, s karcinomem prsu bez věkového omezení</li> <li>- 2 příímí příbuzní, včetně probandky, s karcinomem prsu, alespoň jeden diagnostikován ve věku pod 50 let, nebo oba do 60 let (empírické riziko karcinomu prsu je pro přímé příbuzné nad 20 % )</li> <li>- Probandka s karcinomem prsu do 50 let s přímým příbuzným s nádorem spojeným s hereditárním karcinomem prsu a ovaria (HBOC) (především karcinom slinivky, prostaty)</li> </ul>
<p><b>Prediktivní testování:</b> Pokud je známá rodinná mutace u příbuzných od 18 let věku (zvláštní případy individuálně).</p>

Legenda: **ER**- estrogenový receptor, **PR**- progesteronový receptor, **HER2**- transmembránový receptor

Převzato a upraveno z: (Foretová *et al.*, 2016)

## 4.1 Použitý materiál a přístroje

### 4.1.1 Speciální reagentie

#### Polymerázová řetězová reakce:

Polymerázový mix *MYFI*<sup>TM</sup> (Bioline, UK)

Navržené oligonukleotidy (viz Tabulka 2)

#### Gelová elektroforéza:

TBE pufr 10x (Repharm, Česká republika)

Agarosa BIO-41025 (Bioline, UK)

Ethidium bromide solution 46067 (Fluka, Švýcarsko)

Hyperladder 100 bp *Hyperladder IV BIO-33030* (Bioline, UK)

Loading buffer, z *kitu Internal Lane Standard 600 DG1071* (Promega, USA)

O'GeneRuler 1kb *Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, USA)

#### Izolace a extrakce z gelu:

Isolate II PCR and Gel kit BIO-52029 (Bioline, UK)

#### Enzymatické předčištění PCR produktu:

Exonuclease I, E. coli (Thermo Scientific, UK)

FastAp (Thermo Scientific, UK)

#### Sekvenační PCR:

BigDye® Terminator v 3.1 cycleSequencingKit (Applied Biosystems, USA)

BDX64 *BigDye® EnhancingBuffer* (MCLAB, Čína)

#### Předčištění sekvenačních produktů:

HPLC voda (Merck, Německo)

Agencourt CleanSeq (Beckman Coulter, USA)

85% ethanol (Repharm, Česká republika)

#### Sekvenování:

Polymer PO7 (Applied Biosystems, USA)

NanoPop 10x Running Buffer (TAE pufr) (MCLAB, Francie)

HPLC voda (Merck, Německo)

#### **4.1.2 Běžné reagensie a spotřební materiál**

PCR voda (Top-Bio, Česká republika)  
Mikropipety (10 µl, 100 µl, 200 µl – Eppendorf, Německo)  
Jednorázové špičky s filtrem (10 µl, 100 µl, 200 µl – Bioplastics, Nizozemí)  
Mikrozkumavky (0, 2 ml, 1, 5 ml – Bioplastics, Nizozemí)  
Stojan na mikrozkumavky (Bioplastics, Nizozemí)  
Mikrotitrační destičky (Bioplastics, Nizozemí)  
Fólie na mikrotitrační destičky (Bioplastics, Nizozemí)  
Jednorázové rukavice SensiPlus (Vulkan-medicals, Česká republika)

#### **4.1.3 Použité přístroje**

Transiluminátor *TRX 35M* (Vilber Lourmat, Francie)  
Chlazená centrifuga *Centrifuge 5424* (Eppendorf, Německo)  
Minicentrifuga *MyFuge C1012* (Benchmark Scientific, USA)  
Elektroforetický zdroj *Consort Maxi Power Supply E815* (Dynex, USA)  
Horizontální vana pro elektroforézu (Dynex, USA)  
Mikrovlnná trouba *KOR-6L05* (Daewoo, Jižní Korea)  
Digitální fotoaparát *Olympus XZ-1* (Olympus, Japonsko)  
Pipetovací automat *Biomek 4000* (Beckman Coulter, USA)  
Chlazená centrifuga *Centrifuge 5840* (Eppendorf, Německo)  
Spektrofotometr *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific, UK)  
Pracovní box *UVC/T-AR cleaner* (Biosan, Litva)  
Vortex BIO *Vortex VI* (Biosan, Litva)  
Mrazicí box *BioMidi RF 625* (-20°C – Bioline, UK)  
Lednice UR 400 (4°C- Nordline, Česká republika)  
ABI 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA)  
Termocycler *Mastercycler pro S* (Eppendorf, Německo)  
Třepačka vyhřívaná *Thermo Shaker TS-100* (Biosan, Litva)  
Skalpel

## 4.2 Postupy použité při výzkumu

### 4.2.1 Navržení primerů v programu PrimerExpress

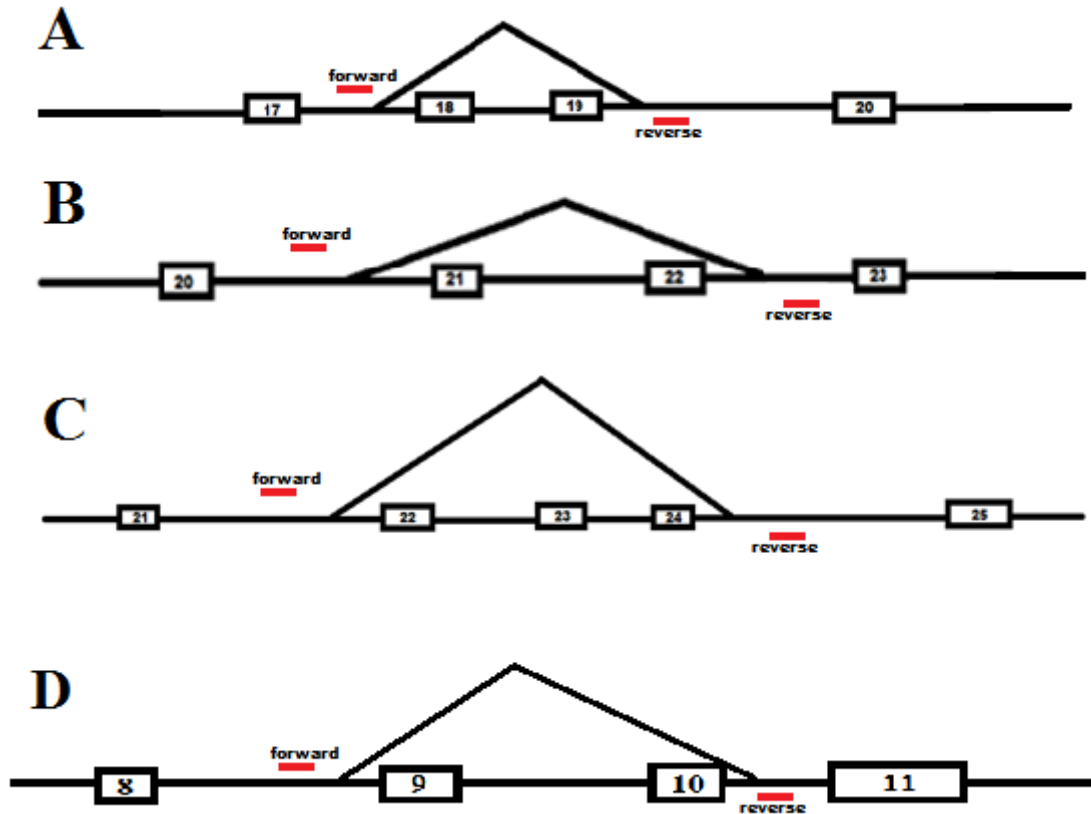
Primery byly navrženy v programu PrimerExpress tak, aby pokrývaly předpokládané deletované oblasti genů (viz Tabulka 2). Podmínkou výběru párů primerů byla minimální self komplementarita bez tvorby volného 3' konce, minimální pravděpodobnost vytváření primer-dimerů a shodné  $T_a$ .

Lyofilizované primery pro PCR byly rozpuštěny na zásobní koncentraci 100 pmol/ $\mu$ l tak, že byla přidána PCR voda podle údajů na zkuševce výrobce. Poté byl připraven pracovní roztok primerů smícháním 90  $\mu$ l PCR vody a 10  $\mu$ l zásobního primeru na konečnou koncentraci 10 pmol/ $\mu$ l. Roztoky byly následně promíchány a pulzně centrifugovány. Na obrázku 11 je schématicky vyobrazena lokalizace navržených primerů pro charakterizaci zlomů u jednotlivých genů.

**Tabulka 2:** Navržené sekvence primerů v programu PrimerExpress pro deletované oblasti exonů 18-19, exonů 21-22 genu *BRCA1*, exonů 22-24 genu *BRCA2* a exonů 9–10 genu *CHEK2*.

Gen	Exon	Orientace	Sekvence primerů (5'-3')	$T_a$
<i>BRCA1</i>	18-19	Forward Reverse	TTCATTGGAGCCAGGTGC GCAATGATGCGATCTCAGC	59 °C
	21-22	Forward Reverse	AGTAGTGAGAAGGAAGGAACAGAT GCACAACCACAATTGGGT	57 °C
<i>BRCA2</i>	22- 24	Forward Reverse	TTTGTCTGTTTAAAGCCATC AATTTGCCAACTGGTAGCTC	
<i>CHEK2</i>	9-10	Forward Reverse	CCAGGAATGAACCCCTTGC ACCTCAGGTGATCTGCCAC	

**Obrázek 11:** Lokalizace navržených primerů pro přímé sekvenování předpokládané deletované oblasti exonů 18-19 genu *BRCA1* (A), exonů 21–22 genu *BRCA1* (B), exonů 22–24 genu *BRCA2* (C) a exonů 9-10 genu *CHEK2* (D).



Legenda: červené obdelníky představují umístění primerů F a R

#### 4.2.2 Koncentrace a čistota DNA

Pro měření koncentrace a čistoty DNA byl využit Spektrofotometr NanoDrop 2000. Nukleové kyseliny absorbují UV o vlnové délce 260 nm a vlnová délka 280 nm nám určuje kontaminaci vzorku bílkovinami. Míru znečištění vzorku proteiny, fenolem, RNA nebo jiné nečistoty určuje poměr absorbance při 260 nm a 280 nm. Kvalita čistoty izolované DNA by se měla pohybovat okolo hodnoty 1,8. Poměr absorbance při vlnových délkách 260 nm a 230 nm určuje druhotnou čistotu nukleových kyselin, která se má pohybovat v rozmezí 1,8-2,2. V případě, že je poměr nižší, jedná se o přítomnost kontaminujících látek, které absorbují při 230 nm.

Nukleová kyselina se nanáší v objemu 1  $\mu$ l na měřicí podstavec. Měření probíhá přímo v nanosené kapce. Výsledky měření se zobrazují ve formě grafu, ze kterého byly odečteny číselné hodnoty koncentrací a čistoty jednotlivých DNA (viz Tabulka 11).

### 4.2.3 Příprava PCR reakční směsi

Všechny DNA pacientek a kontrol bylo nutné nejprve naředit na koncentraci cca 50 ng/μl.

1. Do 1,5 ml mikrokumavky v pracovním boxu napipetovat master mix, pro odpovídající počet vzorků včetně blanku (viz Tabulka 3).
2. Promíchat na třepačce a zcentrifugovat.
3. Dle počtu vzorků konkrétní delece exonů, kontroly a blanku namíchat master mix a po 47 μl napipetovat do 0,2 ml mikrokumavek.
4. Do každé mikrokumavky přidat 3 μl genomické DNA (koncentrace DNA cca 50 ng/μl).
5. Promíchat na třepačce, zcentrifugovat, vložit do termocykléru a spustit reakci dle jednotlivých podmínek PCR (viz Tabulka 4).

### 4.2.4 Gradientová PCR

U vzorků, u nichž nebyla navržená  $T_a$  primerů uspokojivá, byla využita k optimalizaci gradientová PCR, se stejně složeným master mixem (viz Tabulka 3). Rozmezí teplot bylo odvozeno podle teploty tání ( $T_m$ ) od 53–60 °C (viz Tabulka 5). Byla vybrána nejvhodnější  $T_a$ , u níž byl zřetelně na agarózovém gelu zobrazen pruh s délkou odpovídající produktu po deleci příslušných exonů (viz Obrázek 15).

**Tabulka 3:** Složení master mixu pro jeden vzorek (PCR), které bylo univerzálně použito při charakterizaci všech delecí.

Reagencie	Objemy [μl]
H <sub>2</sub> O	20
MYFI	25
Primer F	1
Primer R	1
DNA	3

Legenda: **MYFI:** pufr obsahující polymerázu, **primer F/R:** odpovídající primery potřebné pro charakterizaci jednotlivých delecí.



**Tabulka 4:** Podmínky PCR pro amplifikaci oblastí charakterizujících delece exonů 18-19, exonů 21-22 genu *BRCA1*, exonů 22-24 genu *BRCA2* a exonů 9–10 genu *CHEK2*.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	35	29
Nasedání primerů	57	35	
Extense	72	35	
Závěrečná extense	72	300	1
Zastavení reakce	12	∞	

**Tabulka 5:** Podmínky gradientové PCR pro optimalizaci amplifikace použité při charakterizaci zlomu u delece exonů 18-19 genu *BRCA1*.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	35	30
Nasedání primerů	53-60	30	
Extense	72	35	
Závěrečná extense	72	300	1
Zastavení reakce	12	∞	

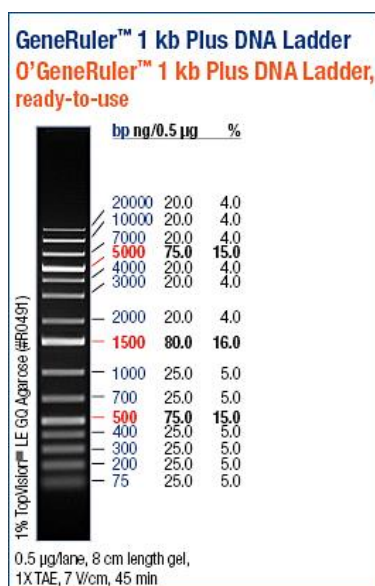
#### 4.2.5 Příprava 1% agarózového gelu

1. Ve 2 erlenmeyerových baňkách smíchat 3 g agarózy s 300 ml 1x TBE pufru.
2. Rozvařit v mikrovlnné troubě 15 minut (min) při 540 W.
3. Opatrně zchladit pod tekoucí studenou vodou.
4. Přidat do každé baňky 15  $\mu$ l Ethidia bromidu a promíchat.
5. Vlít gel do vany a vložit hřebínky (délka gelu minimálně 7 cm).
6. Nechat vychladnout po dobu 45 min.
7. Nakrájjet a uchovávat v dóze s 1x TBE puftrem.

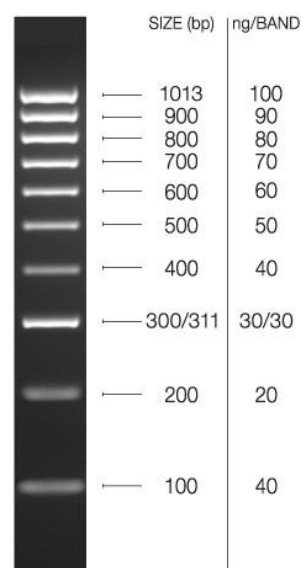
#### 4.2.6 Agarózová gelová elektroforéza – nanášení PCR produktů na gel

1. V 96-ti jamkové destičce smíchat 10  $\mu$ l PCR produktu a 5  $\mu$ l barvy (Loading buffer).  
Nanést do jamky 1% agarózového gelu.
2. Pro posouzení velikosti amplifikovaných fragmentů nanést 5  $\mu$ l dvou velikostních standardů 1 kb a 100 bp (viz Obrázek 12, Obrázek 13).
3. Spustit elektroforézu při napětí 215 V po dobu cca 90 min.
4. Gel přenést na transluminátor, vyfotit a uložit.

Obrázek 12: Velikostní standard 1 kb.



Obrázek 13: Velikostní standard 100 bp.



Převzato z:

<http://eshop.biogen.cz/generuler-1-kb-dna-ladder-100bp.html>

Převzato z:

<http://www.bioline.com/uk/hyperladder-100bp.html>

#### 4.2.7 Vyřezání a extrakce PCR produktu z agarózového gelu

Pokud se na agarózovém gelu ukáže více pruhů, je nutné provést vyřezání a extrakci PCR produktu s odpovídající délkou z gelu.

1. Pod zapnutým transluminátorem zkontrolovat dostatečné rozdělení PCR produktů.
2. Separovaný fragment s požadovaným PCR produktem vyříznout čistým skalpelem, vložit do sterilní 1,5 ml zkumavky.
3. Zapnout termoblok na 50 °C.
4. Přichystat a popsat sterilní 1,5 ml zkumavky.
5. Do zkumavek Collection Tube, které jsou součástí kitu, vložit a popsat kolonky.
6. Do 1,5 ml zkumavky s vyřezaným gelem přidat 500 µl Binding Buffer CB.
7. Inkubovat 10 min při 50 °C.
8. Vzorek promíchat na třepačce a přenést na připravenou kolonku.
9. Centrifugovat 30 sekund (s) při 11 360 rcf. Supernatant vylít.
10. Na kolonku napipetovat 700 µl Wash Buffer CW. Centrifugovat 30 s při 11 360 rcf. Supernatant vylít.
11. Na kolonku napipetovat 700 µl Wash Buffer CW. Centrifugovat 30 s při 11 360 rcf. Supernatant vylít.
12. Centrifugovat 1 min při 15 900 rcf.
13. Kolonku přenést do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky.
14. Doprostřed kolonky napipetovat 30 µl Elution Buffer C.
15. Inkubovat 1 min při pokojové teplotě.
16. Centrifugovat 1 min při 11 360 rcf.
17. Kolonku vyhodit a PCR produkt v 1,5 ml zkumavce uchovat v lednici k dalšímu použití.

#### 4.2.8 Enzymatické přečištění PCR produktů

1. V pracovním boxu připravit mix EXO/FastAP v poměru 1 : 2, promíchat na třepačce a zcentrifugovat.
2. Do připravených popsaných 0,2 ml mikrozkušavek napipetovat 1,5 µl EXO/FastAp a 5 µl PCR produktu.
3. Promíchat na třepačce a zcentrifugovat.
4. Vložit do termocykléru a zapnout dle přednastavených podmínek (viz Tabulka 6).

**Tabulka 6:** Podmínky pro enzymatické přečištění PCR produktů

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
1	37	900
2	85	
Zastavení reakce	8	

#### 4.2.9 Sekvenační PCR

1. V pracovním boxu připravit a popsát 0,2 ml mikrozkušavky (zvlášť pro primer F a primer R).
2. Připravit sekvenační master mix pro každý primer F nebo R zvlášť (viz Tabulka 7).
3. Přidat 0,8 µl přečištěného PCR produktu z předchozího kroku.
4. Promíchat na třepačce a zcentrifugovat.
5. Vložit do termocykléru a zapnout dle přednastavených podmínek teplotního profilu sekvenační PCR reakce (viz Tabulka 8).

**Tabulka 7:** Složení sekvenačního master mixu pro 1 reakci.

Reagencie	Objemy [µl]
PCR voda	6,7
BDX64 (BigDye® Enhancing Buffer)	1
BigDye® Terminator v3.1	1
Primer F nebo primer R	0,5

**Tabulka 8:** Podmínky sekvenační PCR reakce.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
1	96	60	1
2	96	10	25
3	50	5	
4	60	240	
Zastavení reakce	8		

#### 4.2.10 Přečištění sekvenačních produktů magnetickými kuličkami

Předčištění sekvenačních produktů slouží k odstranění přebytečných dNTP, ddNTP a primerů z PCR před sekvenováním.

1. Přepipetovat PCR produkty do 96-ti jamkové sekvenační destičky.
2. Sekvenační destičku zakrýt septem a pulzně stočit v centrifuze.
3. Připravit a popsat druhou sekvenační destičku, pro transfer PCR produktů.
4. Do rezervoáru doplnit chemikálie (viz Tabulka 9).
5. Doplnit špičky dle potřeby.
6. Vložit destičku s PCR produkty, bez septa, vložit destičku pro transfer přečištěných PCR produktů.
7. Vložit hadičku do láhve s 85% ethanolem.
8. Spustit přístroj dle přiloženého návodu výrobce.

**Tabulka 9:** Chemikálie pro pročištění sekvenačních produktů.

Reagencie	Objemy [ $\mu$ l]
Agencourt CleanSeq	10
85% ethanol	60
HPLC voda	40

#### 4.2.11 Sekvenování na analyzátoru ABI PRISM 3100 Avant

Sekvenační reakce proběhla na šestnácti-kapilárovém sekvenátoru s délkou kapiláry 36 cm, při těchto nastavených parametrech přístroje (viz Tabulka 10). K separaci produktu byl využit polymer POP 7 a 1x TAE pufr. Nastavení parametrů přístroje zohledňuje délku sekvenovaných fragmentů a je důležité pro správné rozlišení při kapilární elektroforéze.

**Tabulka 10:** Nejdůležitější parametry přístroje při spuštění sekvenační reakce.

Parametr	Hodnota
Teplota pece	60 °C
Napětí při nástřiku vzorku	5 kV
Doba nástřiku	5 s
Napětí při běhu	13,2 kV
Doba běhu	1800 s

## 5 Výsledky

### 5.1 Kontrola koncentrace a kvality použité DNA

Ke všem analýzám zlomů byla využita DNA, která byla uskladněna při -80 °C. Výsledky měření parametrů kvality a koncentrace jednotlivých vzorků DNA kontrol a pacientek s karcinomem prsu jsou uvedeny v tabulce 11. Všechny vzorky bylo možné označit za vyhovující po stránce kvality i kvantity pro PCR.

**Tabulka 11:** Naměřená koncentrace a čistota DNA pacientek a kontrol pro charakterizaci delece exonů 18-19, exonů 21-22 genu *BRCA1*, exonů 22-24 genu *BRCA2* a exonů 9-10 genu *CHEK2*.

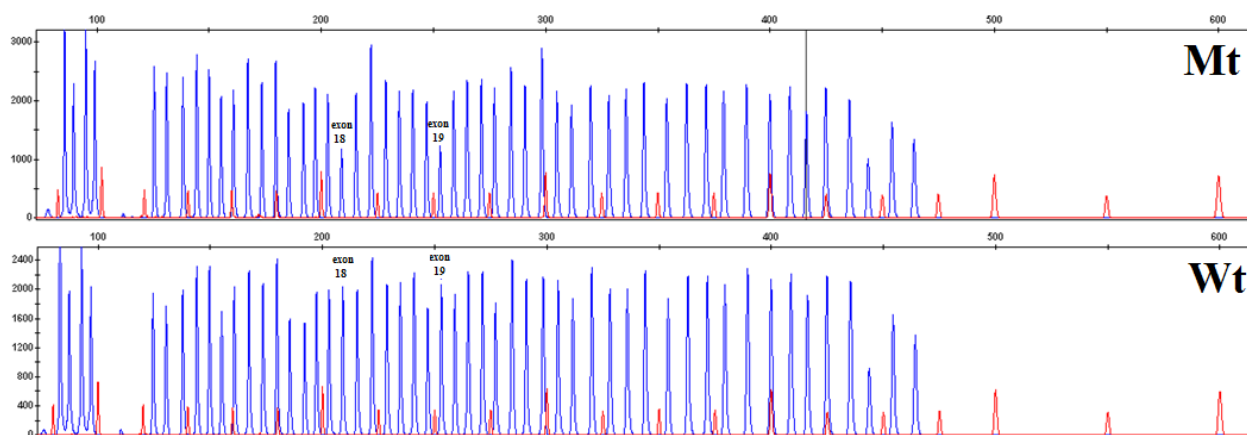
Označení vzorku	Koncentrace DNA [ng/ul]	A 260/280	A 260/230	Sledovaná změna zachycená MLPA	Gen
B1288	50,2	1,72	1,75	Delece exonů 18-19	<i>BRCA1</i>
B159	50,8	1,86	1,81	Delece exonů 21-22	
B311	53,2	1,82	1,86		
B325	35,3	1,96	1,94	Delece exonů 22-24	<i>BRCA2</i>
P112	22,1	1,81	1,98		
CH80	65,2	1,87	1,95	Delece exonů 9-10	<i>CHEK2</i>
B1588C	1593,9	1,92	2,10		
Negativní kontrola	342,8	1,89	2,10		
Negativní kontrola	103,1	1,77	2,22		

Legenda: Jako negativní kontrola je použita DNA zdravých osob.

## 5.2 Výsledek charakterizace delece exonů 18-19 genu *BRCA1*

U pacientky B1288 byla metodou MLPA detekována rozsáhlá delece exonů 18–19 genu *BRCA1* (viz Obrázek 14). Před vlastním zahájením analýzy byla nejprve provedena optimalizace teploty nasedání primerů s využitím gradientové PCR a elektroforetické separace produktů na 1% agarózovém gelu (viz Obrázek 15). Výsledky optimalizace byly využity při následné analýze. Přímým sekvenováním PCR produktu izolovaného z gelu s využitím navržených primerů, na genomické úrovni byla zjištěna rozsáhlá delece 1940 bp NG\_005905.2:g.60402\_62341del1940. Ke zlomům došlo v pozici g.60402 intronu 17 a g.62341 intronu 19 (viz Obrázek 16, Obrázek 17). Tato delece vede na jedné alele genu ke kompletnímu odstranění exonů 18 a 19 genu *BRCA1*, včetně části intronů 17 a 19. Pacientka je tedy heterozygotem pro uvedenou variantu. Na úrovni mRNA dojde v důsledku této sekvenční změny k posunu čtecího rámce (viz Obrázek 18) a následně k vytvoření předčasného terminačního kodónu v pozici 1692 aminokyselinového řetězce LRG\_292p1:p.(Asp1692Alafs\*2). To vede v důsledku předčasné terminace translace s největší pravděpodobností ke zkrácení proteinu.

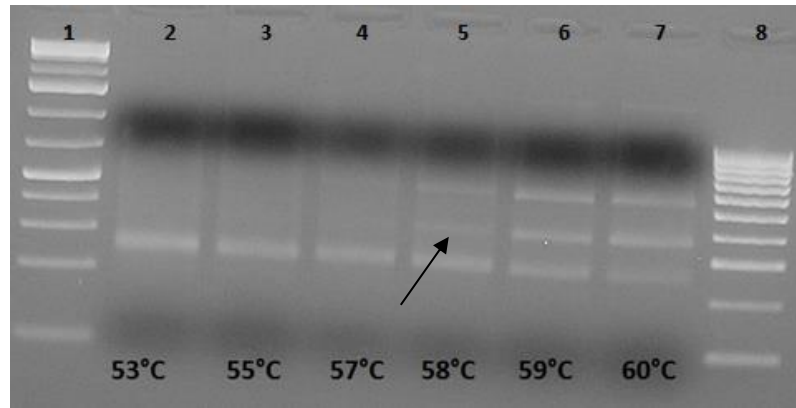
**Obrázek 14:** Výsledek MLPA zachycující přítomnost delece exonů 18–19 genu *BRCA1*.



**Legenda:** Mt- pacientka B1288, Wt- kontrolní vzorek

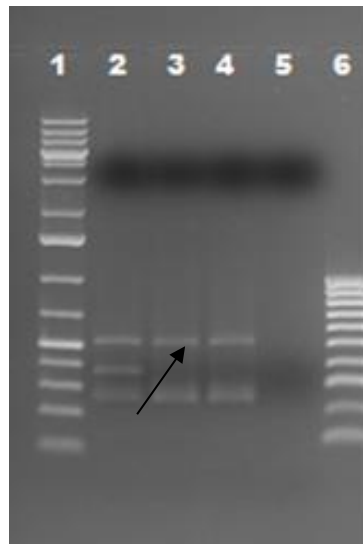
U vzorku pacientky (Mt) si lze ve srovnání s kontrolou (Wt) všimnout výrazného poklesu výšky dvou píků pro exony 18 a 19, který je charakteristický pro rozsáhlou deleci na jedné alele genu.

**Obrázek 15:** Výsledek elektroforetické separace produktů na 1% agarózovém gelu po gradientové PCR při optimalizaci amplifikace pro charakterizaci delece exonů 18-19 genu *BRCA1*, 215 V, 90 minut.



Legenda: **Dráha 1:** velikostní standard 1 kb (DNA Ladder), **Dráhy 2-7:** PCR produkty pacientky B1288 s rozdílnými  $T_a$  (spodní část obrázku), **Dráha 8:** velikostní standard 100 bp (Hyperladder). Šipkou je označen vyříznutý fragment o délce 367 bp, který odpovídá oblasti vzniklé po deleci exonů 18-19.

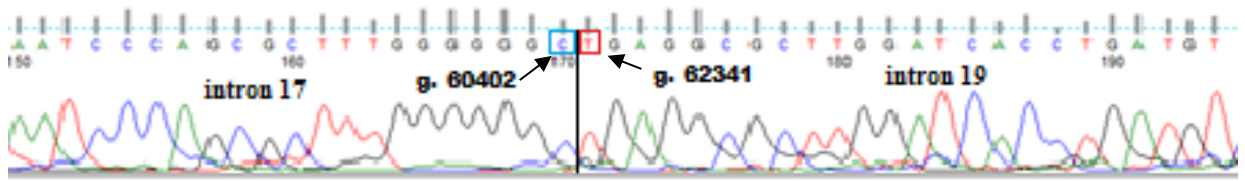
**Obrázek 16:** Výsledek elektroforetické separace produktů pacientky B1288 a dvou onkologicky zdravých kontrol na 1% agarózovém gelu po optimalizaci podmínek PCR při charakterizaci zlomů u delece exonů 18-19 genu *BRCA1*, 215 V, 90 minut,  $T_a$  59 °C.



Legenda: **Dráha 1:** velikostní standard 1 kb (DNA Ladder), **Dráha 2:** delece exonu 18-19 genu *BRCA1* u pacienta B1288 (šipka označuje vyříznutý PCR fragment o délce 367 bp), **Dráhy 3-4:** negativní kontroly (nespecifické fragmenty o délce 280 bp a 510 bp), **Dráha 5:** blank, **Dráha 6:** velikostní standard 100 bp (Hyperladder).

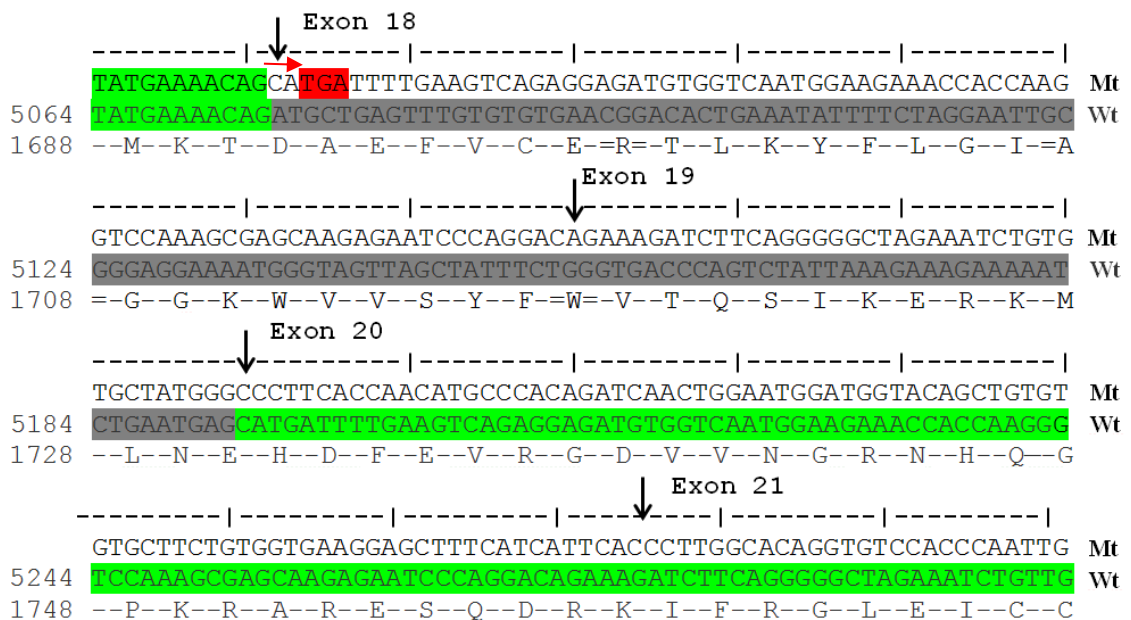


**Obrázek 17:** Výsledek Sangerova sekvenování fragmentu o délce 367 bp izolovaného z agarózového gelu a genomická lokalizace zlomů.



**Legenda:** Šipkami jsou označeny přesné genomické pozice zlomů v intronech 17 a 19 genu *BRCA1*, které způsobily vznik delece exonů 18 a 19.

**Obrázek 18:** Výsledek dopadu delece exonů 18-19 genu *BRCA1* na úrovni cDNA, včetně lokalizace vzniklého předčasného stop kodonu.



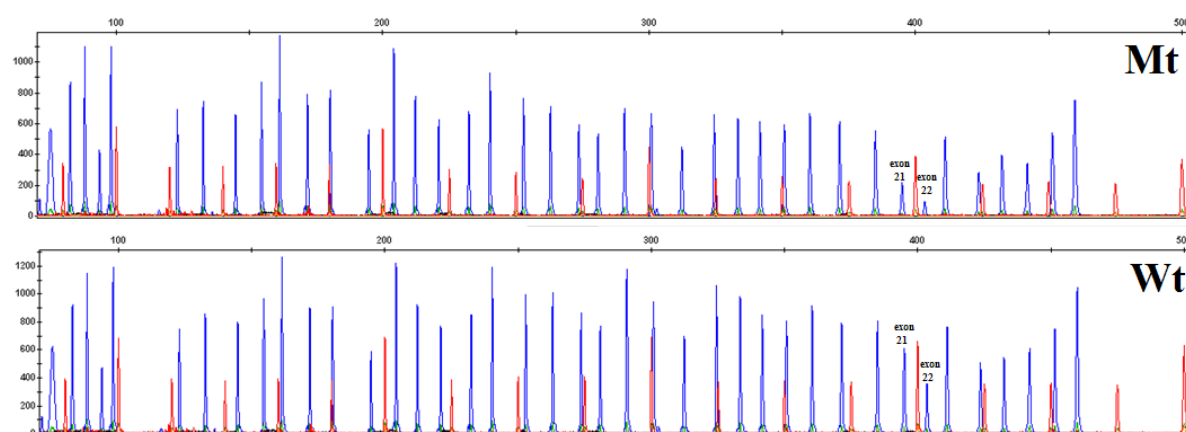
**Legenda:** **Mt-** alela obsahující delecii, **Wt-** alela s kompletní sekvencí

Zeleně jsou označené nedeletované nukleotidy, šedá barva znázorňuje deletovanou oblast exonů 18-19 genu *BRCA1*. V důsledku delece exonů došlo k posunu čtecího rámce a vzniku předčasného terminačního kodonu, označeno červeně. Červená šipka označuje první změněný kodon, od kterého dále pokračuje posun čtecího rámce.

### 5.3 Výsledek charakterizace delece exonů 21-22 genu *BRCA1*

Metodou MLPA byla dříve detekovaná rozsáhlá intragenová delece exonu 21–22 genu *BRCA1* u dvou pacientek B159 a B311 (viz Obrázek 19). U pacientky B159 byli zároveň vyšetřeni její dva synové, ale prediktivní testy u nich neprokázaly přítomnost této delece (viz Obrázek 20). Přímým sekvenováním PCR produktů s využitím navržených primerů byla zjištěna rozsáhlá intragenová delece o velikosti 3779 bp a zároveň následná inserce 236 bp NG\_005905.2:g.73876\_77654del13779ins236 (viz Obrázek 21). Jedná se tedy o rozsáhlou delečně-inserční (delins) sekvenční variantu. U vloženého úseku DNA bylo pomocí blastování zjištěno, že se jedná o oblast shodnou s genem *NBR2*, který přímo sousedí s genem *BRCA1* (viz Obrázek 22). Tato delins varianta vedla k odstranění 43 aminokyselin proteinu *BRCA1* p.Ile1760\_Thr1802del43 (viz Obrázek 23). V důsledku delece nedošlo k posunu čtecího rámce a vytvoření předčasného terminačního kodonu.

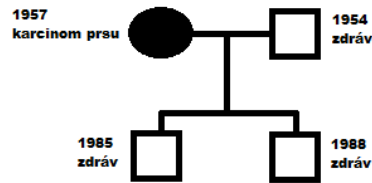
**Obrázek 19:** Výsledek MLPA zachycující přítomnost delece exonů 21–22 genu *BRCA1*.



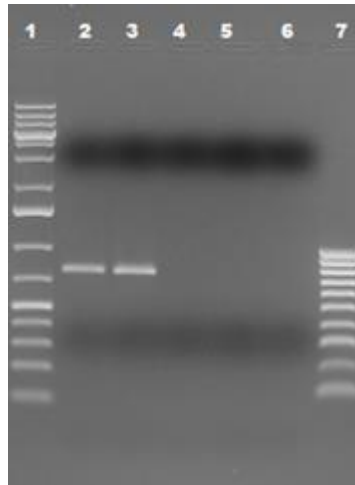
Legenda: **Mt**- pacientka B159, **Wt**- kontrolní vzorek

U vzorku pacientky (Mt) si lze všimnout výrazného poklesu výšky dvou píků pro exony 21 a 22 genu *BRCA1* ve srovnání s kontrolou (Wt).

**Obrázek 20:** Rodokmen zobrazující pozitivní záchyt delece exonů 21–22 u pacientky B159 a negativní výsledek cílené MLPA analýzy u obou jejich potomků.



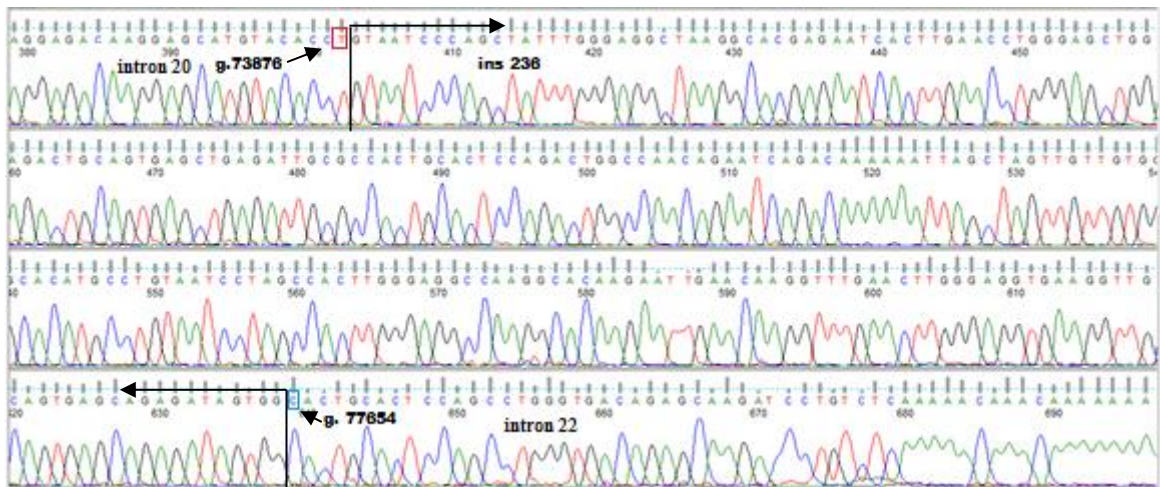
**Obrázek 21:** Výsledek elektroforetické separace PCR produktů na 1% agarózovém gelu při charakterizaci zlomů u delece exonů 21-22 genu *BRCA1*, 215 V, 90 minut, Ta 57 °C.



**Legenda:** **Dráha 1:** velikostní standard 1 kb (DNA Ladder), **Dráha 2-3:** delece exonu 21-22 genu *BRCA1* u pacientek B159 a B311 (PCR fragment o velikosti 766 bp je přítomen pouze v případě výskytu delece),

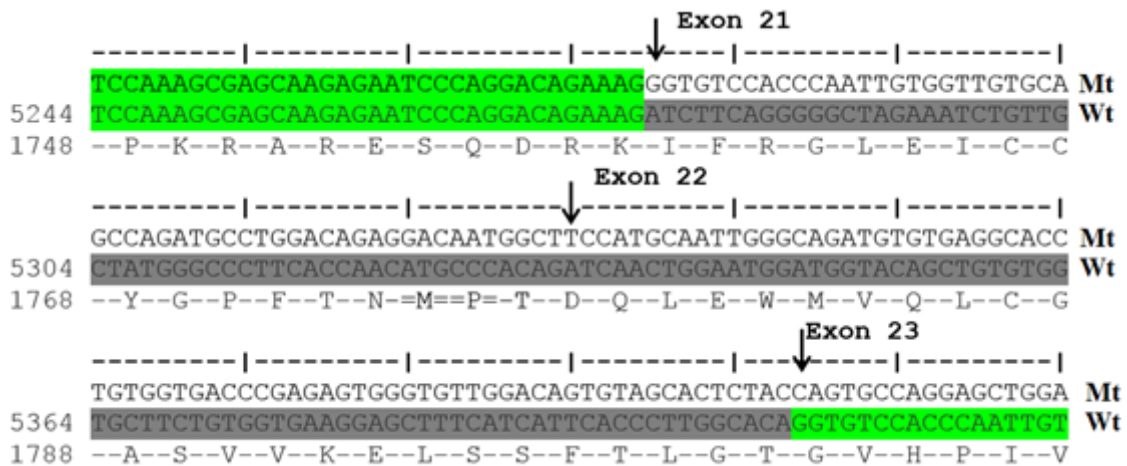
**Dráha 4-5:** negativní kontroly, **Dráha 6:** blank, **Dráha 7:** velikostní standard 100 bp (Hyperladder)

**Obrázek 22:** Výsledek Sangerova sekvenování a genomická lokalizace zlomů při delins mutaci.



**Legenda:** Šikmými šipkami jsou označeny přesné genomické pozice zlomů v intronech 20 a 22 genu *BRCA1*, které na cDNA úrovni způsobily kompletní delecí exonů 21 a 22. Svislé černé čáry s šipkami označují na genomické úrovni insertovaný úsek DNA o délce 236 bp.

**Obrázek 23:** Výsledek dopadu rozsáhlé delins varianty vedoucí ke kompletnímu odstranění exonů 21-22 genu *BRCA1* na úrovni cDNA bez posunu čtecího rámce.



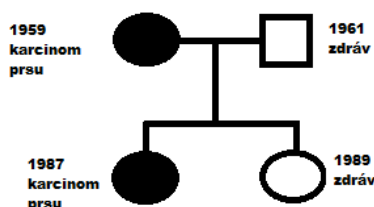
**Legenda:** **Mt**- alela obsahující delecí, **Wt**- alela s kompletní sekvencí

Zeleně označeny nedeletované nukleotidy. Šedě znázorněna deletovaná oblast exonů 21–22 genu *BRCA1*, což odpovídá na proteinové úrovni 43 aminokyselinám.

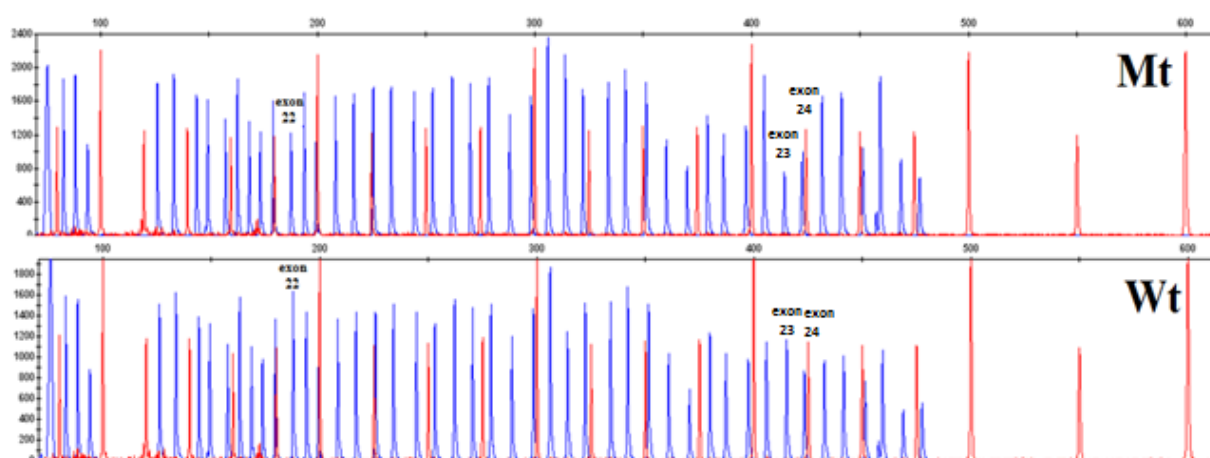
## 5.4 Výsledek charakterizace delece exonů 22-24 genu *BRCA2*

U pacientky B325 a u její dcery P112 (viz Obrázek 24) byla nalezená delece exonů 22-24 genu *BRCA2*, která byla dříve zjištěna pomocí metody MLPA při laboratorní rutinní analýze (viz Obrázek 25). Přímým sekvenováním PCR produktu s využitím navržených primerů byla na jedné alele genu ověřená rozsáhlá intragenová delece o velikosti 637 bp genomické DNA, NG\_012772.1:g.68969\_69605del637 (viz Obrázek 26). Při charakterizaci zlomových míst jsme odhalili kompletní delecii exonu 23, exony 22 a 24 však byly deletovány pouze částečně. Místo zlomu v DNA je uvedeno na obrázku 27. Tato delece způsobuje na úrovni cDNA ztrátu 310 bp kódující oblasti LRG\_293t1:c.8886\_9195del, což vede k posunu čtecího rámce a ke vzniku předčasného stop kodonu v pozici 2971 aminokyselinového řetězce, LRG\_293p1:p.Leu2971Phefs\*10 (viz Obrázek 28). Jedná se o klinicky významnou variantu, která je s největší pravděpodobností příčinou nádorového onemocnění prsu u pacientky.

**Obrázek 24:** Rodokmen zobrazující pozitivní záchyt delece exonů 22–24 genu *BRCA2* u pacientky B325 a jedné z jejích dvou dcer (vzorek P112).



**Obrázek 25:** Výsledek MLPA zachycující přítomnost delece exonů 22–24 genu *BRCA2*.



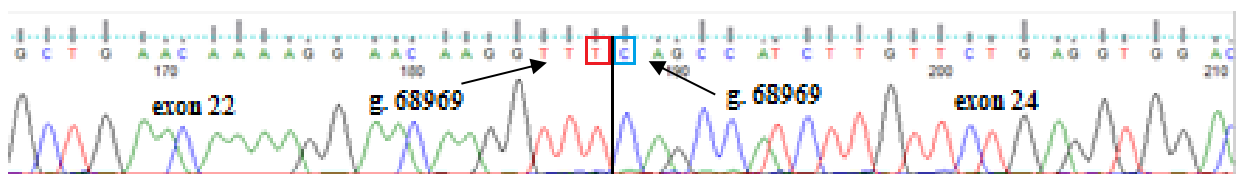
**Legenda:** U vzorku pacientky (Mt) je ve srovnání s kontrolou (Wt) zřetelný poklesu výšky tří píků, které odpovídají exonům 22, 23 a 24 genu *BRCA2*. **Mt-** vzorek pacientky B325 s přítomností delece exonů 22–24 genu *BRCA2*, **Wt-** vzorek bez přítomnosti delece

**Obrázek 26:** Výsledek elektroforetické separace PCR produktů na 1% agarózovém gelu při charakterizaci zlomů u delece exonů 22-24 genu *BRCA2*, 215 V, 90 minut, Ta 57 °C.



**Legenda:** **Dráha 1:** velikostní standard 1 kb (DNA Ladder), **Dráhy 2-3:** pacientka je heterozygot pro delecí exonů 22-24 genu *BRCA2*, černými šipkami jsou označeny PCR fragmenty o délce 377 bp, které jsou specifické pro delecí exonů 22-24 genu *BRCA2*, modré šipky označují fragment specifický pro druhou alelu wild type **Dráha 4:** negativní kontrola se specifickým fragmentem pro wild type o velikosti 1014 bp, **Dráha 5:** blank, **Dráha 6:** velikostní standard 100 bp (Hyperladder).

**Obrázek 27:** Výsledek Sangerova sekvenování a genomická lokalizace zlomů u delece exonů 22–24 genu *BRCA2*.



**Legenda:** Šikmými šipkami jsou označeny přesné genomické pozice zlomů nacházející se uvnitř exonů 22 a 24 genu *BRCA2*.

**Obrázek 28:** Výsledek dopadu částečné delecce exonů 22-24 genu *BRCA2* na úrovni cDNA, včetně lokalizace vzniklého předčasného stop kodónu.

		<b>exon 22</b>		<b>místo zlomu</b> ↑	
9061	AGTTGGAAATTAGGAAGGCCATGGAATCTGCTGAACAAAAGGAACAAGGTTTATCAAGGG				<b>Wt</b>
8834	AGTTGGAAATTAGGAAGGCCATGGAATCTGCTGAACAAAAGGAACAAGGTTT <b>CAGCCATC</b>				<b>Mt</b>
2945	Q--L--E--I--R--K--A--M--E--S--A--E--Q--K--E--Q--G--L--S--R--				
		<b>exon 24</b>			
9121	ATGTCACAACCGTGTGGAAGTTGCGTATTGTAAGCTATTCAAAAAAAGAAAAAGATTTCAG				<b>Wt</b>
8894	<b>TTGTTCTGAGGTGGACC</b> <b>TAA</b> TAGGATTTGTCGTTTCGTGTGTGAAAAAAACAGGACTTGC				<b>Mt</b>
2965	D--V--T--T--V--W--K--L--R--I--V--S--Y--S--K--K--E--K--D--S--				
9181	TTATACTGAGTATTTGGCGTCCATCATCAGATTTATATTCTCTGTTAACAGAAGGAAAGA				<b>Wt</b>
8954	<b>CCCTTTGCTCTATTTGTCAGACGAATGTTACAATTTACTGGCAATAAAGTTTTGGATAGA</b>				<b>Mt</b>
2985	V--I--L--S--I--W--R--P--S--S--D--L--Y--S--L--L--T--E--G--K--				
9241	GATACAGAATTTATCATCTTGCAACTTCAAATCTAAAAGTAAATCTGAAAGAGCTAACA				<b>Wt</b>
9014	<b>CCCTTAATGAGGACATTATTAAGCCTCATATGTTAATTGCTGCAAGCAACCTCCAGTGGCC</b>				<b>Mt</b>
3005	R--Y--R--I--Y--H--L--A--T--S--K--S--K--S--K--S--E--R--A--N--				
9301	TACAGTTAGCAGCGACAAAAAAACTCAGTATCAACAACCTACCGGTTTCAGATGAAATTT				<b>Wt</b>
9074	<b>ACCAGAAFCCAAATCAGGCCTTCTTACTTTATTTGCTGGAGATTTTTCTGTGTTTTCTG</b>				<b>Mt</b>
3025	I--Q--L--A--A--T--K--K--T--Q--Y--Q--Q--L--P--V--S--D--E--I--				

**Legenda:** **Mt-** alela obsahující delecii, **Wt-** alela s kompletní sekvencí

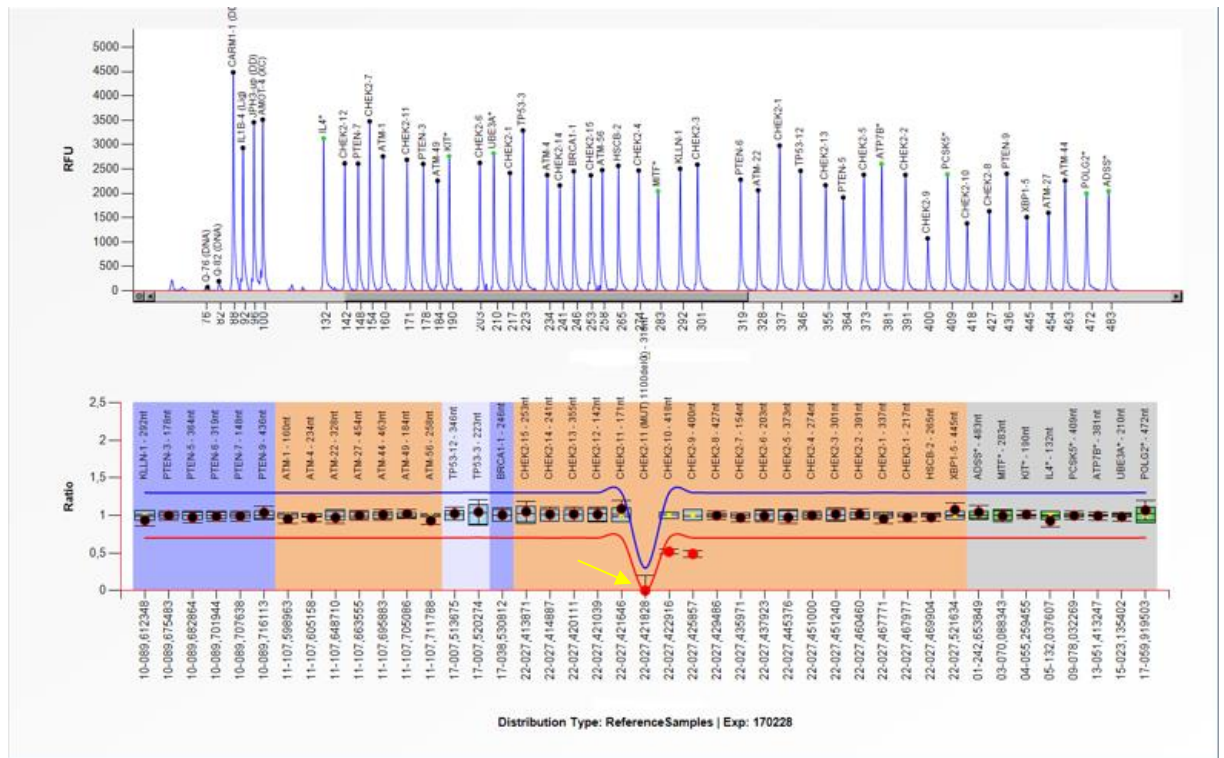
Zeleně označeny jsou nedeletované nukleotidy exonu 24. Modře je označena sekvence exonů 22. Exon 23 je úplně deletovaný, včetně intronů 22 a 23. V důsledku delecce exonů došlo k posunu čtecího rámce a vzniku předčasného terminačního kodónu (TAA), označeno červeně.

## 5.5 Výsledek charakterizace delecce exonů 9-10 genu *CHEK2*

Gen *CHEK2* byl zařazen do analýzy nad rámec zadání bakalářské práce. Byla zahájena optimalizace PCR podmínek pro charakterizaci zjištěné intragenové přestavby exonů 9-10. Sondy použité při MLPA (viz. Obrázek 29) pomoci, kterých byla odhalena delecce exonů 9 a 10 genu *CHEK2* vymezily minimální krajní pozice, ve kterých došlo k delecii oblastí. Pro překrytí zlomů byly navrženy primery pokrývající oblast exonů 9-10 genu *CHEK2* o velikosti 3387 bp (viz Obrázek 11) K amplifikaci byla využita MYFI polymeráza, která je podle specifikace výrobce schopna amplifikovat úseky do 5 kb s upraveným PCR protokolem. Výsledky PCR jsou na obrázku 30. S nastavenými parametry PCR nedošlo k potřebné amplifikaci požadovaného úseku a bude potřeba dále podmínky optimalizovat.

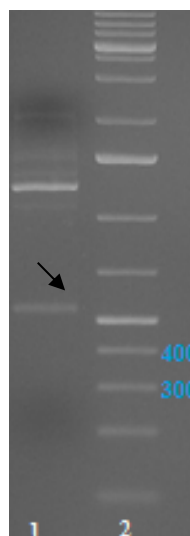


**Obrázek 29:** Výsledek MLPA zachycující přítomnost delece exonů 9–10 genu *CHEK2*.



**Legenda:** Červené body v oblasti exonů 9 a 10 genu *CHEK2* označené jako *CHEK2-9* a *CHEK2-10* ukazují snížení fluorescenčního signálu o polovinu, což odpovídá nepřítomnosti jedné alely pro exony 9 a 10. Žlutou šipkou je označen bod, který se zobrazuje pouze v nepřítomnosti patologické varianty c.1100delC.

**Obrázek 30:** Výsledek elektroforetické separace PCR produktů na 1% agarózovém gelu při charakterizaci zlomů u delece exonů 9-10 genu *CHEK2*, 215 V, 90 minut, Ta 57 °C.



**Legenda:** **Dráha 1:** Výskyt nespecifických produktů v této dráze naznačuje nutnost další optimalizace PCR. Modrá šipka označuje očekávanou oblast výskytu PCR fragmentu specifického při deleci exonů 9-10 genu *CHEK2*. **Dráha 2:** velikostní standard 1 kb (DNA Ladder).



## 6 Diskuze

Karcinom prsu je multifaktoriální onemocnění, kterým v české populaci onemocní během života každá desátá žena a patří mezi nejčastější dědičné onemocnění. Cílem této bakalářské práce byla přesná charakterizace zlomů u rozsáhlých intragenových přestaveb genu *BRCA1* a *BRCA2*. Pro práci byla využita DNA pacientek, u kterých byla už dříve, v Laboratoři Agel, metodou MLPA zachycena rozsáhlá intragenová přestavba některého úseku genů *BRCA1/2*. Patientky byly zařazeny do analýzy po splnění aktuálních indikačních kritérií. Pro amplifikaci dlouhých deletovaných úseků bylo původně plánováno využití LR-PCR, která je určena pro amplifikace sekvencí dlouhých až 20 kb. LR-PCR byla použita podle doporučení výrobce, nicméně ani po optimalizaci (gradientová PCR, změna koncentrace DMSO, DNA) nebylo možné získat odpovídající PCR produkt. Selhání LR-PCR mohlo nastat z několika důvodů. Jedním z nich je neoptimální délka trvání jednotlivých kroků PCR, přestože byly tyto parametry nastaveny podle doporučení výrobce v odpovídající délce, PCR neproběhla. Pro dosažení potřebné úrovně amplifikace by tyto parametry musely být dále zdlouhavě optimalizovány, včetně změny vstupní koncentrace DNA nebo změn poměrů jednotlivých komponent master mixu. Je také možné, že použitá DNA nebyla, oproti prosté PCR, pro tuto aplikaci dostatečně kvalitní (viz Tabulka 11). Její izolace proběhla podle standardního operačního postupu pro automatickou izolaci na robotu M48 (Qiagen). V rámci této izolace však nemuselo dojít k důkladnému odstranění všech nežádoucích látek, které pak mohly způsobit selhání LR-PCR. Z výše uvedených důvodů bylo od použití LR-PCR odstoupeno a k amplifikaci byla použita polymeráza MYFI s 5'→3' exonukleázovou aktivitou od firmy Bionline, u níž byla deklarována schopnost amplifikovat úseky až do velikosti více než 10 kb.

Jednou z charakterizovaných oblastí zlomů byla intragenová delece exonů 18 a 19 genu *BRCA1*. Analýza této delece byla provedena přímým sekvenováním PCR produktu izolovaného z gelu s využitím navržených primerů. Na genomické úrovni byla zjištěna rozsáhlá delece 1940 bp, NG\_005905.2:g.60402\_62341del1940. Zlom vznikl v nekódující oblasti intronu 17 a intronu 19, došlo tedy ke kompletní delecii exonu 18 a 19. Na úrovni mRNA došlo k posunu čtecího rámce a vzniku předčasného stop kodonu TGA v pozici 1692. Delece exonů 18-19 byla zachycena také v Itálii u pěti pacientů, kteří pocházeli z vysoce rizikových rodin s karcinomy prsu a vaječníků. Tato delece byla popsána jako (L78833) g.62115\_669040del4826 s předčasným stop kodómem v pozici 1693 (Montagna, *et al.*, 2003).

Nicméně její popis se liší od popisu přestavby zjištěné v České republice v Brně Vašíčkovou, *et al.*, (2007). Naprosto stejná delece, která byla popsána v Brně, byla zjištěna také v rámci této bakalářské práce. Brněnské pracoviště pro prvotní analýzu použilo metodu MLPA a poté LR-PCR, která v našem případě nefungovala. Z našich výsledků vyplývá, že záchyt delece exonů 18-19 *BRCA1* se shoduje v jihomoravském a moravskoslezském kraji. Rozdílný zápis zjištěné delece v Itálii může být způsoben použitím jiné starší referenční sekvenec spíše než vznikem zlomu v jiné pozici.

U delece exonů 21 a 22 genu *BRCA1* byly vyšetřovány dvě pacientky a synové jedné z nich, přičemž u synů se přítomnost delece neprokázala. Byla zjištěná rozsáhlá intragenová delins mutace o velikosti 3779 bp. Obsahovala insertovanou sekvenci o velikosti 236 bp, jenž se shoduje s genem *NBR2*, který přímo sousedí s genem *BRCA1*. Díky této delins variantě došlo k odstranění 43 aminokyselin proteinu *BRCA1* p.Ile1760\_Thr1802del43. V důsledku delece nedošlo k posunu čtecího rámce a vytvoření předčasného terminačního kodonu, nicméně deletovaná oblast 43 aminokyselin zasáhla C-terminální BRCT doménu, která je důležitá pro správnou tumor supresorovou funkci proteinu (Williams *et al.*, 2001). Doména BRCT interaguje s celou řadou proteinů, včetně proteinu p53 a funguje jako transaktivátor v obou p53 závislých a nezávislých módech (Chai *et al.*, 1999; Chapman *et Verma*, 1996; Ouchi *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 1998). Lze tedy předpokládat, že tato intragenová přestavba skutečně funkci proteinu poškodí. Vašíčková, *et al.*, (2007) zachytili delecii exonu 21-22 ve dvou vysoce rizikových rodinách. Pro detekci použili metodu MLPA a poté LR-PCR, která odhalila delecii o velikosti cca 3,5 kb *BRCA1* genomické DNA. Sekvence zlomu byla charakterizována jako g.77128\_80906 del3779ins236, což nesouhlasí s naším výsledným zápisem NG\_005905.2:g.73876\_77654del3779ins236. Nesoulad v zápisu koordinát byl způsoben použitím odlišné, starší referenční sekvenec L78833 v roce 2007, kdy byla tato delece prvně charakterizována. Nicméně zlomy se nacházejí na stejných místech a jedná se tedy o identickou přestavbu.

Delece exonů 22–24 genu *BRCA2* byla v ČR detekována poprvé. Tato delece byla zjištěna u pacientky z Moravskoslezského kraje a její dcery. Přesto, že metodou MLPA došlo k odhalení kompletní delece exonů 22-24, pomocí přímého sekvenování jsme zjistili, že se u exonu 22 i u exonu 24 jedná pouze o delecii části exonů. Na úrovni cDNA došlo v důsledku této sekvenční změny ke ztrátě 310 bp kódující oblasti LRG\_293t1:c.8886\_9195del, tím došlo k posunu čtecího rámce a ke vzniku předčasného

stop kodonu v pozici 2971 aminokyselinového řetězce, LRG\_293p1:p.Leu2971Phefs\*10. Intragenové přestavby v genu *BRCA2* se nevyskytují pouze u žen z vysoce rizikových rodin, ale byly zachyceny také u mužů (Ewald *et al.*, 2009). Woodward *et al.*, (2005) publikovali tři záchyty přestaveb v genu *BRCA2* ve 25 rodinách s výskytem alespoň jednoho karcinomu prsu u muže. Častější výskyt intragenových přestaveb a výskyt karcinomu prsu u mužů dávají do souvislosti také Tournier *et al.*, (2004), kteří popsali tři přestavby genu *BRCA2* u 39 francouzských rodin, ve kterých se vyskytoval alespoň jeden případ karcinomu prsu u muže.

Do analýzy velkých intragenových přestaveb byl zařazen také gen *CHEK2*, ve kterém byla v nedávné době v laboratoři zachycena rozsáhlá intragenová delece exonů 9-10. Byla zahájena optimalizace PCR, nicméně elektroforetická separace produktů ukázala přítomnost řady nespecifit. Navíc v oblasti, kde byl očekáván produkt o délce cca 350-400 bp, nebyl zachycen žádný PCR fragment. Nespecifity i nepřítomnost očekávaného produktu mohou být způsobeny více faktory, např. nevyhovující teplotou nasedání primerů nebo nevhodně navrženým párem primerů. V další fázi optimalizace bude provedena gradientová PCR pro upřesnění vhodné Ta. Pokud tato optimalizace znovu selže, budou navrženy nové primery. Zlomová místa této delece, byla prvně charakterizována v Polsku (Cybulski *et al.*, 2007). V ČR je tato varianta poměrně rozšířena (ústní sdělení pracovníků laboratoře).

V rámci této práce jsme pro přehlednost také zjišťovali výskyt intragenových přestaveb v genech *BRCA1* a *BRCA2* v sousedních zemích a ve světě obecně. Mezi populace, u nichž je frekvence výskytu velkých intragenových přestaveb vyšší než 10 % lze zařadit především Nizozemí, Itálii, Austrálii, Nový Zéland a USA. Vysoká frekvence intragenových přestaveb v těchto zemích může být způsobena efektem zakladatele. V některých zemích, jako Kanada nebo Finsko je frekvence naopak nulová nebo velmi nízká. V České Republice se frekvence výskytu pohybuje mezi 6 a 11 %, podobně jako například v Německu, Řecku nebo Francii. V Polsku je frekvence nižší, nabývá hodnoty 4,7 %.

## 7 Závěr

Tato práce se zabývá charakterizací zlomových míst intragenových přestaveb genu *BRCA1*, *BRCA2* a genu *CHEK2*. Jsou to geny, které v mutované formě způsobují karcinom prsu a vaječníku. V teoretické části se věnuje jednotlivým genům a srovnáním nalezených mutací v Evropě a ve světě. V praktické části je zaměřená na charakterizaci delece exonů 18-19 a delece exonů 21-22 genu *BRCA1*, delecí exonů 22-24 genu *BRCA2* a delecí exonů 9-10 genu *CHEK2*.

Výsledky práce odhalily na genomické úrovni, že se u delece exonů 18-19 v genu *BRCA1* zachycené metodou MLPA jedná o sekvenční změnu NG\_005905.2:g.60402\_62341del1940, která vede k vytvoření předčasného terminačního kodonu v pozici 1692 aminokyselinového řetězce, LRG\_292p1:p.(Asp1692Alafs\*2). LRG zachycenou v exonech 21-22 v genu *BRCA1* způsobila delečně-inserční varianta NG\_005905.2:g.73876\_77654del3779ins236, která vedla k odstranění 43 aminokyselin proteinu BRCA1 p.Ile1760\_Thr1802del43 a poškození funkce proteinu. V genu *BRCA2* byla v České republice metodou MLPA zachycena vůbec první velká intragenová delece exonů 22-24. Na genomické úrovni se jedná o variantu NG\_012772.1:g.68969\_69605del637, která způsobuje posun čtecího rámce a vytvoření předčasného terminačního kodonu v pozici 2971 aminokyselinového řetězce, LRG\_293p1:p.Leu2971Phefs\*10.

Po sekvenaci optimalizovaných produktů PCR byly u všech tří vybraných rozsáhlých intragenových přestaveb v genech *BRCA1* a *BRCA2* přesně popsána zlomová místa, která se shodovala s již dříve publikovanými údaji v rámci ČR i mimo republiku. Přesto, že četnost záchytů LRGs v Česku není tak vysoká jako například v Holandské populaci, není jejich výskyt zanedbatelný. Jejich diagnostika pomocí metody MLPA přispívá ke zkvalitnění péče o zdravé příbuzné onkologických pacientek s prokázanou přestavbou, z důvodu jejich zvýšeného riziku vzniku nádorů prsu nebo vaječníků v případě záchytu familiální delece.

## 8 Seznam použité literatury

- Agata, S.**, Dalla Palma, M., Callegaro, M., Scaini, M. C., Menin, C., Ghiotto, C., Nicoletto, O., Zavagno, G., Chieco-Bianchi, L., D'Andrea, E., Montagna, M. (2005). Large genomic deletions inactivate the BRCA2 gene in breast cancer families. *Journal of medical genetics*, 42(10), e64-e64.
- Armour, J. A. L.**, Barton, D. E., Cockburn, D. J., Taylor, G. R. (2002). The detection of large deletions or duplications in genomic DNA. *Human mutation*, 20(5), 325-337.
- Barker, D. F.**, Liu, X., Almeida, E. R. (1996). The BRCA1 and 1A1. 3B promoters are parallel elements of a genomic duplication at 17q21. *Genomics*, 38(2), 215-222.
- Bartek, J.**, Falck, J., Lukas, J. (2001). CHK2 kinase—a busy messenger. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(12), 877.
- Bartkova, J.**, Guldberg, P., Grønbaek, K., Koed, K., Primdahl, H., Møller, K., Lukas, J. Førnstoft, T., Bartek, J. (2004). Aberrations of the Chk2 tumour suppressor in advanced urinary bladder cancer. *Oncogene*, 23(52), 8545.
- Bartkova, J.**, Hořejší, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Ørntoft, T., Lukas, J., Bartek, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434(7035), 864.
- Baumann, P.**, Benson, F. E., West, S. C. (1996). Human Rad51 protein promotes ATP- dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*, 87(4), 757- 766.
- Beck, C. R.**, Collier, P., Macfarlane, C., Malig, M., Kidd, J. M., Eichler, E. E., Badge, R. M., Moran, J. V. (2010). LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell*, 141(7), 1159-1170.
- Begg, C. B.**, Haile, R.W., Borg, A., Malone, K. E., Concannon, P., Thomas, D. C., Langholz, B., Bernstein, L., Olsen, J.H., Lynch, C.F., Anton-Culver, H., Capanu. M., Liang, X., Hummer, A. J., Sima, C., Bernstein, J. L. (2008) Variation of breast cancer risk among BRCA1/2 carriers. *J Am Med Assoc* 299:194–201
- Belancio, V. P.**, Hedges, D. J., Deininger, P. (2008). Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome research*, 18(3), 343-358.

- Bell, D. W.**, Varley, J. M., Szydło, T. E., Kang, D. H., Wahrer, D. C., Shannon, K. E., Lubratovich, M., Verselis, S. J., Isselbacher, K. J., Fraumeni, J. F., Birch, J. M., Li, F. P., Garber, J. E., Haber, D. A. (1999). Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science*, 286(5449), 2528-2531.
- Bignell, G.**, Micklem, G., Stratton, M. R., Ashworth, A., Wooster, R. (1997). The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Human molecular genetics*, 6(1), 53-58.
- Boeke, J. D.**, Garfinkel, D. J., Styles, C. A., Fink, G. R. (1985). Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell*, 40(3), 491-500.
- Bork, P.**, Blomberg, N., Nilges, M. (1996). Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nature genetics*, 13(1), 22.
- Breast Cancer Linkage Consortium.** (1999). Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(15), 1310-1316.
- Brouha, B.**, Schustak, J., Badge, R. M., Lutz-Prigge, S., Farley, A. H., Moran, J. V., Kazazian, H. H. (2003). Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5280-5285.
- Brown, M. A.**, Xu, C. F., Nicolai, H., Griffiths, B., Chambers, J. A., Black, D., Solomon, E. (1996). The 5'end of the BRCA1 gene lies within a duplicated region of human chromosome 17q21. *Oncogene*, 12(12), 2507-2513.
- Brown, T. A.** (2007). *Klonování genů a analýza DNA: Úvod*, pp. 6-7, Univerzita Palackého.
- Collins, N.**, McManus, R., Wooster, R., Mangion, J., Seal, S., Lakhani, S. R., Ormiston, W., Daly, P. A., Ford, D., Easton, D. F. (1995). Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13. *Oncogene*, 10(8), 1673-1675.
- Cybulski, C.**, Gorski, B., Huzarski, T., Masojć, B., Mierzejewski, M., Dębniak, T., Teodorczyk, U., Byrski, T., Gronwald, J., Matyjasik, J., Złowocka, E., Lenner, M., Grabowska, E., Nej, K., Castaneda, J., Medrek, K., Szymańska, A., Szymańska, J., Kurzawski, G., Suchy, J., Oszurek, O., Witek, A., Narod, S. A., Luniński J. (2004). CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *The American Journal of Human Genetics*, 75(6), 1131-1135.

- Cybulski, C.**, Wokołorczyk, D., Huzarski, T., Byrski, T., Gronwald, J., Górski, B., Dębniak, T., Masojć, B., Jakubowska, A., van de Wetering, T., Narod, S. A., Lubiński, J. (2007). A deletion in CHEK2 of 5,395 bp predisposes to breast cancer in Poland. *Breast cancer research and treatment*, 102(1), 119-122.
- de Koning, A. J.**, Gu, W., Castoe, T. A., Batzer, M. A., & Pollock, D. D. (2011). Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS genetics*, 7(12), e1002384.
- de Sousa Dias, M.**, Hernan, I., Pascual, B., Borràs, E., Mañé, B., Gamundi, M. J., Carballo, M. (2013). Detection of novel mutations that cause autosomal dominant retinitis pigmentosa in candidate genes by long-range PCR amplification and next-generation sequencing. *Molecular vision*, 19, 654.
- den Dunnen, J. T.**, White, S. J. (2006). MLPA and MAPH: sensitive detection of deletions and duplications. *Current protocols in human genetics*, 7-14.
- Denli, A. M.**, Narvaiza, I., Kerman, B. E., Pena, M., Benner, C., Marchetto, M. C., Diedrich, J. K., Aslanian, A., Ma, J., Moresco, J. J., Moore, L., Hunter, T., Saghatelian, A., Gade, F. H. (2015). Primate-specific ORF0 contributes to retrotransposon-mediated diversity. *Cell*, 163(3), 583-593
- Dombroski, B. A.**, Mathias, S. L., Nanthakumar, E., Scott, A. F., Kazazian, H. H. (1991). Isolation of an active human transposable element. *Science*, 254(5039), 1805-1808.
- Erlich, H. A.**, Arnheim, N. (1992). Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annual review of genetics*, 26(1), 479-506.
- Ewald, I. P.**, Ribeiro, P. L. I., Palmero, E. I., Cossio, S. L., Giugliani, R., Ashton-Prolla, P. (2009). Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: a literature review. *Genetics and molecular biology*, 32(3), 437-446.
- Feng, Q.**, Moran, J. V., Kazazian, H. H., Boeke, J. D. (1996). Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*, 87(5), 905-916.
- Finnegan, D. J.** (1989). Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in genetics*, 5, 103-107.
- Flores-Rozas, H.**, Kolodner, R. D. (2000). Links between replication, recombination and genome instability in eukaryotes. *Trends in biochemical sciences*, 25(4), 196-200.

- Ford, D.**, Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D. T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., Sobol, H., Teare, M. D., Struewing, J., Arason, A., Scherneck, S., Peto, J., Rebbeck, T. R., Tonin, P., Neuhausen, S., Barkardottir, R., Eyfjord, J., Lynch, H., Ponder, B. A. J., Gayther, S. A., Birch, J. M., Lindblom, A., Stoppa-Lyonnet, D., Bignon, Y., Borg, A., Hamann, U., Haitles, N., Schott, R. J., Maugard, C. M., Vasen, H., Seitz, S., Cannon-Albright, L. A., Schofield, A., Zelanda-Hedman, M. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *The American Journal of Human Genetics*, 62(3), 676-689.
- Friedman, L. S.**, Ostermeyer, E. A., Szabo, C. I., Dowd, P., Lynch, E. D., Rowell, S. E., King, M. C. (1994). Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nature genetics*, 8(4), 399.
- Futreal, P. A.**, Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Miki, Y. (1994). BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 266(5182), 120-122.
- Gad, S.**, Scheuner, M. T., Pages-Berhouet, S., Caux-Moncoutier, V., Bensimon, A., Aurias, A., Pinto, M., Stoppa-Lyonnet, D. (2001). Identification of a large rearrangement of the BRCA1 gene using colour bar code on combed DNA in an American breast/ovarian cancer family previously studied by direct sequencing. *Journal of medical genetics*, 38(6), 388-392.
- Gad, S.**, Klinger, M., Caux-Moncoutier, V., Pages-Berhouet, S., Gauthier-Villars, M., Coupier, I., Bensimon, A., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D. (2002). Bar code screening on combed DNA for large rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes in French breast cancer families. *Journal of medical genetics*, 39(11), 817-821.
- Garfinkel, D. J.**, Boeke, J. D., Fink, G. R. (1985). Ty element transposition: reverse transcriptase and virus-like particles. *Cell*, 42(2), 507-517.
- Gayther, S. A.**, Harrington, P., Russell, P., Kharkevich, G., Garkavtseva, R. F., Ponder, B. A. (1996). Rapid detection of regionally clustered germ-line BRCA1 mutations by multiplex heteroduplex analysis. UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group. *American journal of human genetics*, 58(3), 451.
- Goldstein, D. B.**, Pollock, D. D. (1997). Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of heredity*, 88(5), 335-342.
- Gomez, L. C.**, Marzese, D. M., Adi, J., Bertani, D., Ibarra, J., Mol, B., Vos, I. J., de Marchi, G., Roqué, M. (2009). MLPA mutation detection in Argentine HNPCC and FAP families. *Familial cancer*, 8(1), 67.



- Green, M. M.** (1988). Mobile DNA elements and spontaneous gene mutation. *Banbury Rep*, 30, 41-50.
- Grimaldi, G.,** Skowronski, J., Singer, M. F. (1984). Defining the beginning and end of KpnI family segments. *The EMBO journal*, 3(8), 1753.
- Hall, J. M.,** Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250(4988), 1684-1689.
- Hancks, D. C.,** Kazazian, H. H. (2016). Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mobile DNA*, 7(1), 9.
- Hansen, T. V. O.,** Jønson, L., Albrechtsen, A., Andersen, M. K., Ejlersen, B., Nielsen, F. C. (2009). Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. *Breast cancer research and treatment*, 115(2), 315-323.
- Harismendy, O.,** Ng, P. C., Strausberg, R. L., Wang, X., Stockwell, T. B., Beeson, K. Y., Schork, N. J., Murray, S. S., Topol, E. J., Levy, S., Frazer, K. A. (2009). Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome biology*, 10(3), R32.
- Harkin, D. P.,** Bean, J. M., Miklos, D., Song, Y. H., Truong, V. B., Englert, C., Christians, F. C., Ellisen, L. W., Maheswaran, S., Oliner, J. D., Haber, D. A. (1999). Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*, 97(5), 575-586.
- 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.
- Hendrickson, B. C.,** Judkins, T., Ward, B. D., Eliason, K., Deffenbaugh, A. E., Burbidge, L. A., Pyne, K., Leclair, B., Ward, B. E., Scholl, T. (2005). Prevalence of five previously reported and recurrent BRCA1 genetic rearrangement mutations in 20,000 patients from hereditary breast/ovarian cancer families. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 43(3), 309-313.
- Hogervorst, F. B.,** Nederlof, P. M., Gille, J. J., McElgunn, C. J., Grippeling, M., Pruntel, R., Regnerus, R., Welsem, T., Spaendonk, R., Menko, F. H., Kluijdt, I., Dommering, Ch., Verhoef, S., Schouten, J. P., van't Veer, J., Pals, G., Kluijdt, I. (2003). Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer research*, 63(7), 1449-1453.

- Holmes, S. E.**, Singer, M. F., Swergold, G. D. (1992). Studies on p40, the leucine zipper motif-containing protein encoded by the first open reading frame of an active human LINE-1 transposable element. *Journal of Biological Chemistry*, 267(28), 19765-19768
- Hu, Y. F.**, Li, R. (2002). JunB potentiates function of BRCA1 activation domain 1 (AD1) through a coiled-coil-mediated interaction. *Genes & development*, 16(12), 1509-1517.
- Chai, Y.**, Cui, J. Q., Shao, N., Reddy, E. S. P., Rao, V. N. (1999). The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21 WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene*, 18(1), 263.
- Chen, P. L.**, Chen, C. F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, Z. D., Lee, W. H. (1998). The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), 5287-5292.
- 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.
- Chapman, M. S.**, Verma, I. M. (1996). Transcriptional activation by BRCA1. *Nature*, 382(6593), 678.
- Choulet, F.**, Caccamo, M., Wright, J., Alaux, M., Šimková, H., Šafář, J., Leroy, P., Doležel, J., Rogers, J., Eversole, K., Feuillet, C. (2014). The wheat black jack: advances towards sequencing the 21 chromosomes of bread wheat. In *Genomics of Plant Genetic Resources* (pp. 405-438). Springer Netherlands.
- Jarne, P.**, Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, 11(10), 424-429.
- Jeffreys, A. J.**, Brookfield, J. F., Semeonoff, R. (1985). Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, 317(6040), 818-819.
- 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.
- Kazazian Jr, H. H.**, Wong, C., Youssoufian, H., Scott, A. F., Phillips, D. G., Antonarakis, S. E. (1988). Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*, 332(6160), 164.
- Kelkar, Y. D.**, Eckert, K. A., Chiaromonte, F., Makova, K. D. (2011). A matter of life or death: how microsatellites emerge in and vanish from the human genome. *Genome research*, 21(12), 2038-2048.

- Khazina, E.,** Weichenrieder, O. (2009). Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 731-736
- King, M. C.,** Marks, J. H., Mandell, J. B. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302(5645), 643-646.
- 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.
- Kolomietz, E.,** Meyn, M. S., Pandita, A., Squire, J. A. (2002). The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 35(2), 97-112.
- Kolosha, V. O.,** Martin, S. L. (2003). High-affinity, non-sequence-specific RNA binding by the open reading frame 1 (ORF1) protein from long interspersed nuclear element 1 (LINE-1). *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8112-8117.
- Lander, E. S.** (2001). An assembly and annotation of the first draft sequence of the entire human genome that includes a comprehensive analysis of repeated DNA sequences. *Nature*, 409, 860-921.
- Lahti-Domenici, J.,** Rapakko, K., Pääkkönen, K., Allinen, M., Nevanlinna, H., Kujala, M., Huusko, P., Winqvist, R. (2001). Exclusion of large deletions and other rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in Finnish breast and ovarian cancer families. *Cancer genetics and cytogenetics*, 129(2), 120-123.
- Lodish, H.,** Berk, A., Kaiser, Ch. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. (2008). *Molecular cell biology*, 6th edition, pp. 188-189, New York: WH Freeman.
- Mancini-DiNardo, D.,** Judkins, T., Woolstenhulme, N., Burton, C., Schoenberger, J., Ryder, M., Murray, A., Gutin, N., Theisen, A., Holladay, J., Craft, J., Arnell, Ch., Moyes, K., Roa, B. (2014). Design and validation of an oligonucleotide microarray for the detection of genomic rearrangements associated with common hereditary cancer syndromes. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1), 74.
- Marmorstein, L. Y.,** Ouchi, T., Aaronson, S. A. (1998). The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13869-13874.
- Martin, S. L.,** Bushman, F. D. (2001). Nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein from the mouse LINE-1 retrotransposon. *Molecular and cellular biology*, 21(2), 467-475.

- Mathias, S. L.**, Scott, A. F. (1991). Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science*, 254(5039), 1808.
- Matsuoka, S.**, Huang, M., Elledge, S. J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, 282(5395), 1893-1897.
- McClintock, B.** (1956, January). Controlling elements and the gene. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 21, pp. 197-216). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Metcalfe, K.**, Lubinski, J., Lynch, H. T., Ghadirian, P., Foulkes, W. D., Kim-Sing, C., Neuhausen, S., Tung, N., Rosen, B., Gronwald, J., Ainsworth, P., Sweet, K., Eisen, A., Sun, P., Narod, S. A. (2010). Family history of cancer and cancer risks in women with BRCA1 or BRCA2 mutations. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(24), 1874-1878.
- Michel, B.** (2000). Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends in biochemical sciences*, 25(4), 173-178.
- Miki, Y.**, Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, Ch., Bennett, L. M., Ding, W., Bell, R., Rosenthal, J., Hussey, Ch., Tran, T., McClure, M., Frye, Ch., Hattier, T., Phelps, R., Haugen-Strano, A., Katcher, H., Yakumo, K., Gholami, Z., Shaffer, D., Stone, S., Bayer, S., Wray, Ch., Bogden, R., Dayananth, P., Ward, J., Tonin, P., Narod, S., Bristow, P. K., Norris, F. H., Helvering, L., Morrison, P., Rosteck, P., Lai, M., Barrett, J. C., Lewis, C., Neuhausen, S., Cannon-Albright, L., Goldgar, D., Wiseman, R., Kamb, A., Skolnick, M. H. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266(5182), 66-71.
- Miller, C. W.**, Ikezoe, T., Krug, U., Hofmann, W. K., Tavor, S., Vegesna, V., Tsukasaki, K., Takeuchi, S., Koeffler, H. P. (2002). Mutations of the CHK2 gene are found in some osteosarcomas, but are rare in breast, lung, and ovarian tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 33(1), 17-21.
- Mizuta, R.**, LaSalle, J. M., Cheng, H. L., Shinohara, A., Ogawa, H., Copeland, N., Jenkins, N. A., Lalande, M., Alt, F. W. (1997). RAB22 and RAB163/mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 6927-6932.
- Moisan, A. M.**, Fortin, J., Moisan, M. D., Samson, C., Bessette, P., Chiquette, J., Laframboise, R., Lépine, J., Lespérance, B., Pichette, R., Plante, M., Provencher, L., Voyer, P., Goldgar, D., Bridge, P., Simard, J. (2006). No evidence of BRCA1/2 genomic rearrangements in high-risk French-Canadian breast/ovarian cancer families. *Genetic testing*, 10(2), 104-115.

- 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.
- Monteiro, A. N.**, August, A., Hanafusa, H. (1996). Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13595-13599.
- Moran, J. V.**, DeBerardinis, R. J., Kazazian, H. H. (1999). Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science*, 283(5407), 1530-1534.
- Moran, J. V.**, Holmes, S. E., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J., Boeke, J. D., Kazazian, H. H. (1996). High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*, 87(5), 917-927.
- Nadir, E.**, Margalit, H., Gallily, T., Ben-Sasson, S. A. (1996). Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6470-6475.
- Nakamura, Y.**, Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., White, R. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235(4796), 1616-1622.
- Narod, S. A.**, Foulkes, W. D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 665.
- Nevanlinna, H.**, Bartek, J. (2006). The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene*, 25(43), 5912.
- Offit, K.**, Pierce, H., Kirchhoff, T., Kolachana, P., Rapaport, B., Gregersen, P., Johnson, S., Yossepowitch, O., Huang, H., Satagopan, J., Robson, M., Scheuer, L., Nafa, K., Ellis, N. (2003). Frequency of CHEK2\* 1100delC in New York breast cancer cases and controls. *BMC medical genetics*, 4(1), 1.
- Ostertag, E. M.**, Goodier, J. L., Zhang, Y., Kazazian, H. H. (2003). SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *The American Journal of Human Genetics*, 73(6), 1444-1451.
- Ostertag, E. M.**, Kazazian Jr, H. H. (2001). Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annual review of genetics*, 35(1), 501-538.

- Ouchi, T.**, Monteiro, A. N., August, A., Aaronson, S. A., & Hanafusa, H. (1998). BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2302-2306.
- Patel, K. J.**, Veronica, P. C. C., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F. C., Evans, M. J., Colledge, W. H., Friedman, L. S., Ponder, B. A. J., Venkitaraman, A. R. (1998). Involvement of Brca2 in DNA repair. *Molecular cell*, 1(3), 347-357.
- Perrin-Vidoz, L.**, Sinilnikova, O. M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G. M., Mazoyer, S. (2002). The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Human molecular genetics*, 11(23), 2805-2814.
- Petrij-Bosch, A.**, Peelen, T., van Vliet, M., van Eijk, R., Olmer, R., Drüsedau, M., Hogervorst, F. B. L., Hageman, S., Arts, P. J. W., Ligtenberg, M. J. L., Meijers-Heijboer, H., Klijn, J. G. M., Vasen, H. R. A., Cornelisse, C. J., van't Veer, L. J., Bakker, E., van Ommen, G. J. B., Devilee, P. (1997). BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nature genetics*, 17(3), 341.
- Pietschmann, A.**, Mehdipour, P., Atri, M., Hofmann, W., Hosseini-Asl, S. S., Scherneck, S., Mundlos, S., Peters, H. (2005). Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Iranian high risk breast cancer families. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 131(8), 552-558.
- Pisanò, M.**, Mezzolla, V., Galante, M. M., Alemanno, G., Manca, C., Lorusso, V., Malvasi A., Tinelli, A. (2011). A new mutation of BRCA2 gene in an Italian healthy woman with familial breast cancer history. *Familial cancer*, 10(1), 65-71.
- Plevová, P.**, Novotný, J., Petráková, K., Palácová, M., Kalábová, R., Schneiderová, M., Foretová, L. (2009). Hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Klinická onkologie: casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*, 22, S8.
- Preisler-Adams, S.**, Schönbuchner, I., Fiebig, B., Welling, B., Dworniczak, B., Weber, B. H. (2006). Gross rearrangements in BRCA1 but not BRCA2 play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin. *Cancer genetics and cytogenetics*, 168(1), 44-49.

- Puget, N., Gad, S., Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O. M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G. M., Mazoyer, S. (2002).** Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot. *The American Journal of Human Genetics*, 70(4), 858-865.
- Ratajska, M., Brozek, I., Senkus-Konefka, E., Jassem, J., Stepnowska, M., Palomba, G., Pisano, M., Casula, M., Palmieri, G., Borg, A., Limon, J. (2008).** BRCA1 and BRCA2 point mutations and large rearrangements in breast and ovarian cancer families in Northern Poland. *Oncology reports*, 19(1), 263-268.
- Reddy, A., Yuille, M., Sullivan, A., Repellin, C., Bell, A., Tidy, J. A., Evans, D. J., Farrell, P. J., Gusterson, B., Gasco, M., Crook, T. (2002).** Analysis of CHK2 in vulval neoplasia. *British journal of cancer*, 86(5), 756.
- Rosen, E. M., Fan, S., Ma, Y. (2006).** BRCA1 regulation of transcription. *Cancer letters*, 236(2), 175-185.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Sassaman, D. M., Dombroski, B. A., Moran, J. V., Kimberland, M. L., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J., Gabriel, A., Swergold, G. D., Kazazian Jr, H. H. (1997).** Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nature genetics*, 16(1), 37.
- Scott, A. F., Schmeckpeper, B. J., Abdelrazik, M., Comey, C. T., O'Hara, B., Rossiter, J. P., Cooley, T., Heath, P., Smith, K. D., Margolet, L. (1987).** Origin of the human L1 elements: proposed progenitor genes deduced from a consensus DNA sequence. *Genomics*, 1(2), 113-125.
- Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., Bradley, A. (1997).** Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature*, 386(6627), 804.
- Schlesinger, S., Goff, S. P. (2013).** Silencing of proviruses in embryonic cells: efficiency, stability and chromatin modifications. *EMBO reports*, 14(1), 73-79.
- Schlötterer, C., Ritter, R., Harr, B., Brem, G. (1998).** High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology and Evolution*, 15(10), 1269-1274.
- Schmid, C. W. (1996).** Alu: structure, origin, evolution, significance, and function of one-tenth of human DNA. In *Progress in nucleic acid research and molecular biology* (Vol. 53, pp. 283-319). Academic Press.

- Schmid, C. W.** (1998). Does SINE evolution preclude Alu function?. *Nucleic acids research*, 26(20), 4541-4550.
- 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.
- Sluiter, M. D.**, van Rensburg, E. J. (2011). Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. *Breast cancer research and treatment*, 125(2), 325-349.
- Smit, A. F.** (1996). The origin of interspersed repeats in the human genome. *Current opinion in genetics & development*, 6(6), 743-748.
- Smit, A. F.** (1999). Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Current opinion in genetics & development*, 9(6), 657-663.
- Smith, S. A.**, Easton, D. F., Evans, D. G. R., Ponder, B. A. J. (1992). Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. *Nature genetics*, 2(2), 128.
- Smith, T. M.**, Lee, M. K., Szabo, C. I., Jerome, N., McEuen, M., Taylor, M., Hood, L., King, M. C. (1996). Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome research*, 6(11), 1029-1049.
- Staaaf, J.**, Törngren, T., Rambech, E., Johansson, U., Persson, C., Sellberg, G., Tellhed, L., Nilbert, M., Borg, Å. (2008). Detection and precise mapping of germline rearrangements in BRCA1, BRCA2, MSH2, and MLH1 using zoom-in array comparative genomic hybridization (aCGH). *Human mutation*, 29(4), 555-564.
- Stratton, M. R.**, Rahman, N. (2008). The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature genetics*, 40(1), 17.
- Sullivan, A.**, Yuille, M., Repellin, C., Reddy, A., Reelfs, O., Bell, A., Dunne, B., Gusterson, B. A., Osin, P., Farrell, P. J., Yulung, I., Evans, A., Ozcelik, T., Gasco, M., Crook, T. (2002). Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. *Oncogene*, 21(9), 1316.
- Swergold, G. D.** (1990). Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Molecular and cellular biology*, 10(12), 6718-6729.
- Szak, S. T.**, Pickeral, O. K., Makalowski, W., Boguski, M. S., Landsman, D., Boeke, J. D. (2002). Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome biology*, 3(10), research0052-1.



- Šmarda, J.**, Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (2005). Metody molekulární biologie, pp: 13-14, *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.
- Tancredi, M.**, Sensi, E., Cipollini, G., Aretini, P., Lombardi, G., Di Cristofano, C., Presciuttini, S., Bevilacqua, G., Caligo, M. A. (2004). Haplotype analysis of BRCA1 gene reveals a new gene rearrangement: characterization of a 19.9 KBP deletion. *European journal of human genetics*, 12(9), 775.
- Tautz, D.** (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*, 17(16), 6463-6471.
- Teugels, E.**, De Brakeleer, S., Goelen, G., Lissens, W., Sermijn, E., De Grève, J. (2005). De novo Alu element insertions targeted to a sequence common to the BRCA1 and BRCA2 genes. *Human mutation*, 26(3), 284-284.
- Thomassen, M.**, Gerdes, A. M., Cruger, D., Jensen, P. K., Kruse, T. A. (2006). Low frequency of large genomic rearrangements of BRCA1 and BRCA2 in western Denmark. *Cancer Genetics*, 168(2), 168-171.
- Tinelli, A.**, Malvasi, A., Leo, G., Vergara, D., Pisanò, M., Ciccicarese, M., Chiuri, V. E., Lorusso, V. (2010). Hereditary ovarian cancers: from BRCA mutations to clinical management. A modern appraisal. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 339-350.
- Tournier, I.**, Bressac-de Paillerets, B., Sobol, H., Stoppa-Lyonnet, D., Lidereau, R., Barrois, M., Mazoyer, S., Coulet, F., Hardouin, A., Chompret, A., Lortholary, A., Chappuis, P., Bourdon, V., Bonadona, V., Maugard, Ch., Gilbert, B., Nogues, C., Frébourg, T., Tosi, M. (2004). Significant contribution of germline BRCA2 rearrangements in male breast cancer families. *Cancer research*, 64(22), 8143-8147.
- Vanin, E. F.** (1985). Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annual review of genetics*, 19(1), 253-272.
- Vašíčková, P.**, Macháčková, E., Lukešová, M., Damborský, J., Horký, O., Pavlů, 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.
- Venkitaraman, A. R.** (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), 171-182.

- Veronica, P. C. C.,** Koehler, M., Steinlein, C., Schmid, M., Hanakahi, L. A., Van Gool, A. J., West, S. C., Venkitaraman, A. R. (2000). Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes & development, 14*(11), 1400-1406.
- Wallace, M. R.,** Andersen, L. B., Saulino, A. M., Gregory, P. E., Glover, T. W., Collins, F. S. (1991). A denovo Alu insertion results in neurofibromatosis type-1.
- Walsh, T.,** Casadei, S., Coats, K. H., Swisher, E., Stray, S. M., Higgins, J., Roach, K. C., Mandell, J., Lee, M. K., Ciernikova, S., Foretova, L., Soucek, P., King M. C. (2006). Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *Jama, 295*(12), 1379-1388.
- Walsh, T.,** King, M. C. (2007). Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell, 11*(2), 103-105.
- Weitzel, J. N.,** Lagos, V. I., Herzog, J. S., Judkins, T., Hendrickson, B., Ho, J. S., Ricker, Ch. N., Lowstuter, K. J., Blazer, K. R., Tomlinson, G., Scholl, T. (2007). Evidence for common ancestral origin of a recurring BRCA1 genomic rearrangement identified in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 16*(8), 1615-1620.
- Welsh, P. L.,** King, M. C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human molecular genetics, 10*(7), 705-713.
- Wicker, T.,** Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., Schulman, A. H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics, 8*(12), 973-982.
- Williams, R. S.,** Green, R., Glover, J. M. (2001). Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1. *Nature Structural and Molecular Biology, 8*(10), 838.
- Wong, A. K.,** Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V., Bartel, P. L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *Journal of Biological Chemistry, 272*(51), 31941-31944.
- Woodward, A. M.,** Davis, T. A., Silva, A. G. S., Kirk, J. A., Leary, J. A. (2005). Large genomic rearrangements of both BRCA2 and BRCA1 are a feature of the inherited breast/ovarian cancer phenotype in selected families. *Journal of medical genetics, 42*(5), e31-e31.
- Zane, L.,** Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology, 11*(1), 1-16.

**Zhang, H.**, Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Zhang, H., Bi, D., Weber, B. L., El-Deiry, W. S. (1998). BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*, 16(13), 1713

**Zhang, J.**, Fackenthal, J. D., Huo, D., Zheng, Y., Olopade, O. I. (2010). Searching for large genomic rearrangements of the BRCA1 gene in a Nigerian population. *Breast cancer research and treatment*, 124(2), 573-577.

## **Použité internetové zdroje**

Applied Maths. [online] [navštíveno 10. 3. 2017] Dostupné z

<http://www.applied-maths.com/applications/multiplex-ligation-dependent-probe-amplification-mlpa-analysis>

Biogene. [online] [navštíveno 10. 3. 2017]

Dostupné z <http://eshop.biogen.cz/generuler-1-kb-dna-ladder>

Bioline. [online] [navštíveno 10. 3. 2017]

Dostupné z <https://www.bioline.com/uk/hyperladder-100bp.html>

Carolguze [online] [navštíveno 28. 3. 2017]

Dostupné z <http://www.carolguze.com/text/442-1-humangenome.shtml>

LRG databáze [online] [navštíveno 16. 3. 2017]

Dostupné z [ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/lrgex/LRG\\_292.xml](ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/lrgex/LRG_292.xml)

NATURE [online] [navštíveno 10. 2. 2017]

Dostupné z [http://www.nature.com/onc/journal/v19/n53/fig\\_tab/1203968f1.html](http://www.nature.com/onc/journal/v19/n53/fig_tab/1203968f1.html)

NATURE [online] [navštíveno 10. 2. 2017]

Dostupné z [http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n12/fig\\_tab/nrc2251\\_F2.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n12/fig_tab/nrc2251_F2.html)

NCBI [online] [navštíveno 29. 3. 2017] Dostupné z

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(brca1\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[organism\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight%20](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(brca1[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[organism])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight%20)

NCBI [online] [navštíveno 29. 3. 2017] Dostupné z

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(brca2\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[organism\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(brca2[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[organism])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight)

NCBI [online] [navštíveno 29. 3. 2017] Dostupné z

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(chek2\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[organism\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(chek2[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[organism])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight)

ThermoFisher. [online] [navštíveno 10. 3. 2017] Dostupné z

<http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>