

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Nové genetické markery u nádorů štítné žlázy

Diplomová práce

Bc. Ludmila Bujnovská

Školitelka: Mgr. Barbora Bulanová, Ph.D., Endokrinologický ústav Praha

České Budějovice 2024

Bujnovská, L., 2024: Nové genetické markery u nádorů štítné žlázy. [New genetic markers in thyroid tumors. Mgr. Thesis, in Czech.] - 63 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Nádory štítné žlázy patří k nejčastějším nádorovým onemocněním a jejich incidence stále vzrůstá. Pro výběr vhodného postupu léčby je potřeba určit jejich maligní potenciál, což může být předoperačně velmi komplikované. V procesu určení diagnózy stoupá význam molekulárního vyšetření, které pomáhá určit typ nádoru a jeho maligní potenciál. V této práci byly sledovány vzácné genetické mutace v nádorech štítné žlázy v genech *TSHR*, *PIK3CA*, *EIF1AX*, *EZH1*, přítomnost fúzního genu *THADA/IGF2BP3* a hledány nové genetické markery pro klinické využití.

Annotation

Thyroid tumors are among the most common tumors and their incidence is still increasing. In order to determine the proper treatment, it is necessary to assess their malignant potential, which can be very complicated preoperatively. In the process of diagnosis, the importance of molecular examination which helps to classify the tumor and its malignant potential, is increasing. In this work, rare genetic mutations in thyroid tumors in the *TSHR*, *PIK3CA*, *EIF1AX*, *EZH1* genes and the presence of the *THADA/IGF2BP3* fusion gene were investigated and new genetic markers for clinical use were sought.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 12.4.2024

Bc. Ludmila Bujnovská

Poděkování

Tímto bych chtěla vřele poděkovat mé školitelce Mgr. Barboře Bulanové, Ph.D. za veškerý čas, který mi věnovala při zpracování diplomové práce, trpělivost, ochotu, vstřícnost, odborné vedení, cenné rady a stále přítomný optimismus. Mé díky patří také všem zaměstnancům Endokrinologického ústavu z Oddělení molekulární endokrinologie, kteří ke mně přistupovali vždy s úsměvem a ochotou pomoci. Děkuji také své rodině za podporu během celého studia.

1	Úvod.....	1
1.1	Štítná žláza.....	1
1.2	Nádory štítné žlázy.....	1
1.3	Molekulární vyšetření nádorů štítné žlázy	10
1.4	Cílové geny.....	12
2	Cíle práce	16
3	Materiál a metody	17
3.1	Organizace praktické části.....	17
3.2	Izolace genetického materiálu ze zamražené tkáně	20
3.3	PCR.....	21
3.4	Kontrolní agarózová elektroforéza.....	28
3.5	Sekvenace.....	31
3.6	Reverzní transkripce.....	36
3.7	Real-time PCR.....	37
3.8	Vyhodnocení dat.....	41
4	Výsledky	42
4.1	Optimalizace PCR.....	42
4.2	PCR a kontrolní gelová elektroforéza	42
4.3	Sekvenace.....	44
4.4	Vyhodnocení detekovaných mutací	45
4.5	Návrh primerů a hydrolyzační sondy pro <i>THADA</i> fúzní geny	48
4.6	Kontrolní real-time PCR	49
4.7	Real-time PCR.....	50
5	Diskuze.....	52
6	Závěr	58
7	Seznam použité literatury.....	59

Seznam zkratek

<i>ACTB</i>	gen kódující β -aktin
AKT	serin/threoninová proteinkináza
ATC	anaplastic thyroid carcinoma, anaplastický karcinom
ATF4	aktivační transkripční faktor 4, indikátor buněčného stresu
<i>BRAF</i>	gen kódující protein B-Raf
CLT	chronická lymfocytární tyreoidita
Cp	cyklus prahu
CREB	transkripční faktor
EIF1A	eukaryotní translační iniciační faktor A
<i>EIF1AX</i>	gen kódující X-vázaný eukaryotní translační iniciační faktor EIF1A
EIF2 α	eukaryotní iniciační faktor 2
ERK	extracellular signal-regulated kinase, kináza z rodiny MAPK
<i>EZH1</i>	enhancer of zeste 1 polycomb repressive complex 2 subunit, gen kódující podjednotku metylačního komplexu
FND	follicular nodular disease, folikulární nodózní onemocnění štítné žlázy
FTA	follicular thyroid adenoma, folikulární adenom
FTC	follicular thyroid carcinoma, folikulární karcinom
GDP	guanosindifosfát
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
GTP	guanosintrifosfát
<i>HRAS</i>	gen kódující protein z rodiny Ras
HTT	hyalinizing trabecular tumour, hyalinizující trabekulární tumor
IGF1R	tyrozinkinázový receptor pro růstový faktor IGF1
IGF2	růstový faktor 2
IGF2B3	insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3
<i>IGF2BP3</i>	gen kódující protein IGF2B3
<i>KRAS</i>	gen kódující protein z rodiny Ras
MAPK	mitogen-activated protein kinase, kináza z rodiny MAPK
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase, kináza z rodiny MAPK
Met-tRNA	iniciační tRNA s navázaným methyoniem
MTC	medullary thyroid cancer, medulární karcinom

mTOR	mammalian target of rapamycin, kináza
NIFTP	non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary like nuclear features, neinvazivní folikulární tumor s papilárními jadernými znaky
<i>NRAS</i>	gen kódující protein z rodiny Ras
OA	oncocyctic adenoma, onkocytární adenom
OCA	oncocyctic carcinoma, onkocytární karcinom
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase-1, serinová proteáza
PDTC	poorly differentiated thyroid carcinoma, nízce diferencovaný karcinom
PI3K	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase, lipidová kináza
<i>PIK3CA</i>	gen kódující katalitickou podjednotku PI3K
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PTC	papillary thyroid carcinoma, papilární karcinom
PTEN	lipidová fosfatáza
Raf	serin/threoninová kináza
RAI	léčba radiojódem
Ras	protein z rodiny Ras, malá GTPáza
<i>RAS</i>	genová rodina RAS
<i>RET</i>	gen kódující tyrozinkinázový receptor
SOS	son of sevenless, protein
<i>TERT</i>	telomerase reverse transcriptase, gen kódující katalitickou podjednotku telomerázy
<i>THADA</i>	thyroid adenoma associated, gen kódující regulační protein tRNA (32-2'-O)-methyltransferázy
TSH	Thyroid stimulating hormone, tyreotropin
<i>TSHR</i>	thyroid stimulating hormone receptor, gen kódující receptor pro hormon stimulující štítnou žlázu
T-UMP	tumours of uncertain malignant potential, tumor nejistého maligního potenciálu
WHO	World Health Organization, světová zdravotnická organizace

1 Úvod

1.1 Štítná žláza

Štítná žláza je orgán produkující hormony, který má zásadní význam v endokrinním systému organismu. Jedná se o dvoulaločnatý útvar umístěný na přední straně krku, symetricky kolem průdušnice. Je obalen dvěma fibrózními pouzdry a dosahuje hmotnosti 20-60 g. Tkáň obou laloků je členitým vnitřním pouzdem rozdělena na množství menších lalůčků, které jsou složeny z mikroskopických folikulů. Povrch těchto folikulů tvoří vrstva folikulárních epitelálních buněk, které produkují prekurzory hormonů tyroxinu a trijodtyroninu a sekrečními granuly je transportují do viskózního jádra folikulu, tzv. koloidu. Váčky jsou spojené pojivovou tkání protkanou kapilárními a lymfatickými cévami. Mezi váčky se jednotlivě nebo v malých shlucích nacházejí také parafolikulární buňky neboli C-buňky, jejichž hlavní funkcí je produkce kalcitoninu (Benvenega *et al.*, 2018).

1.1.1 Funkce štítné žlázy

Štítná žláza má významnou roli v ovlivňování celkového metabolismu organismu. Účastní se dějů jako jsou termoregulace, rychlost a síla srdečního tepu, rychlost dýchání, aktivace centrálního nervového systému, stimulace periferních nervů a hladké svaloviny, metabolismus cukrů a tuků, růst a vývoj u dětí, růst kostí a jejich remodelace. Zvýšenou produkcí hormonů štítné žlázy dochází zpravidla ke zvýšené aktivitě cílových orgánů. Poruchou funkce štítné žlázy mohou vzniknout dva stavy: hyperfunkce, kdy je hormonů štítné žlázy tvořeno moc, a hypofunkce, kdy jich je tvořen naopak nedostatek. Oba tyto stavy mohou vést k těžkým poruchám metabolismu a mají různé projevy. Funkce štítné žlázy je regulována hypofýzou mechanismem negativní zpětné vazby (Benvenega *et al.*, 2018).

1.2 Nádory štítné žlázy

Nádory štítné žlázy jsou 7. nejčastější nádorové onemocnění ve světě s věkově standardizovanou incidencí 9,1 na 100 000 obyvatel za rok. Tomu odpovídá i česká populace, kde je incidence nádorových onemocnění štítné žlázy 9, i když se zde nachází až na 12. místě mezi dalšími typy nádorových onemocnění. Věkově standardizovaná smrtnost na 100 000 obyvatel na rok je ve světě 0,44 a v Česku 0,25. Nádorová onemocnění štítné žlázy jsou téměř

3x častější u žen než u mužů. Nejčastěji se objevují u pacientů nad 50 let, můžou se ale vyskytnout i dříve, a to i v dětského věku. (Ferlay *et al.*, 2024). Prognóza je ovlivněna věkem a pohlavím pacienta, typem, velikostí a stádiem nádoru, léčebným postupem a přítomností metastáz.

Nádory štítné žlázy se podle klasifikace světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) dělí podle dvou kritérií:

- podle typu buněk, ze kterých je nádor odvozený – nádory odvozené z folikulárních epiteliálních buněk štítné žlázy, nádory odvozené z parafolikulárních buněk štítné žlázy a nádory smíšené (odvozené částečně z buněk folikulárních a částečně z parafolikulárních);
- podle maligního potenciálu – nádory benigní, nízkorizikové a maligní (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2022).

Kromě nádorových onemocnění mohou uzly spolu s dalšími patologickými změnami ve štítné žláze vznikat také při nenádorových onemocněních, jako je chronická lymfocytární tyreoiditida nebo toxická struma. Rozdělení nejčastějších nádorových onemocnění a patologických změn ve štítné žláze je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1 - Rozdělení nádorových onemocnění a patologických změn štítné žlázy

	Maligní potenciál	Typ nádoru/onemocnění
Změny ve štítné žláze		chronická lymfocytární tyreoiditida, toxická struma
Novotvary odvozené z folikulárních epiteliálních buněk štítné žlázy	Benigní	folikulární nodózní onemocnění štítné žlázy, folikulární adenom, folikulární adenom s papilární stavbou, onkocytární adenom
	Nízkorizikové	neinvazivní folikulární tumor s papilárními jadernými znaky, tumor nejistého maligního potenciálu, hyalinizující trabekulární tumor
	Maligní	folikulární karcinom, papilární karcinom, onkocytární karcinom, anaplastický karcinom, folikulární ne-anaplastický karcinom vysokého stupně (podtyp nízce diferencovaný karcinom)
Novotvary odvozené z parafolikulárních buněk	Maligní	medulární karcinom

1.2.1 Změny ve štítné žláze

Nejčastějším nenádorovým onemocněním štítné žlázy je **chronická lymfocytární tyreoiditida (CLT)**. CLT je autoimunitní onemocnění, při kterém dochází autoimunitním mechanismem k zánětu a poškození tkáně štítné žlázy. V důsledku poškození dochází k snížení produkce hormonů štítné žlázy – hypofunkci, což ovlivňuje zásadní metabolické děje. Mezi hlavní příznaky patří porucha termoregulace, únava, svalová slabost, suchá kůže a nabírání váhy, onemocnění ale může být také bezpříznakové. K rizikovým faktorům patří genetická predispozice, ženské pohlaví, vyšší věk a expozice ionizujícímu záření. Nejběžnější způsob léčby je podávání syntetického hormonu štítné žlázy (Mincer and Jialal, 2023).

Toxická struma je naopak charakterizována hyperfunkcí štítné žlázy. Jedná se difúzní postižení nebo o jeden či více uzlů ve štítné žláze, ve kterých dochází k nadprodukcí hormonů štítné žlázy. Příčinou může být porucha regulace funkce štítné žlázy, autoimunitní, chemické či mechanické poškození štítné žlázy, Gravesova-Basedowova choroba nebo zvýšený příjem jódu. Štítná žláza bývá zvětšená a může působit tlak na dýchací cesty, k dalším příznakům patří neklid, tachykardie, známky srdečního selhání, svalové křeče, třes prstů, pocení či redukce hmotnosti. Léčba spočívá v tyreoidektomii nebo léčbě radiojódem, případně pomocí léčiv

blokující aktivitu štítné žlázy a blokátorů β -adrenoceptorů (Novodvorsky and Allahabadia, 2021).

1.2.2 Novotvary odvozené z folikulárních buněk štítné žlázy

Novotvary odvozené z folikulárních epiteliálních buněk jsou nejčastějšími typy nádorů štítné žlázy. Ve většině případů bývají bezpříznakové nebo s příznaky způsobenými zvětšením štítné žlázy – bolest či obtíže při polykání, dechové obtíže, chrapot. Vyznačují se folikulární stavbou buněk, další charakteristiky jsou specifické pro konkrétní typ nádoru.

1.2.2.1 Benigní novotvary odvozené z folikulárních buněk

Benigní novotvary odvozené z folikulárních buněk jsou neinvazivní novotvary s dobrou prognózou, bývají dobře ohraničené a netvoří metastázy ani nedochází k recidivám.

Folikulární nodózní onemocnění štítné žlázy (follicular nodular disease, FND) je benigní proliferativní onemocnění typické mnohočetnými uzly s různou velikostí a stavbou s klonálním i neklonálním charakterem, bez přítomnosti jaderných rysů papilárního karcinomu. Uzly mohou mít různý stupeň zapouzdření, cystické změny, fibrózu, kalcifikaci nebo známky krvácení. Folikuly štítné žlázy se mohou také spojovat a vytvářet velké cysty vyplněné koloidem. K rizikovým faktorům patří ženské pohlaví, vyšší věk, oblasti s nedostatkem jódu, kouření, genetická predispozice (International Agency for Research on Cancer, 2022).

Folikulární adenom (follicular thyroid adenoma, FTA) se vyznačuje zapouzdřenými oválnými uzly s pevnou homogenní strukturou klonálního charakteru bez jaderných rysů papilárního karcinomu. Může u nich být pozorována hyalinizace, kalcifikace, fibróza či osifikace, případně sekundární krvácení po biopsii. FTA je těžko odlišitelný od folikulárního karcinomu, hlavní rozdíly jsou v histologickém obrazu pouzdra, rozdíly jsou pozorovatelné ale i v laboratorním či molekulárním vyšetření (Kelana, Susilo and Sahudi, 2022, Borowczyk *et al.*, 2019). Pokud nelze typ jednoznačně určit, klasifikuje se jako tumor nejistého maligního potenciálu. Rizikovými faktory jsou mimo jiné expozice radioaktivnímu záření a nedostatek jódu. FTA byly pozorovány také u dětských pacientů (International Agency for Research on Cancer, 2022).

Pro **onkocytární adenom** (oncocytic adenoma, OA) jsou typické kulové nebo oválné zapouzdřené uzly s homogenní strukturou a s $>75\%$ podílem onkocytárních buněk, nazývaných ve štítné žláze též Hürthleho buňky (buňky s eozinofilní cytoplasmou a bohatou granulací, s jádry kulatého tvaru a výraznými jádérky). V uzlech může být přítomna hyalinizace, kalcifikace, osifikace nebo sekundární krvácení po biopsii tenkou jehlou. Od onkocytárního

karcinomu se OA liší histologickou podobou pouzdra. Pro OA jsou charakteristické mutace mitochondriálního genomu a zvýšený počet mitochondrií (Gasparre *et al.*, 2007, International Agency for Research on Cancer, 2022).

1.2.2.2 Nízkorizikové novotvary odvozené z folikulárních buněk

Neinvazivní folikulární tumor s papilárními jadernými znaky (non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary like nuclear features, NIFTP) je dobře ohraničený nádor neinvazivního charakteru, u kterého lze pozorovat jaderné papilární znaky typické pro papilární karcinom (charakterizované tvarem jádra a vzhledem chromatinu). Uzel bývá pevný, kulovitý nebo oválný tvaru, může mít vazivové pouzdro, může být také přítomno sekundární krvácení. NIFTP se může vyskytovat také u dětí (Wang *et al.*, 2020). Nejčastější léčbou je lobektomie, terapie radioaktivním jódem většinou není nutná. (International Agency for Research on Cancer, 2022).

Novotvary, které nelze jednoznačně zařadit jako invazivní jsou klasifikovány jako **tumory nejistého maligního potenciálu** (tumours of uncertain malignant potential, T-UMP). Podobně jako u FTA, NIFTP nebo folikulárního karcinomu se jedná o diferencované novotvary s pevnými uzly a většinou opouzdřené. Nádory mohou mít neobvyklé rysy, výčnělky v pouzdře, neúplné pouzdro či nepravidelný obrys. Diagnostika probíhá na základě sporného invazivního potenciálu a k upřesnění se používá molekulární vyšetření. U opouzdřených T-UMP je riziko metastáz a recidivy nízké (International Agency for Research on Cancer, 2022).

Hyalinizující trabekulární tumor (hyalinizing trabecular tumour, HTT) je typ nízkorizikového nádorového onemocnění, které je typické protáhlými trámčovými buňkami, tzv. trabekulami. Trabekuly se vyznačují především hyalinní cytoplasmou (Nielsen *et al.*, 2023). Dále mohou vykazovat výrazné jaderné znaky jako jsou rýhy, vakuoly a nepravidelná membrána. Uzly bývají pevné až měkké, dobře ohraničené, případně opouzdřené, kulatého nebo oválného tvaru s laloky (International Agency for Research on Cancer, 2022).

1.2.2.3 Maligní novotvary odvozené z folikulárních buněk

Maligní folikulární nádorová onemocnění jsou charakteristická svou invazivitou a šířením do dalších částí těla. Rozlišují se 2 typy invaze – kapsulární a vaskulární. Při kapsulárním typu dochází k invazi skrz pouzdro nádoru a dochází tak k šíření nádoru do nejbližší tkáně a spádových lymfatických uzlin. Vaskulárním typem dochází k invazi skrz cévní systém a nádorové buňky se mohou šířit do vzdálených částí těla. Vzdálené metastázy se tvoří nejčastěji v plicích, kostech a játrech. Maligní novotvary se oproti benigním vyskytují méně často. Dobře

diferencované karcinomy (PTC, FTC) dobře odpovídají na léčbu, níže diferencované se vyznačují rychlým růstem a odpověď na léčbu mívají horší (International Agency for Research on Cancer, 2022).

Papilární karcinom (papillary thyroid carcinoma, PTC) je vůbec nejčastější endokrinní maligní onemocnění u dospělých i dětí, jehož incidence v posledních letech stoupá (Kitahara and Sosa, 2020). Jedná se o dobře diferencované nádorové onemocnění s invazivním charakterem, typické papilární strukturou (fibrovaskulární nebo fibrózní struktury různého tvaru většinou s jednou vrstvou nádorových buněk a jádrem tvořeným pojivovou tkání) a výraznými jadernými papilárními znaky (nepravidelný obrys, pseudoinkluze – invaginace membrány, jaderné rýhy). Uzel mívá nejasné okraje, může mít pouzdro a obsahovat cysty. Uzel může také jevit známky kalcifikace, nekrózy ale nejsou typické. Při nálezů mohou být přítomny metastázy v lymfatických uzlinách, plicích nebo kostech. Mezi rizikové faktory patří obezita – až u 16 % PTC, expozice radioaktivnímu záření v dětství, velké množství jódu v potravě a rodinná anamnéza (Kitahara and Sosa, 2020, International Agency for Research on Cancer, 2022).

Mezi maligní nádorová onemocnění štítné žlázy patří dále **folikulární karcinom** (follicular thyroid carcinoma, FTC). Jedná se o dobře diferencovaný nádor s invazivním růstem bez jaderných papilárních znaků. Uzel bývá většinou oválný, s pevnou homogenní strukturou, okraje můžou být laločnaté, může být přítomno pouzdro. V novotvaru může být pozorována také fibróza, kalcifikace nebo přeměna tkáně na tukovou, nekróza se nevyskytuje. Až 15 % pacientů má metastázy v lymfatických uzlinách nebo vzdálené metastázy již při diagnóze (D'Avanzo *et al.*, 2004). Rizikovými faktory je nedostatek jódu v potravě a genetická predispozice. U dětí se vyskytuje jen vzácně (International Agency for Research on Cancer, 2022).

Onkocytární karcinom (oncocytic carcinoma, OCA) je méně časté maligní onemocnění vyznačující se vysokým zastoupením onkocytárních buněk (>75 %) a invazivním charakterem, bez přítomnosti jaderných znaků papilárního karcinomu. Uzly se vyskytují většinou osamoceně, bývají kulové až oválné, obvykle opouzdržené. Pouzdro může vykazovat známky kalcifikace, okraje uzlu můžou být nejasné, nekrózy se typicky nevyskytují. Buňky obsahují množství abnormálních mitochondrií. Metastázy při nálezů OCA bývají u 16-27 % případů. U dětí se vyskytuje jen vzácně (International Agency for Research on Cancer, 2022).

Nízce diferencovaný karcinom (poorly differentiated thyroid carcinoma, PDTC) je klasifikován jako podtyp folikulárního ne-anaplastického karcinomu vysokého stupně. Patří mezi vzácné, ale široce invazivní maligní nádory, které nesou určité typické znaky – velký počet malých mitotických buněk, nekrózy, stočená jádra. V porovnání s jinými typy nádorů bývají velké – dosahují průměrné velikosti 40-60 mm v průměru. Nádor postrádá cytologickou a architektonickou diferenciaci. K jeho dalším charakteristikám patří rychlý růst, nezřetelné okraje a pevná struktura uzlu, může být také přítomno pouzdro a metastázy v lymfatických uzlinách. Vzdálené metastázy bývají při diagnóze nalezeny u 20-25 % pacientů. Rozvíjí se z dobře diferencovaných forem folikulárních karcinomů (převážně FTC a opouzdřený PTC) a může přejít do anaplastického karcinomu. Na léčbu reaguje špatně, průměrné přežití je 5 let. K rizikovým faktorům patří nedostatek jódu v potravě (International Agency for Research on Cancer, 2022, Xu and Ghossein, 2020).

Anaplastický karcinom (anaplastic thyroid carcinoma, ATC) je označení pro vysoce agresivní novotvar, který je charakteristický nediferencovanými, vysoce pleomorfními buňkami a velkým počtem mitotických buněk. Jádra buněk bývají zvětšená, s hrubým chromatinem a perinukleárním projasněním, mohou být přítomné pseudoinkluze. Novotvar často obsahuje nekrózy a známky krváčení. Nádor dosahuje velikosti až 150 mm, invaduje do okolní tkáně a lymfatických uzlin a tvoří vzdálené metastázy. Vzniká de novo nebo z více diferencovaných karcinomů (nízce diferencovaný, PTC, FTC). K rizikovým faktorům patří expozice radioaktivnímu záření, a nedostatek jódu v potravě. Jedná se o vzácně se vyskytující velmi agresivní nádory, které reagují na léčbu velmi špatně. Prognóza je ovlivněna histologickým typem, mírou invaze a přítomnosti patogenních mutací (Luo *et al.*, 2020, International Agency for Research on Cancer, 2022).

1.2.3 Neoplázie derivované z parafolikulárních buněk

Zástupcem neoplázií derivovaných z parafolikulárních buněk je **medulární karcinom (medullary thyroid carcinoma, MTC)**. Jedná se o méně častý maligní typ nádorů štítné žlázy, který tvoří 1-2 % maligních nádorů (Barletta, Nosé and Sadow, 2021). S MTC je spojená zvýšená míra exprese kalcitoninu a karcinoembryonálního antigenu, často bývá také snížena míra exprese tyreoglobulinu. Oproti nádorům odvozených z folikulárních buněk vede nadprodukce kalcitoninu k příznakům onemocnění, jako jsou zarudnutí, průjem či ztráta hmotnosti. Uzly se vyznačují velkou variabilitou ve velikosti a morfologii, může být přítomna kalcifikace, mívá nepravidelné okraje, většinou bez pouzdra. Nekrózy neobsahuje. Někdy

vykazuje pseudopapilární strukturu, což komplikuje diagnózu. Jádra buněk se vyznačují různými velikostmi a nápadnými jádérky, mohou obsahovat pseudoinkluze. Metastázy v uzlinách jsou přítomny u 50-70 % pacientů, vzdálené u 10-15 %. Ke známým rizikovým faktorům patří genetická predispozice – zárodečné mutace v *RET* genu (International Agency for Research on Cancer, 2022).

1.2.4 Diagnostika nádorů štítné žlázy

Diagnostika nádorů štítné žlázy je složitý proces, který se často překrývá s léčebnými postupy. Podle evropské asociace štítné žlázy by v první řadě mělo být provedeno fyzikální vyšetření krku, biochemické vyšetření hormonu TSH (thyroid-stimulating hormone) a ultrazvuk krku, které většinou ukážou funkci štítné žlázy, tvar, velikost a konzistenci novotvaru, pravidelnost okrajů, případně přítomnost pouzdra a jiných výrazných struktur. Na základě výsledků z těchto vyšetření a s přihlédnutím k anamnéze pacienta je vyhodnoceno očekávané riziko malignity a při podezření na malignitu je indikována biopsie tenkou jehlou, která umožní doplnit cytologické vyšetření. Podle cytologického vyšetření se určí kategorie novotvaru podle Bethesda Systému pro reportování tyreoidálních cytopatologií, na základě kterého je určen další postup (Ali *et al.*, 2023). Pro nejvyšší kategorie (Bethesda V a VI) je doporučeno indikovat totální (příp. částečnou) tyreoidektomii, u nižších kategorií s nejasnou cytologií (Bethesda III a IV) je vhodné diagnózu doplnit molekulárním vyšetřením, pacienty případně indikovat k částečné tyreoidektomii nebo novotvary aktivně sonograficky sledovat. Z odoperované tkáně lze provést histologické vyšetření nádorové tkáně, které jsou pro přesnou diagnózu novotvaru nejvýznamnější. Diagnózu může také usnadnit molekulární vyšetření nádorové tkáně (Durante *et al.*, 2023).

1.2.5 Léčba nádorů štítné žlázy

Nádory štítné žlázy lze léčit několika způsoby – chirurgické odstranění nádoru, léčba radiojódem (RAI), hormonální léčba, ionizační záření, chemoterapie nebo cílená terapie. Přesný postup léčby nádorů štítné žlázy se volí podle typu nádoru, velikosti, jeho míry malignity a stádia, většinou se pro dosažení co nejlepšího výsledku kombinuje více způsobů. (Haugen *et al.*, 2016).

1.2.5.1 Chirurgické odstranění nádoru

Chirurgické odstranění novotvaru patří k nejčastějšímu typu léčby. Rozlišuje se odstranění pouze novotvaru s přilehlou tkání, laloku štítné žlázy obsahující novotvar (lobektomie), odstranění téměř celé štítné žlázy (near-total thyroidectomy) a odstranění celé štítné žlázy – totální tyreoidektomie. Totální tyreoidektomie včetně odebrání spádových lymfatických uzlin se volí u agresivních maligních nádorů, kde je velké riziko recidivy onemocnění, např. u anaplastického karcinomu nebo medulárního karcinomu (Haugen *et al.*, 2016). Chirurgické odstranění může být indikováno při symptomatickém onemocnění štítné žlázy, vysokých hladinách kalcitoninu, neurčité cytologii v kategorii III a IV systému Bethesda nebo při zařazení do kategorie V a VI systému Bethesda (Durante *et al.*, 2023).

1.2.5.2 RAI – radiojód

Terapie radiojódem spočívá v podání radioaktivního izotopu jódu pacientovi. Radiojód je podáván perorálně jako tekutina nebo kapsle, případně infuzí. Štítná žláza spotřebovává nejvíce jódu, proto je RAI specificky účinný na rostoucí tkáň štítné žlázy, jiné tkáně nepoškozuje. Lze ji využít pro některé benigní hyperfunkční uzly jako náhradu operace (Durante *et al.*, 2023).

1.2.5.3 Hormonální léčba

Hormonální léčba cílí na zablokování tvorby hormonu TSH, který stimuluje aktivitu a růst štítné žlázy. Hormonální léčba je potřebná také pro pacienty po tyreoidektomii jako náhrada za hormony tvořené štítnou žlázou. Hormony štítné žlázy ovlivňují mnoho zásadních funkcí, proto je potřeba hormony uměle doplňovat. U benigních onemocnění bez změny funkce štítné žlázy není potřebná (PDQ® Adult Treatment Editorial Board, 2023).

1.2.5.4 Radioterapie

Radioterapie spočívá v ozáření postižené oblasti ionizačním zářením s cílem eliminovat nádorové buňky. Používá se samostatně nebo v kombinaci s chirurgickou terapií. Pooperační radioterapie se volí pro odstranění případných neodoperovaných nádorových buněk (PDQ® Adult Treatment Editorial Board, 2023).

1.2.5.5 Chemoterapie

Chemoterapie využívá chemické látky ničící rychle se dělící buňky. Lze ji využít u rychle rostoucích nádorů, kde se buňky dělí rychleji než v ostatních zdravých tkáních. Chemoterapie cílí na všechny dělící se buňky, poškozuje tedy i další tkáně, především kostní dřev a střevní epitel (PDQ® Adult Treatment Editorial Board, 2023).

1.2.5.6 Cílená terapie

Cílená terapie využívá medikamenty specificky cílící na nádorové buňky. V klinické praxi se využívají inhibitory tyrosin kinázy a inhibitory proteinkináz. Oba zmíněné enzymy jsou důležité v procesu růstu a dělení buněk a jsou proto vhodným cílem protinádorové terapie (PDQ® Adult Treatment Editorial Board, 2023).

1.3 Molekulární vyšetření nádorů štítné žlázy

Nádory často vznikají následkem nádorové transformace buněk způsobené akumulací genetických změn. Některé genetické změny či jejich nepřítomnost mohou vypovídat o typu nádoru nebo jeho maligním potenciálu, proto může být užitečné znát genetické pozadí vyšetřovaného nádoru. K zjištění přítomných genetických mutací slouží molekulární vyšetření. Molekulární vyšetření nádorů štítné žlázy je v současnosti používáno jako pomocné vyšetření upřesňující diagnózu. Pomáhá rozlišit benigní novotvary od maligních a umožňuje tak indikaci k tyreoidektomii jen tam, kde je to skutečně žádoucí (Fillon, 2021).

Nejčastěji mutovanými geny v nádorech štítné žlázy jsou geny kódující proteiny ze signalizačních drah: mitogenem aktivované protein kinázové (MAPK) nebo PTEN/PI3K/AKT. Jedná se o signalizační dráhy regulující buněčný cyklus, růst a diferenciaci a jejich nesprávné fungování může vést ke karcinogenezi.

1.3.1 MAPK dráha

MAPK dráha je hlavní signalizační dráha v buňce regulující buněčný růst, genovou expresi, diferenciaci a programovanou buněčnou smrt. Nositeli signálu jsou kaskádovitě uspořádané serin/threoninové kinázy. Dráha má celou řadu extracelulárních spouštěčů, ke kterým patří růstový faktor, ligandy receptorů spřažených s G proteiny, cytokiny či osmotický stres (Cargnello and Roux, 2011).

Na začátku MAPK kaskády stojí nejčastěji tyrozinkinázový receptor. Po vazbě ligandu dochází k jeho dimerizaci a autofosforylaci cytoplasmatických domén, což umožní vazbu proteinu GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2). S GRB2 následně asociuje protein SOS (son of sevenless), který výměnou guanosindifosfátu (GDP) za guanosintrifosfát (GTP) aktivuje malou GTPázu z rodiny Ras (HRas, KRas, NRas). Na aktivní Ras se poté váže serin/threoninová kináza z rodiny Raf (A-Raf, B-Raf, Raf-1) a spouští kinázovou kaskádu. Raf

fosforylací aktivuje kinázy MEK1 a/nebo MEK2 (mitogen-activated protein kinase kinase) a ty poté fosforylují kinázy ERK1 a/nebo ERK2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2). Pomocí nich se signál přenáší dál na řadu cílových transkripčních faktorů a proteinkináz (Cargnello and Roux, 2011)

Mutace v příslušných genech způsobují, že proteiny MAPK dráhy jsou aktivní i bez přítomnosti extracelulárního signálu, což vede k nekontrolované proliferaci. Nejčastějšími mutovanými geny v signalizační kaskádě MEK/ERK jsou *RAS* (*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*) a *BRAF*.

1.3.2 PTEN/PI3K/AKT dráha

Dráha PTEN/PI3K/AKT je signalizační dráha, která má roli v regulaci buněčného cyklu, glukózového metabolismu a pohyblivosti buněk. Signál vzniká aktivací tyrosin kinázového receptoru, jenž po dimerizaci aktivuje katalytickou podjednotku PIK3CA kinázy PI3K (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase). PI3K následně fosforyluje membránový fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP₃), který zprostředkovává fosforylací serin/threoninové proteinkinázy AKT navázané k membráně přes PIP₃. Tohoto děje se účastní enzym serinová proteáza PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1). Další signalizační kaskádou (mj. přes transkripční faktor CREB nebo kinázu mTOR – mammalian target of rapamycin) dráha vede k vyšší míře syntézy proteinů, buněčnému růstu, inhibici apoptózy a k proliferaci (Jiang *et al.*, 2020). Hlavním inhibítorem dráhy je tumor supresorový protein PTEN, lipidová fosfatáza, která blokuje aktivitu PI3K a zároveň defosforyluje PIP₃ na PIP₂ a tím omezuje vazbu AKT na membránu a aktivitu celé signalizační dráhy (Cantley and Neel, 1999).

Nejčastěji mutovaným genem kódujícím proteiny dráhy PTEN/PI3K/AKT je *PTEN* a *PIK3CA*.

1.3.3 Vyšetřované geny u nádorů štítné žlázy

Při molekulárním vyšetření nádorů štítné žlázy se hlavně vyšetřují bodové mutace genů a genové přestavby. Mezi nejčastěji vyšetřované geny patří *RET*, *BRAF*, *RAS* (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*), *TERT*, *PIK3CA*, *PTEN*, *NTRK*, *ALK*.

K nejvýznamnějším genetickým markerům patří mutace *BRAF* V600E, mutace v promotoru *TERT* genu a *RET* mutace, které mají vysokou prediktivní hodnotu pro malignitu (Censi *et al.*, 2019; Ciampi and Nikiforov, 2005; Elisei *et al.*, 2008, Tali *et al.*, 2023). Nález těchto mutací u novotvarů s nejasnou cytologií bývá interpretován jako indikace k chirurgickému zákroku.

Protein TERT (Telomerase reverse transcriptase) je katalytická podjednotka enzymu telomeráza, která je nezbytná pro replikaci chromosomálních konců¹ (Bateman *et al.*, 2023). Při nadměrné aktivitě telomerázy dochází k neomezenému dělení buněk bez poškození chromosomů, což je důležité při embryonálním vývoji, může ale také vést ke vznikům nádorů. Mutace v promotoru *TERT* genu bývají spojené s vyšší agresivitou, pokročilejším stádiem a přítomností vzdálených metastáz. Mutace v genu *RET* kódující tyrozinkinázový receptor vedou k aktivaci MAPK a PTEN/PI3K/AKT dráhy. Mohou být bodové, typické pro MTC nebo i genové přestavby vyskytující se hlavně u PTC (Pacini *et al.*, 2000). Mutace v genech *RAS* se vyskytují jak v maligních, tak i benigních uzlech štítné žlázy (Lupo *et al.*, 2020).

1.4 Cílové geny

Tato práce byla zaměřena na vzácnější mutace v genech *TSHR*, *PIK3CA*, *EIF1AX*, *EZH1* a *THADA/IGF2BP3*, které jsou lépe charakterizovány v následujících odstavcích.

1.4.1 *TSHR*

Gen *TSHR* kóduje receptor pro hormon stimulujiící štítnou žlázu (thyroid stimulating hormone receptor, TSHR). Jedná se o transmembránový glykoproteinový receptor spřažený s G proteinem exprimovaný buňkami štítné žlázy, který má schopnost vázat TSH a tyreostimulin – hormony produkované adenohypofýzou. Funkční protein má délku 764 aminokyselin, je post-translačně glykosilován na 6 místech a má 2 disulfidické můstky² (Bateman *et al.*, 2023). Gen *TSHR* se nachází na chromosomu 14q a skládá se z 10 exonů. Exony 1-9 kódují extracelulární doménu receptoru, kde dochází k vazbě ligandu, zatímco 10., nejdelší exon nese sekvenci pro 7 transmembránových domén a intracelulární C-terminální doménu, s kterou asociuje G-protein (Gene [Internet], 2004).

Mechanismus tumorigeneze: Po navázání ligandu na TSHR dochází k uvolnění α -podjednotky G-proteinu, což vede k aktivaci adenylát cyklázy. Tím se spouští signální dráha vedoucí k expresi genů umožňující růst buněk štítné žlázy, diferenciaci, syntézu a sekreci hormonů. Aktivační mutace v *TSHR* může způsobit permanentní aktivaci této dráhy (Chantreau *et al.*, 2015) a následnou proliferaci.

¹ <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O14746/entry>

² <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P16473/entry>

1.4.2 *PIK3CA*

PIK3CA je gen kódující α katalytickou podjednotku (p110 α) fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kinázy PI3K – lipidové kinázy, která má schopnost fosforylovat 3-hydroxylovou skupinu fosfatidylinositolu (fosfolipid s rolí v buněčné signalizaci) za vzniku PIP3. Protein je součástí signalizační dráhy PTEN/P3K/AKT a je aktivován tyrozinkinázovým receptorem. *PIK3CA* je cytosolický protein a má délku 1068 aminokyselin³ (Bateman *et al.*, 2023). Gen *PIK3CA* se nachází na chromosomu 3q a skládá se z 21 exonů (Gene [Internet], 2004).

Mechanismus tumorigeneze: Aktivační mutace v *PIK3CA* mohou způsobit permanentní aktivaci dráhy PTEN/P3K/AKT (García-Rostán *et al.*, 2005).

1.4.3 *EIF1AX*

Gen *EIF1AX* se nachází na chromosomu Xp a skládá se ze 7 exonů (Gene [Internet], 2004). Kóduje X-vázaný eukaryotní translační iniciační faktor A (EIF1A), který hraje důležitou roli v translaci proteinů. EIF1A má zásadní roli pro vznik iniciačního komplexu – vazba ternárního komplexu (EIF2 α -GTP-Met-tRNA; EIF2 α – eukaryotní iniciační faktor 2, Met-tRNA – iniciační tRNA s navázaným methyoninem) na 40S ribozomální podjednotku (Krishnamoorthy *et al.*, 2019). Protein má délku 144 aminokyselin, jedná se o cytoplasmatický protein⁴ (Bateman *et al.*, 2023).

Hlavní mechanismus tumorigeneze: Mechanismus tumorigeneze se může lišit pro jednotlivé mutace, všechny dopady zatím nejsou plně objasněny. Nejčastější jsou mutace na N konci proteinu (v této práci G8E) a sestřihová mutace (A113_splice), které mají podobný účinek, přičemž sestřihová mutace ve větší míře. Mutované varianty stabilizují preiniciační komplex translace, což vede k produkci indikátoru buněčného stresu ATF4 (aktivační transkripční faktor 4). Tento indikátor následně brání fosforylaci EIF2 α , ten pak zůstává vázán na GDP a nemůže se účastnit vzniku ternárního komplexu. Následkem toho dochází místo sestavení iniciačního komplexu na dalším startovacím AUG kodónu k opětovné inicializaci translace ze stejného AUG kodónu na konstruktu ATF4, čímž je docíleno vyšší míry proteosyntézy ATF4. ATF4 poté negativní zpětnou vazbou docílí masivní defosforylace EIF2 α a tím dojde ke globálnímu zvýšení proteosyntézy, což vede k tumorigenezi. Kromě toho mutovaný EIF1A stabilizuje

³ <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P42336/entry>

⁴ <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P47813/entry>

transkripční faktor c-myc, což vede k indukci dráhy kinázy mTOR nezávisle na PI3K dráze (Krishnamoorthy *et al.*, 2019).

1.4.4 *EZH1*

Protein EZH1 (enhancer of zeste 1 polycomb repressive complex 2 subunit) je histonová N-metyltransferáza (Histone-lysine N-methyltransferase), podjednotka metylačního komplexu, který ovlivňuje vazbu DNA na histony a tím míru transkripce daného úseku DNA. Funkční protein obsahuje 747 aminokyselin a je lokalizován v jádře (Bateman *et al.*, 2023).⁵ Gen *EZH1* se skládá z 21 exonů a nachází se na chromosomu 17q (*Gene [Internet]*, 2004).

Mechanismus tumorigeneze: EZH1 má funkci při methylovaní Lysinu 27 histonu H3, což má za následek pevnější vazbu DNA na histon a represí transkripce cílového genu. Mutacemi způsobená snížená aktivita EZH1 může vést k rozvolnění heterochromatinu a expresi onkogenů, naopak zvýšená aktivita může způsobit inhibici exprese tumor supresorových genů (Lee *et al.*, 2022).

1.4.5 *THADA/IGF2BP3* fúze

THADA (thyroid adenoma associated) je gen pojmenovaný podle spojitosti s FTA, který kóduje regulační protein tRNA (32-2'-O)-methyltransferázy. Spolu s tRNA (32-2'-O)-methyltransferázou se podílí na methylovaní antikodónové smyčky v procesu maturace tRNA. Má délku 1953 aminokyselin a v buňce se nachází v cytosolu na membráně endoplasmatického retikula⁶ (Bateman *et al.*, 2023). Gen se skládá z 38 exonů a nachází se na chromosomu 2p (*Gene [Internet]*, 2004).

IGF2BP3 je gen s 15 exony na chromosomu 7p kódující protein IG2B3 (Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3) s délkou 579 aminokyselin. Jedná se o protein, který se váže na mRNA růstového faktoru 2 (IGF2) a dalších proteinů, zvyšuje její stabilitu, chrání ji před degradací a zvyšuje míru její translace⁷ (Bateman *et al.*, 2023) (*Gene [Internet]*, 2004). Při zvýšené expresi *IGF2BP3* dochází k větší proteosyntéze IGF2, což vede k nadměrné aktivaci dráhy MAPK a PTEN/PI3K/AKT přes tyrozinkinázový receptor IGF1R.

⁵ <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q92800/entry>

⁶ <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6YHU6/entry>

⁷ <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O00425/entry>

Fúze *THADA/IGF2BP3* mohou vzniknout fúzí genu *THADA* s místem lokalizovaným upstream od genu *IGF2BP3* (*LOC389473*) nebo fúzí *THADA* v exonech 28, 29, 30, 31, 35, 36 s 2. či 3. exonem genu *IGF2BP3*. Fúze *THADA/IGF2BP3* způsobuje nadměrnou tvorbu funkčního proteinu IGF2BP3, což vede ke karcinogenezi přes signalizační dráhy MAPK a PTEN/PI3K/AKT. (Panebianco *et al.*, 2017, Liang *et al.*, 2018)

2 Cíle práce

Cílem práce bylo najít nové genetické markery u nádorů štítné žlázy, které by se daly využít v diagnostice a určení typu nádoru a k následné indikaci léčebného postupu. Práce byla zaměřena na vzácné genetické změny, jejichž výskyt byl u nádorů štítných žláz dříve popsán, avšak s nejasným klinickým dopadem.

1. Sekvenace vybraných exonů genů *TSHR*, *PIK3CA*, *EIF1AX*, *EZH1* u různých typů nádorů štítné žlázy.
2. Detekce *THADA/IGF2BP3* fúzního genu u nízko-rizikových neoplázií a benigních nádorů štítné žlázy pomocí real-time PCR analýzy.
3. Zhodnocení nalezených genetických změn a jejich korelace s klinickými a patologickými daty.

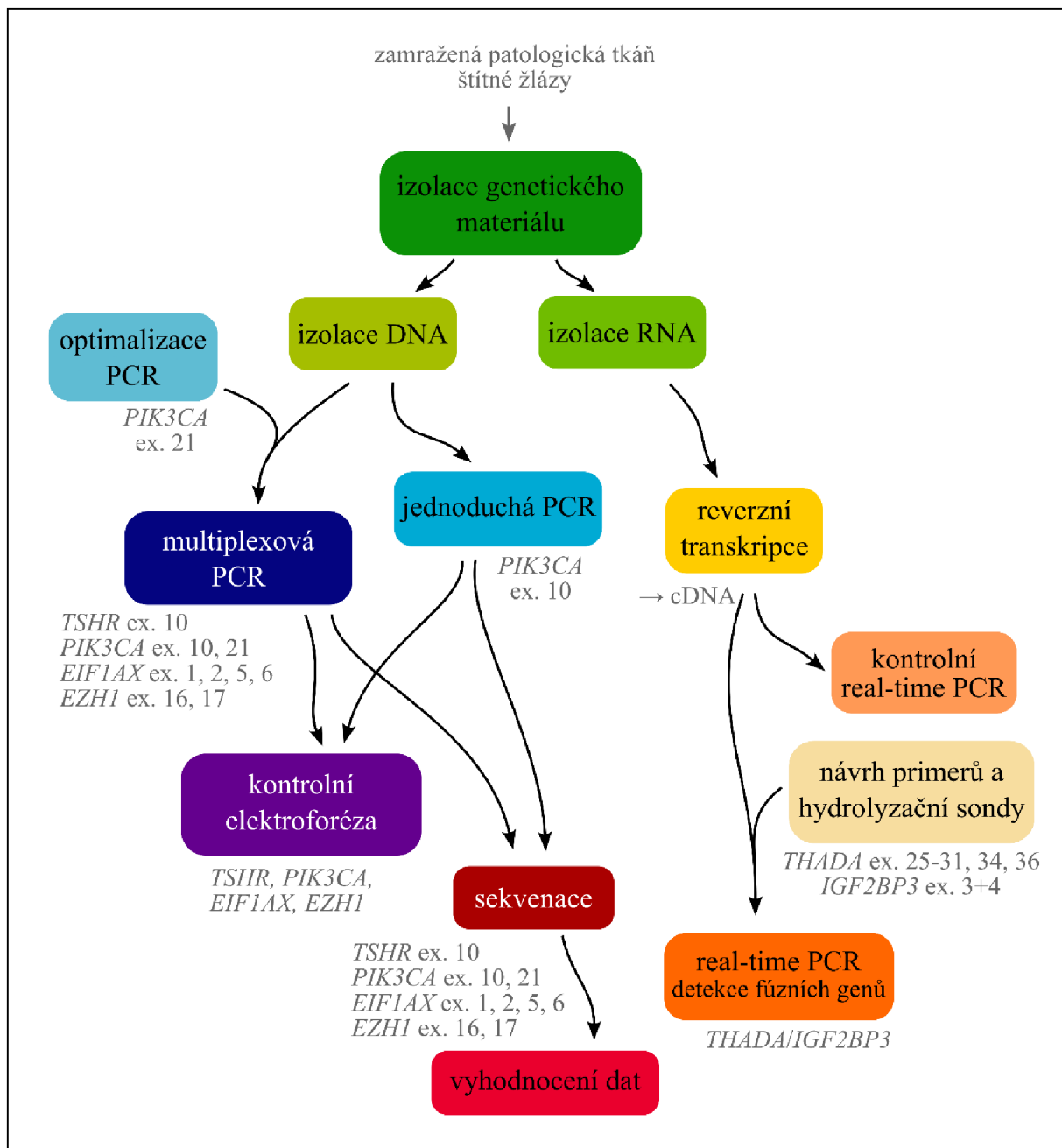
3 Materiál a metody

V experimentální části byly použity rozličné metody molekulární biologie zahrnující celý proces od izolace genetického materiálu po vyhodnocení nalezených mutací. V této kapitole jsou uvedeny postupy a použitý materiál pro všechny použité metody.

3.1 Organizace praktické části

Experimenty lze rozdělit do 3 hlavních oblastí – izolační, sekvenační a real-time PCR. V izolační části byly zpracovány všechny vzorky použité v práci, cílem bylo připravit materiál pro další analýzy. Tato část zahrnuje izolaci genetického materiálu ze zamražených tkání štítné žlázy, izolaci DNA a izolaci RNA. Dále se postup dělí na část sekvenační a real-time PCR, v kterých již byla zpracována jen příslušná část vzorků. V sekvenační části se pracovalo s vyizolovanou DNA s cílem nalézt mutace v genech *TSHR*, *PIK3CA*, *EIF1AX* a *EZH1*. Tato část zahrnuje jednoduchou a multiplexovou PCR, optimalizaci PCR, kontrolní elektroforézu, sekvenaci a vyhodnocení nalezených variant. Real-time PCR část se zabývala vyizolovanou RNA za účelem vyšetření *THADA* fúzních genů. K dosažení tohoto cíle byly použity metody reverzní transkripce, návrh primerů a hydrolyzační sondy pro real-time PCR. Posloupnost jednotlivých metod za sebou tak, jak se prováděly v experimentální části, je znázorněna na obrázku 1.

Obrázek 1 – Schéma experimentální části



3.1.1 Izolační část

Genetický materiál byl izolován z chirurgicky odebraných nádorových tkání štítné žlázy, které byly pathology vyšetřeny, část materiálu byla odříznuta a zamražena pro molekulárně genetické vyšetření Endokrinologickým ústavem. V návazných procesech byla z každého vzorku izolována DNA i RNA. Izolovala jsem genetickou informaci z 36 vzorků diagnostikovaných

jako benigní novotvary, zbylý genetický materiál izolovali pracovníci Endokrinologického ústavu. Izolace byla prováděna v sériích po 12, což je maximální kapacita použitého izolátoru.

3.1.2 Sekvenační část

Sekvenace se v Endokrinologickém ústavu prováděla vždy jednou za 2 měsíce při kapacitě 47 amplifikovaných vzorků/gen. Při sekvenování docházelo ke zpracování požadavků z celého pracoviště a celou metodu prováděl zaškolený pracovník Endokrinologického ústavu. Tohoto procesu jsem se účastnila pouze jako pozorovatel. Každému sekvenování předcházela PCR amplifikace příslušných vzorků a kontrolní elektroforéza – obě tyto metody (kromě přípravy nanášecí barvy pro elektroforézu, kterou provedli pracovníci Endokrinologického ústavu) jsem prováděla sama také v sériích 47 vzorků. Při první sérii sekvenování (zahrnující také PCR a kontrolní elektroforézu) byly zpracovány vzorky pro exon 10 genu *TSHR*, exon 10 genu *PIK3CA*, exony 1, 2, 5 a 6 genu *EIF1AX* a exony 16 a 17 genu *EZH1*. V případě genu *PIK3CA* se příslušný úsek DNA amplifikoval jednoduchou PCR, pro ostatní geny byla využita amplifikace pomocí multiplexové PCR. Tyto metody jsem prováděla v návaznosti na dřívější experimenty Endokrinologického ústavu, takže optimalizaci PCR již nebylo nutné provádět. Do 2. série sekvenování byl k exonu 10 genu *PIK3CA* přidán také exon 21, pro který jsem nejprve provedla optimalizaci PCR a poté byl exon zahrnut do multiplexové PCR genu *PIK3CA*. Takto se již postupovalo u všech dalších sérií v nezměněné podobě. Kontrolní elektroforéza byla prováděna pro všechny amplifikované vzorky vždy před sekvenací.

3.1.3 Real-time PCR část

Metoda reverzní transkripce se prováděla jako příprava materiálu pro real-time PCR v sériích po 8 nebo 16 vzorcích. Celkem jsem provedla reverzní transkripci pro 136 vzorků RNA z novotvarů diagnostikovaných jako benigní. Pro všechny tyto vzorky byla provedena také kontrolní real-time PCR pro ověření úspěšnosti reverzní transkripce. Metoda real-time PCR byla prováděna z cDNA ve dvou sériích s počty vzorků 88 a 48. Navíc bylo k druhé sérii přidáno 41 vzorků z maligních a nízkorizikových nádorů, u kterých reverzní transkripci provedli již dříve pracovníci Endokrinologického ústavu.

3.2 Izolace genetického materiálu ze zamražené tkáně

Přístroje:

Laminární box (KS12 HERA safe), centrifuga Eppendorf 5415 D, homogenizátor MagNA Lyser, fluorimetr Quantus™ Fluorometer, Fluorimetr Qubit 2.0, Izolátor QIAcube, Spektrofotometr QIAxpert

Reagencie:

Izolační kit AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen), RLT pufr, mercaptoethanol, Qubit dsDNA BR Assay Kit, Qubit RNA BR Assay Kit

3.2.1 Příprava lyzátu

Do falkonky byl v digestoři připraven lyzační roztok - 750 µl pufru RLT a 7,5 µl ME na 1 vzorek. Lyzační roztok byl následně rozpipetován po 670 µl do homogenizačních zkumavek. Na předem připravenou nádobu se suchým ledem v laminárním boxu byla umístěna předmražená skleněná deska a přikryta sterilním alobalem. Na tuto desku byl umístěn vzorek zamražené tkáně, ze které byla sterilním skalpelem vyříznuta vybraná část (max. 30 mg). Vyříznutá část byla přenesena do vychlazené homogenizační zkumavky. Zbytek tkáně byl přenesen do kryozkumavky Nunc a umístěn na suchý led. Homogenizační zkumavka byla poté vložena do homogenizátoru a obsah byl homogenizován po dobu 30 s při 3500 RPM, poté byla zkumavka umístěna zpět do vychlazeného stojánku. Tento postup byl opakován pro všechny vzorky a poté byly všechny vzorky homogenizovány ještě jednou 30 s při 3500 RPM. Zhomogenizované vzorky byly stočeny na centrifuze 3 min při maximální rychlosti a následně z nich byl odsát supernatant o objemu cca 600 µl do 2ml RB zkumavek.

3.2.2 Izolace DNA

Do 2 ml RB zkumavky byl připraven roztok „B“ podle počtu vzorků – na jeden vzorek 25 µl Proteinasy K a 75 µl pufru AW1, roztok byl promíchán překlápěním zkumavky a lehce stočen na centrifuze. V laminárním boxu byla do střední pozice označených adaptérů umístěna kolonka AllPrep DNA Mini spin column, které bylo předem ustříženo víčko, do vnější pozice adaptéru 1,5ml sběrná zkumavka, jejíž víčko bylo zasunuto do jamky. Vzorky, adaptéry a roztok „B“ byly umístěny do izolátoru a byl spuštěn program pro izolaci DNA. Po skončení izolace byla kolonka odstraněna a obsah ze střední pozice byl přepipetován do nové 2ml RB zkumavky

a použit jako vstupní materiál pro izolaci RNA. Ze sběrné zkumavky ve vnější pozici adaptéru byla DNA přemístěna do nové zásobní kryozkumavky. Následně byla změřena čistota (A260/A280) DNA pomocí spektrofotometru QIAxpert ze 2 μ l DNA.

3.2.3 Izolace RNA

Do 2 ml RB zkumavky byl připraven roztok „A“ podle počtu vzorků – na jeden vzorek 10,5 μ l DNase I stock solution a 74 μ l pufru RDD, roztok byl promíchán překlápěním zkumavky a lehce stočen na centrifuze. Do další 2 ml RB zkumavky byl připraven roztok „B“ podle počtu vzorků – na jeden 100 μ l Proteinasy K. V laminárním boxu byla do vnitřních pozic označených adaptéru umístěna kolonka RNeasy® Mini spin column, které bylo předem ustřiženo víčko, do vnější pozice adaptéru 1,5ml sběrná zkumavka, jejíž víčko bylo zasunuto do jamky. Vzorky, adaptéry a roztoky „A“ a „B“ byly umístěny do izolátoru a byl spuštěn program pro izolaci RNA. Po skončení izolace byly adaptéry umístěny na led do laminárního boxu. Ze 2 μ l RNA byla změřena čistota RNA pomocí spektrofotometru QIAxpert. Zkumavky s vyizolovanou RNA byly umístěny do hlubokomrazicího boxu.

3.2.4 Měření koncentrace vyizolované RNA a DNA pomocí fluorimetru Quibit

Standardy Qubit kitu byly 30 min před měřením temperovány na laboratorní teplotu. Do tenkostěnných bezbarvých 0,5ml zkumavek bylo napipetováno 1 μ l vyizolované DNA či RNA a do zkumavek pro standardy do jedné 10 μ l standardu 1, do druhé 10 μ l standardu 2. Do falkonky byl připraven pracovní roztok podle počtu vzorků včetně 2 standardů – pro jeden vzorek 199 μ l pufru Qubit Buffer a 1 μ l Qubit Reagent, směs byla důkladně zvortexována. Do zkumavek s DNA či RNA bylo napipetováno 199 μ l pracovního roztoku, do zkumavek pro standardy 190 μ l. Obsah všech zkumavek byl zvortexován a inkubován 2 min. Následně byla změřena koncentrace DNA pomocí Fluorimetru Quibit.

3.3 PCR

Přístroje:

PCR box, elektronická pipeta FinnpiPETTE Novus, T100 Thermal Cycler (výrobce: Bio-Rad, USA), Cycler Bio-Rad T100 (optimalizace)

Použité reagensie:

AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (kat.č. 4398881, Applied Biosystems), 360 GC Enhancer, injekční sterilní voda, 10 ng/μl pracovní DNA, zásobní 100 μM Primer forward a zásobní 100μM Primer reverse pro geny *TSHR* (exon 10), *PIK3CA* (exony 10, 21), *EIF1AX* (exony 1, 2, 5 a 6), *EZHI* (exony 16, 17)

3.3.1 Jednoduchá PCR amplifikace

Mikrozkumavky stripu byly řádně označeny příslušnými čísly vzorků a umístěny do stojánku na led. Jedna mikrozkumavka byla připravena pro negativní kontrolu. Primery byly naředěny ze zásobní koncentrace 100 μM na koncentraci 1 μM. Do 1,5ml zkumavky byl v PCR boxu připraven mastermix pro příslušný počet vzorků včetně negativní kontroly podle tabulky 2.

Tabulka 2 - Množství reagensií pro mastermix na jednoduchou amplifikaci pro 1 vzorek

<i>PIK3CA</i>	Finální koncentrace	Objem [μl]
H ₂ O	-	1,6
AmpliTaq Gold® 360 DNA (2x) Master Mix	1x	6
1μM Primer forward	0,1 μM	1,2
1μM Primer reverse	0,1 μM	1,2
Celkové množství mastermixu:	-	10
DNA (10ng/μl)	1,67 ng/μl	2
Celkové množství:	-	12

Mastermix byl rozpipetován do jednotlivých mikrozkumavek pro vzorky a negativní kontrolu elektronickou pipetou. Do každé mikrozkumavky byl přidán požadovaný objem 10ng/μl DNA podle tabulky 2, do mikrozkumavky pro negativní kontrolu bylo napipetováno stejné množství sterilní vody. Stripy byly uzavřeny víčkem, krátce stočeny na centrifuze a vloženy do termocycleru. Byl spuštěn program znázorněný v tabulce 3. Po ukončení amplifikace byly vzorky skladovány v mrazáku při teplotě -20 °C.

Tabulka 3 - Schéma programu termocycleru při jednoduché PCR amplifikaci

	t [°C]	Čas	Počet cyklů
Aktivace polymerázy	95	10 min	1x
Denaturace	95	30 s	40x
Vazba primerů	57	30 s	
Syntéza DNA	72	30 s	
Závěrečná syntéza	72	10 min	1x
Chlazení	4	∞	

3.3.2 Optimalizace PCR reakce pro 21. exon genu *PIK3CA*

Při optimalizaci PCR reakce byla zkoušena účinnost amplifikace při 8 různých teplotách nasedání primerů na templát během cyklů PCR a při 3 různých koncentracích enhanceru 360 GC Enhancer. Schéma optimalizační reakce je ukázáno v tabulce 4.

Tabulka 4 - Schéma optimalizační PCR

Teplota vazby primerů [°C]	Strip 1	Strip 2	Strip 3
	Enhancer 0%	Enhancer 2%	Enhancer 5%
56,0	Vzorek A1	Vzorek A2	Vzorek A3
56,9	Vzorek B1	Vzorek B2	Vzorek B3
58,3	Vzorek C1	Vzorek C2	Vzorek C3
60,6	Vzorek D1	Vzorek D2	Vzorek D3
63,3	Vzorek E1	Vzorek E2	Vzorek E3
65,6	Vzorek F1	Vzorek F2	Vzorek F3
67,1	Vzorek G1	Vzorek G2	Vzorek G3
68,0	Vzorek H1	Vzorek H2	Vzorek H3

Pro optimalizační reakci byly označeny stripy pro 3 různé koncentrace enhanceru (0%, 2%, 5%) a umístěny do stojánku na led. Zásobní primery byly naředěny ze zásobní koncentrace 100 μM na koncentraci 1 μM . Do 3 zkumavek byly připraveny mastermixy pro 3 různé koncentrace enhanceru podle tabulky 5.

Tabulka 5 - Množství reagentů na mastermix pro optimalizační PCR

0% Enhancer	Finální koncentrace	Objem [μ l] pro 1 vzorek	Objem [μ l] pro 9 vzorků
H ₂ O	-	1,6	14,4
AmpliTaq Gold® 360 DNA (2x) Master Mix	1x	6,0	54,0
1 μ M Primer forward	0,1 μ M	1,2	10,8
1 μ M Primer reverse	0,1 μ M	1,2	10,8
360 GC Enhancer	0%	0	0
DNA (10ng/ μ l)	1,67 ng/ μ l	2,0	18,0
Celkové množství:	-	12,0	108,0

2% Enhancer	Finální koncentrace	Objem [μ l]	Objem [μ l] pro 9 vzorků
H ₂ O	-	1,36	12,2
AmpliTaq Gold® 360 DNA (2x) Master Mix	1x	6,0	54,0
1 μ M Primer forward	0,1 μ M	1,2	10,8
1 μ M Primer reverse	0,1 μ M	1,2	10,8
360 GC Enhancer	2%	0,24	2,2
DNA (10ng/ μ l)	1,67 ng/ μ l	2,0	18,0
Celkové množství:	-	12,0	108,0

5% Enhancer	Finální koncentrace	Objem [μ l]	Objem [μ l] pro 9 vzorků
H ₂ O	-	1,0	9,0
AmpliTaq Gold® 360 DNA (2x) Master Mix	1x	6,0	54,0
1 μ M Primer forward	0,1 μ M	1,2	10,8
1 μ M Primer reverse	0,1 μ M	1,2	10,8
360 GC Enhancer	5%	0,6	5,4
DNA (10ng/ μ l)	1,67 ng/ μ l	2,0	18,0
Celkové množství:	-	12,0	108,0

Mastermixy byly rozpipetovány do jednotlivých mikrozkušavek stripu podle schématu v tabulce 4 a stripy byly vloženy cycleru Bio-Rad T100, následně byl spuštěn program pro optimalizaci s gradientem teplot pro nasedání primerů pro jednotlivé mikrozkušavky. Program je znázorněn v tabulce 6. Po ukončení amplifikace byly stripy skladovány v mrazáku při teplotě -20 °C. Optimalizační PCR byla vyhodnocena pomocí agarózové elektroforézy podle postupu v kapitole Kontrolní agarózová elektroforéza na str. 28

Tabulka 6 - Schéma PCR pro optimalizaci primerů

	t [°C]	Čas	Počet cyklů
Aktivace polymerázy	95	10 min	1x
Denaturace	95	30 s	40x
Vazba primerů	56-68	30 s	
Syntéza DNA	72	1 min	
Závěrečná syntéza	72	10 min	1x
Chlazení	4	∞	

3.3.3 Multiplexová PCR amplifikace

Mikrozkušavky stripu byly označeny příslušnými čísly vzorků a umístěny do stojánku na led. Byla připravena mikrozkušavka také pro negativní kontrolu. Do 1,5ml zkušavky byl připraven primermix pro daný gen podle tabulky 7, množství reagentů bylo ovlivněno počtem primerů pro zkoumanou/é oblast/i genu.

Tabulka 7 - Množství reagentů pro primermix pro jednotlivé geny

TSHR	Finální koncentrace pro	Objem [μl]
4 x Zásobní 100μM Primer forward pro exon 10	1,25 μM ⁸	4 x 10
4 x Zásobní 100μM Primer reverse pro exon 10	1,25 μM ⁸	4 x 10
H ₂ O	-	720
Celkové množství	-	800

⁸ Pro jednotlivé primery

<i>PIK3CA</i>	Finální koncentrace	Objem [μ l]
Zásobní 100 μ M Primer forward pro exony 10 a 21	2,5 μ M ⁸	2 x 10
Zásobní 100 μ M Primer reverse pro exony 10 a 21	2,5 μ M ⁸	2 x 10
H ₂ O	-	360
Celkové množství	-	400

<i>EIF1AX</i>	Finální koncentrace	Objem [μ l]
Zásobní 100 μ M Primer forward pro exony 1, 2, 5 a 6	1,25 μ M ⁸	4 x 10
Zásobní 100 μ M Primer reverse pro exony 1, 2, 5 a 6	1,25 μ M ⁸	4 x 10
H ₂ O	-	720
Celkové množství	-	800

<i>EZH1</i>	Finální koncentrace	Objem [μ l]
Zásobní 100 μ M Primer forward pro exony 16 a 17	2,5 μ M ⁸	2 x 10
Zásobní 100 μ M Primer reverse pro exony 16 a 17	2,5 μ M ⁸	2 x 10
H ₂ O	-	360
Celkové množství	-	400

Do 1,5ml zkumavky byl v PCR boxu připraven mastermix pro příslušný počet vzorků včetně negativní kontroly podle tabulky 8.

Tabulka 8 - Množství reagensií pro mastermix pro jednotlivé geny na multiplexovou amplifikaci pro 1 vzorek

<i>TSHR</i>	Finální koncentrace	Objem [μ l]
H ₂ O	-	2,6
AmpliAq Gold® 360 DNA (2x) Master Mix	1x	6
Primermix	0,15 μ M ⁸	1,4
Celkové množství mastermixu:	-	10
DNA (10ng/ μ l)	1,67 ng/ μ l	2
Celkové množství:	-	12

<i>PIK3CA</i>	Finální koncentrace	Objem [μ l]
H ₂ O	-	2,6
AmpliAq Gold® 360 DNA (2x) Master Mix	1x	6
Primermix	0,29 μ M ⁸	1,4
Celkové množství mastermixu:	-	10
DNA (10ng/ μ l)	1,67 ng/ μ l	2
Celkové množství:	-	12

<i>EIF1AX</i>	Finální koncentrace	Objem [μ l]
H ₂ O	-	2,8
AmpliAq Gold® 360 DNA (2x) Master Mix	1x	10
Primermix	0,20 μ M ⁸	3,2
Celkové množství mastermixu:	-	16
DNA (10ng/ μ l)	2 ng/ μ l	4
Celkové množství:	-	20

<i>EZH1</i>	Finální koncentrace	Objem [μ l]
H ₂ O	-	2,1
AmpliAq Gold® 360 DNA (2x) Master Mix	1x	6
Primermix	0,40 μ M ⁸	1,9
Celkové množství mastermixu:	-	10
DNA (10ng/ μ l)	1,67 ng/ μ l	2
Celkové množství:	-	12

Mastermix byl mimo PCR box rozpipetován do jednotlivých mikrozkušavek pro vzorky a negativní kontrolu elektronickou pipetou. Do každé mikrozkušavky byl přidán požadovaný objem 10 ng/ μ l DNA podle tabulky 8. Do mikrozkušavky pro negativní kontrolu bylo napipetováno stejné množství sterilní vody. Stripy byly uzavřeny víčkem, krátce stočeny na centrifuze a vloženy do termocycleru. Následně byl spuštěn program pro multiplexovou PCR, který je znázorněn v tabulce 9 tabulce 3. Po ukončení amplifikace byly stripy skladovány v mrazáku při teplotě -20 °C.

Tabulka 9 - Schéma programu termocycleru při multiplexové PCR amplifikaci

	t [°C]	Čas	Počet cyklů
Aktivace polymerázy	95	10 min	1x
Denaturace	95	30 s	40x
Vazba primerů	57	1 min 30 s	
Syntéza DNA	72	1 min 30 s	
Závěrečná syntéza	72	10 min	1x
Chlazení	4	∞	

3.4 Kontrolní agarózová elektroforéza

Přístroje:

Digestoř, váhy, centrifuga, magnetické míchadlo, elektroforetický zdroj, UV transiluminátor, fotoaparát

Použité reagensy:

0,5X TBE pufr pH 8,45-8,55, agaróza (TopBio, ČR), interkalační fluorescenční barvivo GelRed (Biotium, USA), DNA marker Gene Ruler 100 bp (MBI Fermentas, Litva); nanášecí barva: Sacharóza (Mr = 342,3; kat.č. 194018; ICN Biomedicals, Inc.), EDTA EDTA Na₂·2H₂O (Mr = 372,24), bromfenolová modř (kat. č. B5525 Sigma-Aldrich), xylencyanolové modři (Mr = 538,6; kat. č. X4126, Sigma-Aldrich), deionizovaná voda

3.4.1 Příprava nanášecí barvy

Do 50ml falkonky byly odváženy reagensy a doplněny deionizovanou vodou do 30ml podle tabulky 10. Do falkonky bylo vloženo magnetické míchadlo a po uzavření falkonky byl roztok míchán 2 h do úplného rozpuštění.

Tabulka 10 - množství reagensů pro přípravu nanášecí barvy

	Finální koncentrace [mg/ml]	Množství reagensů
Sacharóza	33	1 g
EDTA Na ₂ ·2H ₂ O	6,7	0,2 g
Bromfenolová modř	0,1	cca 3 mg
Xylencyanolová modř	0,1	cca 3 mg
Deionizovaná voda	-	Doplňt do 30 ml

3.4.2 Příprava 1,5% agarózového gelu

Byly přichystány elektroforetické sánky s objemem 300 ml, umístěny na vodorovnou podložku do digestoře a byly do nich upevněny hřebeny pro vytvoření jamek. Do skleněné lahve byl odměřen pufr a agaróza podle tabulky 11.

Tabulka 11 - množství reagensů pro přípravu agarózového gelu

	Finální koncentrace	Přidané množství
0,5x TBE	-	250 ml
agaróza	1,5 %	3,75 g
GelRed barvivo	0,2 ‰	5 µl

Do lahve s pufrem a agarózou bylo následně umístěno magnetické míchadlo, láhev byla vložena do mikrovlnky a zahřívána, dokud se agaróza úplně nerozpustila (cca 5 min). Poté byla láhev umístěna v digestoři na magnetické míchadlo a míchadlo bylo spuštěno při takové rychlosti míchání, aby nedocházelo k čerění hladiny a vzniku bublin. Za stálého míchání roztok chladl na cca 60 °C přibližně 30 min. Po vychladnutí bylo přidáno 5 µl interkalačního barviva GelRed a rozmícháno pomocí magnetického míchadla. Roztok byl nalit do připravených elektroforetických sáňek tak, aby nedošlo ke vzniku bublin, a ponechán v digestoři po zatuhnutí 30 min.

3.4.3 Příprava vzorků na elektroforézu

Stripy s PCR produkty byly rozmrazeny a stočeny na centrifuze 1 min při 1000 rpm. Do pipetovací 96-jamkové destičky bylo do každé jamky (podle počtů vzorků) napipetováno 3 µl nanášecí barvy. Sloupce v destičce byly značeny čísly 1-16, řádky písmeny A-H. Do jamek s barvou byly následně přidány 4 µl PCR produktů a propipetovány – do jamky A1 vzorek 1 ze 1. stripu, do jamky B1 vzorek 2 z 1. stripu, ...

3.4.4 Nanášení vzorků na gel

Z elektroforetických sáňek se zatuhnutým gelem byly opatrně vyjmuty hřebeny tak, aby nebyly poškozeny jamky. Sáňky byly umístěny do elektroforetické vany s 0,5x TBE pufrem tak, aby pufr sahal nad úroveň gelu. Sáňky byly orientovány tak, aby se nanesené vzorky mohly v elektrickém poli pohybovat ke kladně nabitému pólu, tedy jamkami blíže ke katodě. Do volné jamky v pipetovací destičce bylo připraveno potřebné množství roztoku DNA markeru podle počtu řad jamek v gelu podle tabulky 12 tak, aby v každé řadě jamek byla jedna jamka pro DNA marker.

Tabulka 12 - Množství reagensií pro přípravu roztoku DNA markeru

	Množství pro 1 jamku [µl]
Barvivo z kitu DNA markeru	0,5
DNA marker	0,5
0,5x TBE pufr	2
Celkové množství	3

Do jamek gelu bylo nanášeno 7 µl PCR produktů s barvivem a 3 µl DNA markeru podle schématu v tabulce 13, do poslední jamky byla nanášena negativní kontrola.

Tabulka 13 - schéma pipetování vzorků do jamek elektroforetického gelu

Směr elektroforézy ↑	DNA marker	NK
	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3	DNA marker	A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4
	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	DNA marker	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2

A1-H4 – označení vzorků podle označení v pipetovací destičce, NK – negativní kontrola

3.4.5 Vlastní elektroforéza

Elektroforetickou vana byla uzavřena a připojena k elektroforetickému zdroji, na kterém bylo nastaveno napětí 90 V a elektroforéza byla spuštěna na cca 30 minut. Po uplynutí 30 min byl vypnut zdroj a elektroforetická vana byla odpojována. Z vany byly vyndány sáňky, gel opláchnut a umístěn na UV transiluminátor. Na transiluminátoru bylo spuštěno UV záření a gel fotograficky zdokumentován. Následně byla vyhodnocena přítomnost PCR produktů u vzorků a negativní kontroly.

3.5 Sekvenace

Přístroje:

Centrifuga LMC-3000, Agencourt SPRIplate 96R Super Magnet Plate (kat. č. A32782), Fluorimetr Qubit 2.0, T100 Thermal Cycler, TruSeq Index Plate Fixture (Illumina), Ambion Magnetic Stand-96, Agilent 2100 Bioanalyzer, Chip Priming Station, IKA vortex mixer, centrifuga EBA 12R

Reagencie:

Agencourt® AMPure® XP (kat. č. A63881, Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter) Agencourt AMPure XP, 96% ethanol, injekční sterilní voda, Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit, Nextera XT DNA Library Prep Kit, Index 1 primery (N7XX), Index 2 primery (S5XX), High Sensitivity DNA Reagents, High Sensitivity DNA Chips, HT1 (Hybridization Buffer), PhiX Control kit v3 (Illumina), MiSeq reagent cartridge, 10 N NaOH

Materiál:

96-jamková PCR destičky, Folie na PCR destičky, MIDI destička

3.5.1 Poolování PCR produktů

Do stojánku umístěném na ledu byly připraveny stripy podle počtu PCR produktů. Stripy s PCR produkty byly rozmrazeny a stočeny na centrifuze LMC-3000 1 min při 1000 rpm. Multikanálovou pipetou bylo přeneseno předem stanovené množství PCR produktů do nových stripů. Množství bylo stanoveno empiricky na základě předchozích pokusů a zahrnuje požadavek na počet čtení, velikost vyšetřované oblasti genu a to, zda se jedná o vzorek dobře či hůře amplifikovatelný.

3.5.2 Purifikace PCR produktů

Bylo naředěno potřebné množství 96% ethanolu na 70% dle počtu vzorků – na jeden vzorek 420 μ l 70% ethanolu. Roztok magnetických částic (Agencourt® AMPure® XP) byl v lahvičce promíchán. Do nových stripů bylo napipetováno 10 μ l promíchaných poolovaných vzorků. Do každé mikrozkušavky stripu se vzorkem bylo přidáno 20 μ l roztoku magnetických částic, směs byla zvortexována, krátce stočena na centrifuze a inkubována 5 min. Stripy byly umístěny na Super Magnet a ponechány v klidu, dokud se magnetické částice přes stěnu zkumavky nepřichytily na magnet a roztok se nevyjasnil (cca 2 min). Následně byl odsát supernatant. Obsah stripů byl promyt 70% ethanolom – ke každému vzorku bylo přidáno 200 μ l ethanolu, po 30 s byl veškerý ethanol odstraněn. Celé promytí bylo zopakováno ještě jednou. Stripy byly odstraněny z magnetu a sušeny cca 10 min. Do stripů se vzorky bylo poté přidáno 60 μ l sterilní vody, stripy byly zvortexovány, krátce stočeny na centrifuze a inkubovány 5 min. Následně byly stripy umístěny na Super Magnet a ponechány v klidu, dokud se magnetické částice přes stěnu zkumavky nepřichytily na magnet a roztok se nevyjasnil (cca 2 min). Purifikované PCR produkty v supernatantu byly odsáty do nových stripů.

3.5.3 Měření koncentrace a ředění PCR produktů

Součásti Qubit kitu byly temperovány na laboratorní teplotu (standarty, pracovní roztok) 30 min před měřením. Do tenkostěnných bezbarvých 0,5ml zkumavek byl napipetován pracovní roztok z kitu – do zkumavek pro vzorky 195 μ l, do 2 zkumavek pro standarty 190 μ l. Do každé zkumavky pro standarty bylo přidáno 10 μ l standardu – do jedné zkumavky standard 1, do

druhé standard 2, do zkumavek pro vzorky bylo přidáno 5 μ l purifikovaných PCR produktů. Obsah všech zkumavek byl zvortexován a inkubován 2 min. Pomocí Fluorimetru Qubit byla změřena koncentrace DNA. Z naměřených hodnot bylo vypočítáno množství vody, kterým se musí naředit 2,5 μ l purifikovaných produktů, aby výsledná koncentrace byla 0,2 ng/ μ l, podle vzorce:

$$V_{H_2O} = \frac{5 \cdot c_{DNA}}{0,2} - 5,$$

kde V_{H_2O} je objem vody, který je nutno přidat, a c_{DNA} je změřená koncentrace purifikovaných PCR produktů. Do nových stripů bylo napipetováno vypočítané množství vody a k němu bylo přidáno 5 μ l purifikovaných PCR produktů.

3.5.4 Tagmentace

ATM a TD pufr z Nextera XT DNA Library Prep Kitu byly umístěny na led a rozmraženy, poté jemně promíchány a stočeny na centrifuze. NT pufr byl temperován na laboratorní teplotu. Do příslušného počtu jamek 96-jamkové PCR destičky bylo napipetováno 10 μ l TD pufru a přidáno 5 μ l naředěné DNA o koncentraci 0,2 ng/ μ l. Poté bylo přidáno 5 μ l ATM a směs promíchána. Destička byla přelepena fólií a stočena na centrifuze 1 min při 1000 rpm. Následně byla destička vložena do cycleru a spuštěn program 5 min inkubace při 55 °C, poté chlazení na 10 °C. Ihned po skončení programu byly vzorky neutralizovány přidáním 5 μ l NT pufru. Destička byla opět přelepena fólií a stočena na centrifuze 1 min při 1000 rpm. Následně byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě.

3.5.5 PCR amplifikace

Reagencie z Nextera XT DNA Library Prep Kit (NPM) a příslušné indexy byly rozmraženy 20 min před použitím, jemně promíchány a stočeny na centrifuze. Na speciální stojánek TruSeq Index Plate Fixture byly přichystány příslušné indexy a rozpipetovány do každého sloupce a řádku v PCR destičce. Do všech jamek bylo přidáno 15 μ l NPM a propipetováno. Destička byla přelepena fólií stočena na centrifuze 1 min při 1000 rpm, poté umístěna do cycleru a byl spuštěn program podle schématu v tabulce 14.

Tabulka 14 - schéma PCR pro vazbu indexů před sekvenací

	t [°C]	Čas	Počet cyklů
	72	3 min	1x
Aktivace polymerázy	95	30 s	1x
Denaturace	95	10 s	12x
Vazba indexů	55	30 s	
Syntéza DNA	72	30 s	
Závěrečná syntéza	72	5 min	1x
Chlazení	10	∞	

3.5.6 Purifikace knihoven

Roztok magnetických částic byl temperován na pokojovou teplotu asi 30 min. Roztok RSB byl rozmražen na pokojovou teplotu. Bylo naředěno potřebné množství 96% ethanolu na 80% dle počtu vzorků – na jeden vzorek 520 μ l 80% ethanolu. Do MIDI destičky bylo napipetováno 50 μ l DNA knihoven získaných PCR amplifikací. Ke každému vzorku bylo přidáno 30 μ l dobře promíchaného roztoku magnetických částic. MIDI destička byly přelepena fólií a umístěna na třepačku na 2 min při nastavení 1800 rpm, poté inkubována 5 min a krátce stočena na centrifuze. Poté byla destička umístěna na magnet pro MIDI destičky a ponechána, dokud se magnetické částice neusadily k magnetu a supernatant nebyl čirý – cca 2 min. Supernatant byl poté odstraněn pomocí multikanálové pipety. Obsah destičky byl promyt 80% ethanolom – opatrně, aby magnetické částice nebyly narušeny, bylo ke každému vzorku přidáno 200 μ l ethanolu, po 30 s byl veškerý ethanol odsát a vyhozen. Celé promytí bylo zopakováno ještě jednou. Destička byla sušena cca 5-10 min. Ke vzorkům bylo již mimo magnet přidáno 32,5 μ l promíchaného RSB. MIDI destička byla přelepena fólií a umístěna na třepačku na 2 min při nastavení 1800 rpm. Poté byla destička inkubována 2 min, krátce stočena na centrifuze, umístěna na magnet pro MIDI destičky a ponechána, dokud se magnetické částice neusadily k magnetu – cca 2 min. Z destičky bylo odpipetováno 30 μ l vzorků do nové 96-jamkové PCR destičky.

3.5.7 Měření koncentrace tagmentovaných PCR produktů

Při měření koncentrace PCR produktů bylo postupováno stejně, jako je popsáno v kapitole 0.

3.5.8 Zjištění délky fragmentů PCR produktů

High Sensitivity DNA reagentie byly temperovány na laboratorní teplotu 30 min před použitím. Byl namíchán Gel-Dye Mix – 15 μ l zvortexovaného High Sensitivity DNA Dye Concentrate do High Sensitivity DNA Gel Matrix, směs byla zvortexována a krátce stočena, přenesena do zkumavky s kolonkou a centrifugována na centrifuze EBA 12R 15 min při 2240 g. Byla připravena Chip Priming Station a vložen čip (High Sensitivity DNA Chip). Elektrody byly vyčištěny pomocí čistícího čipu pro DNA (Electrode Cleaner) – do čipu bylo napipetováno 350 μ l sterilní vody, čip byl vložen do Agilent 2100 Bioanalyzeru a čištění probíhalo cca 2 min, poté byl čip odstraněn. Na příslušnou jamku čipu bylo naneseno 9 μ l Gel-Dye Mixu, Chip Priming Station byla zavřena a píst stříkačky byl stlačen z pozice 1 ml dolů, po 60 s opatrně uvolněn zpět do pozice 1 ml. Chip Priming Station byla otevřena a bylo naneseno 9 μ l Gel-Dye Mixu do 3 příslušných jamek čipu. Do zbylých 12 jamek čipu bylo naneseno 5 μ l zvortexovaného markeru. Do jamky pro ladder (žebříček) bylo naneseno 1 μ l High Sensitivity DNA Ladderu, do zbylých jamek 1 μ l z dobře promíchaných vzorků. Čip byl zvortexován v IKA vortex mixeru 1 min při 2400 rpm, poté vložen do Agilent 2100 Bioanalyzeru a přístroj byl spuštěn. Z naměřených koncentrací indexovaných knihoven a délky fragmentů byl vypočítán objem jednotlivých vzorků, který bude přidán do celkové knihovny podle rovnice:

$$V = \frac{k \cdot 660 \cdot 10^6}{c \cdot d},$$

Kde V je objem indexovaných knihoven v μ l, který bude přidán do celkové knihovny, k je koeficient, c je koncentrace DNA v ng/ μ l a d je délka fragmentů PCR produktů.

3.5.9 Poolování knihoven a nasazení do sekvenační cartridge

Hybridizační pufr HT1 byl rozmražen na ledu, sekvenační cartridge ve vodní lázni 1 h před použitím. Z 10 N NaOH byl ředěním připraven 1 ml 0,2 N NaOH. Podle výpočtu výše byly jednotlivé DNA knihovny smíchány do nové 1,5ml zkumavky do společné knihovny. Dále byla připravena PhiX knihovna – do nové 1,5ml zkumavky bylo napipetováno 2 μ l 10nM PhiX knihovny, 3 μ l sterilní vody a 5 μ l 0,2N NaOH. Směs byla zvortexována, lehce stočena a inkubována 5 min. Poté bylo přidáno 990 μ l vychlazeného HT1 do celkového objemu 1ml, směs byla opět zvortexována a lehce stočena na centrifuze. Bylo vypočítáno množství celkové knihovny, které bude naředěno stejným množstvím 0,2 N NaOH podle vzorce:

$$V = \frac{7,5 \cdot 2590}{c},$$

kde V je objem ředěné celkové knihovny v μl a c koncentrace knihovny v pM. Vypočítané objemy byly smíchány, směs zvortexována, lehce stočena a inkubována 5 min. Poté byl přidán vychlazený HT1 do celkového objemu 1 ml. Výsledná celková knihovna o koncentraci 20 pM, byla zvortexována a lehce stočena na centrifuze. Do nové zkumavky byla naředěna 20pM PhiX knihovna na 12,5 pM PhiX – bylo smícháno 275 μl 20pM denaturované PhiX knihovny se 165 μl vychlazeného HT1. Následně bylo do nové zkumavky přeneseno 970 μl 20pM celkové knihovny a přidáno 30 μl 12,5pM PhiX. Z výsledné směsi bylo 600 μl nanášeno do vyznačeného místa do sekvenační cartridge a byla spuštěna sekvenace.

3.6 Reverzní transkripce

Přístroje:

Biometra Tone thermal cycler

Použité reagensie:

Injekční sterilní voda, Random Primer, vzorky RNA, referenční RNA pro optimalizaci, AMV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer, 10 mM dNTPs, 40 U/ μl RNasin Plus RNase Inhibitor, 23,7 U/ μl AMV Reverse Transcriptase

3.6.1 Random priming

Do stripů pro vzorky a negativní kontrolu byly napipetovány 2 μl Random Primeru o koncentraci 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Do stripů pro vzorky byl následně přidán takový objem RNA, aby přidané množství RNA bylo 2 μg , do mikrozkušavky pro negativní kontrolu nebylo přidáno nic. Přidaný objem byl spočítán podle vzorce:

$$V_{RNA} = \frac{m \cdot 1000}{c} = \frac{2000}{c},$$

kde za m byla dosazena požadovaná hmotnost 2 μg , koncentrace c byla zadána v jednotkách $\text{ng}/\mu\text{l}$ a objem RNA V_{RNA} vyšel v μl . Do mikrozkušavek byla přidána sterilní voda na výsledný objem 10 μl . Objem H_2O byl spočítán podle vzorce:

$$V_{H_2O} = 10 - 2 - V_{RNA},$$

Kde V_{RNA} i objem vody V_{H_2O} se udávají v μl . Stripy byly vloženy do cycleru a spuštěn program pro navázání Random Primerů na RNA – inkubace při 70 °C po dobu 5 min. Následně byly stripy chlazeny na ledu po dobu 2 min.

3.6.2 Syntéza cDNA

Pro příslušný počet vzorků (+ negativní kontrola) byl připraven mastermix podle tabulky 15.

Tabulka 15 - Množství reaktantů pro mastermix na syntézu cDNA pro 1 vzorek

	Finální koncentrace	Objem [μl]
H ₂ O	-	5,23
AMV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer	1x	5
10 mM dNTPs	1 mM	2,5
40 U/ μl RNasin Plus RNase Inhibitor	40 U	1
23,7 U/ μl AMV Reverse Transcriptase	30 U	1,27
Celkové množství mastermixu:	-	15
Random priming mix:	-	10
Celkové množství:	-	25

Do každé mikrokumavky stripu s RNA a s negativní kontrolou bylo napipetováno 15 μl mastermixu a promícháno. Stripy byly vloženy do cycleru a byl spuštěn program pro syntézu cDNA: 10 min při 25 °C, 60 min při 37 °C, 5 min při 80 °C, zchlazení na 4 °C.

3.7 Real-time PCR

Postup real-time PCR zahrnuje návrh primerů a hydrolyzační sondy, kontrolní real-time PCR pro ověření úspěšnosti reverzní transkripce a vlastní real-time PCR.

3.7.1 Kontrolní real-time PCR pro ověření úspěšnosti reverzní transkripce

Přístroje:

Light Cyclor Roche 480

Reagencie:

Injekční sterilní voda, TaqMan Fast Advanced Master Mix 2x, primery pro *ACTB*: 10 μ M Primer Forward, 10 μ M Primer Reverse, 10 μ M Taqman Probe, cDNA

Postup:

Získaná cDNA byla 5x naředěna. Do 1,5ml zkumavky byl připraven mastermix pro příslušný počet vzorků včetně negativní kontroly z reverzní transkripce a negativní kontroly pro mastermix podle tabulky 16 a směs byla promíchána na vortexu.

Tabulka 16 - Množství reagentů pro mastermix na kontrolní real-time PCR pro 1 vzorek

	Finální koncentrace	Objem [μ l]
H ₂ O	-	2,35
TaqMan Fast Advanced Master Mix 2x	1x	5,00
10 μ M Primer Forward	0,25 μ M	0,25
10 μ M Primer Reverse	0,25 μ M	0,25
10 μ M Taqman Probe	0,15 μ M	0,15
cDNA (5x ředěná)	-	2,00
Celkové množství	-	10,00

Mastermix byl rozpipetován do jamek 96-jamkové PCR destičky pro real-time PCR po 8 μ l. Do každé jamky byly přidány 2 μ l naředěné cDNA a propipetovány, do jamky pro negativní kontrolu byly přidány 2 μ l vody. PCR destička byla vložena do cycleru a byl spuštěn program real-time PCR znázorněný v tabulce 17. Po ukončení real-time PCR byla úspěšnost reverzní transkripce vyhodnocena daty vygenerovanými přístrojem.

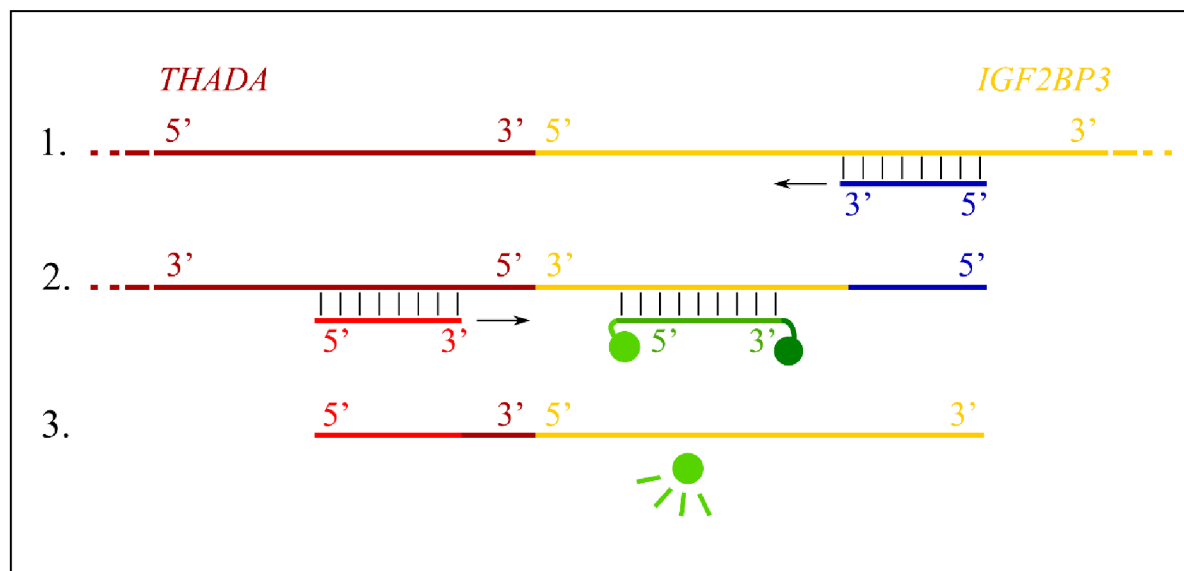
Tabulka 17 - schéma programu real-time PCR

	t [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95	20 s	1x
Denaturace	95	3 s	40x
Vazba primerů a sondy a syntéza DNA	60	30 s	
Chlazení	37	∞	

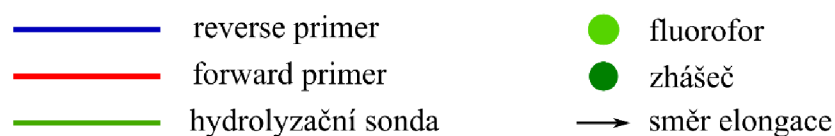
3.7.2 Navržení primerů

Při navrhování primerů byl brán do úvahy mechanismus metody znázorněný na obrázku 2.

Obrázek 2 – schéma real-time PCR pro zjištění *THADA* fúzních genů



1. – fúzní gen *THADA/IGF2BP3*; 2. – produkt po prvním cyklu; 3. – konečný produkt s uvolněným fluoroforem



Pro zjištění *THADA* fúzních genů metodou real-time PCR byly navrženy forward primery pro exony 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 34 a 36 *THADA* genu, reverse primer pro exon 4 genu *IGF2BP3* a hydrolyzační sonda zasahující do exonů 3 a 4 *IGF2BP3*. Vše bylo navrženo pomocí programu Primer3Plus⁹ (Untergasser *et al.*, 2012) a byly při tom zohledněny tyto parametry:

- Forward primer musí být komplementární k 3' oblasti genu *THADA*, hydrolyzační sonda a reverse primer k 5' oblasti genu *IGF2BP3*, přičemž hydrolyzační sonda musí ležet mezi oběma primery (obrázek 2).
- Délka primerů by měla dosahovat délky 18-22 b, délka hydrolyzační sondy délky 18-30 b.
- Procentuální zastoupení GC párů v dimeru templát-primer/ hydrolyzační sonda by mělo být v rozsahu 30-80 %.

⁹ <https://www.primer3plus.com/index.html>

- Teplota nasedání forward a reverse primerů na templát by se navzájem neměla lišit o více než 1 °C.
- Teplota nasedání hydrolyzační sondy na templát by měla být o 8-10 °C vyšší než teplota nasedání primerů.
- Vzdálenost mezi hydrolyzační sondou a primery by měla být min. 5 b.

Navržené primery a sonda byly objednány od firmy Generi Biotech.

3.7.3 Real-time PCR

Přístroje:

Light Cycler Roche 480

Reagencie:

Injekční sterilní voda, TaqMan Fast Advanced Master Mix 2x, primery pro *THADA* a *IGF2BP3*: 9 x 10 µM Primer Forward, 10 µM Primer Reverse, 10 µM Taqman Probe, cDNA

Postup:

Do nové 1,5ml zkumavky byl připraven primermix – od každého primeru 20 µl. Do 1,5ml zkumavky byl připraven mastermix pro příslušný počet vzorků včetně 3 pozitivních a negativní kontroly podle tabulky 18, směs byla promíchána na vortexu.

Tabulka 18 - Množství reagentů pro mastermix na real-time PCR pro 1 vzorek

	Finální koncentrace	Objem [µl]
H ₂ O	-	0,35
TaqMan Fast Advanced Master Mix 2x	1x	5,00
Primer mix	0,2510 µM	2,50
10 µM Taqman Probe	0,15 µM	0,15
cDNA (5x ředěná)	-	2,00
Celkové množství		10,00

Mastermix byl rozpipetován do jamek PCR destičky pro real-time PCR – 8 µl do každé jamky. Do každé jamky pro vzorky a pozitivní kontroly byly přidány 2 µl naředěné cDNA a

¹⁰ Pro jednotlivé primery

propipetovány, do jamky pro negativní kontrolu byly přidány 2 µl vody. PCR destička byla vložena do cycleru a byl spuštěn program real-time PCR znázorněný v Mastermix byl rozpipetován do jamek 96-jamkové PCR destičky pro real-time PCR po 8 µl. Do každé jamky byly přidány 2 µl naředěné cDNA a propipetovány, do jamky pro negativní kontrolu byly přidány 2 µl vody. PCR destička byla vložena do cycleru a byl spuštěn program real-time PCR znázorněný v tabulce 17. Po ukončení real-time PCR byla přítomnost fúzních genů *THADA/IGF2BP3* vyhodnocena pomocí dat vygenerovaných přístrojem.

3.8 Vyhodnocení dat

Sekvenační data byla vyhodnocena pomocí programu IGV (Integrative Genomics Viewer)¹¹ (Thorvaldsdóttir, Robinson and Mesirov, 2013) s referenčním genomem hg19. Pro každý exon byla stanovena referenční souřadnice, na které se u každého vzorku kontroloval počet čtení (Total count), aby bylo ověřeno, že sekvenace proběhla úspěšně a data mají vypovídající hodnotu. Sledovány byly nukleotidy lišící se od referenčního genomu ve více než 2 % čtení. Tato místa byla porovnána také s ostatními vzorky v dané sérii a s přihlédnutím ke kvalitě sekvenačních dat a počtem čtení na referenční souřadnici bylo posouzeno, zda se skutečně jedná o mutaci nebo jen přirozenou variabilitu, případně nedostatečnou kvalitu dat. Pro každou sérii byl kontrolován počet čtení na referenčních souřadnicích také pro negativní kontrolu.

Pro zjištění charakteristik a významu detekovaných variant byla použita platforma Varsome¹² (Kopanos *et al.*, 2019)

¹¹ <https://igv.org/>

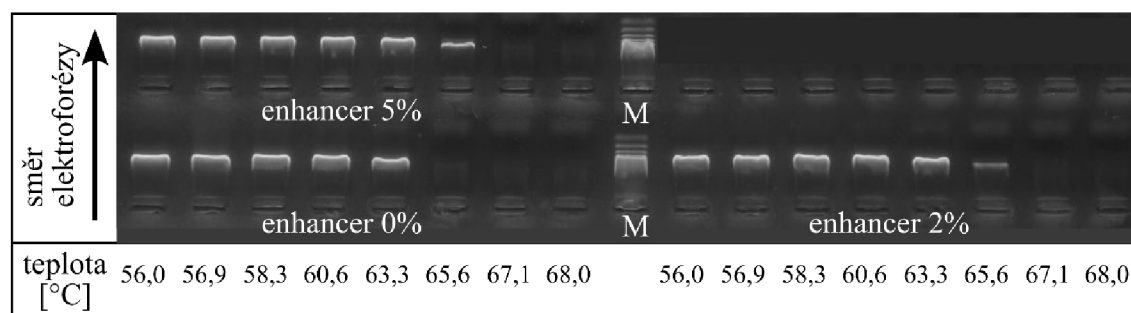
¹² <https://varsome.com/>

4 Výsledky

4.1 Optimalizace PCR

Optimalizační PCR byla provedena pro 21. exon genu *PIK3CA*, vyhodnocení proběhlo dle následné elektroforézy PCR produktů znázorněné na obrázku 3. Čím výraznější je pruh v gelu, tím úspěšnější byla PCR. Amplifikace byla úspěšnější při nižších teplotách pro nasedání primerů, při teplotách 67,1 a 68,0 °C nedošlo k amplifikaci vůbec při žádné z testovaných koncentracích enhanceru. Při vyšších teplotách byla úspěšnost ovlivněna koncentrací enhanceru. Úspěšnost PCR reakce byla při teplotách 56,0-60,6 °C srovnatelná pro všechny vzorky se všemi testovanými koncentracemi enhanceru. Pro dosažení optimálního výsledku tedy lze pro 21. exon *PIK3CA* používat program PCR s teplotou vazby primerů 57 °C bez přidání enhanceru. Optimální PCR 21. exonu *PIK3CA* má stejné parametry jako jsou použity pro PCR 10. exonu *PIK3CA*, je tedy možné při použití těchto parametrů provádět amplifikaci obou exonů pomocí jedné multiplexové reakce.

Obrázek 3 - optimalizace PCR pro 21. exon *PIK3CA* při rozdílných teplotách vazby primerů a koncentraci enhanceru

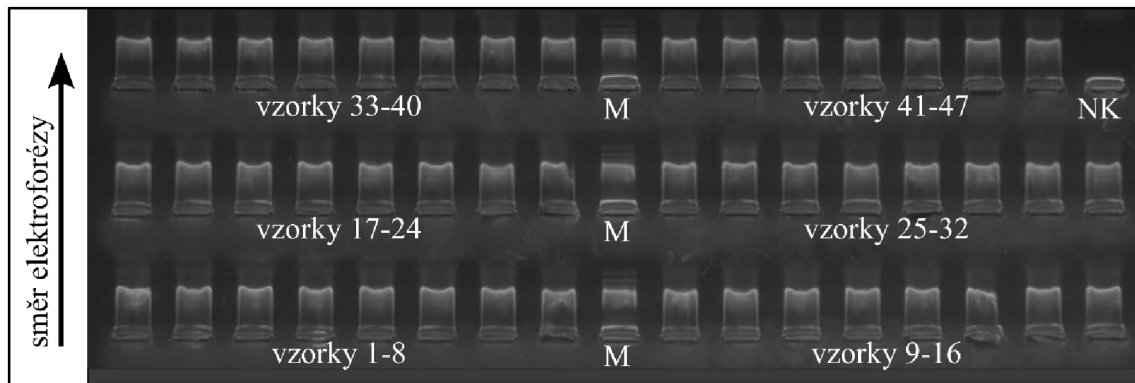


M - DNA marker

4.2 PCR a kontrolní gelová elektroforéza

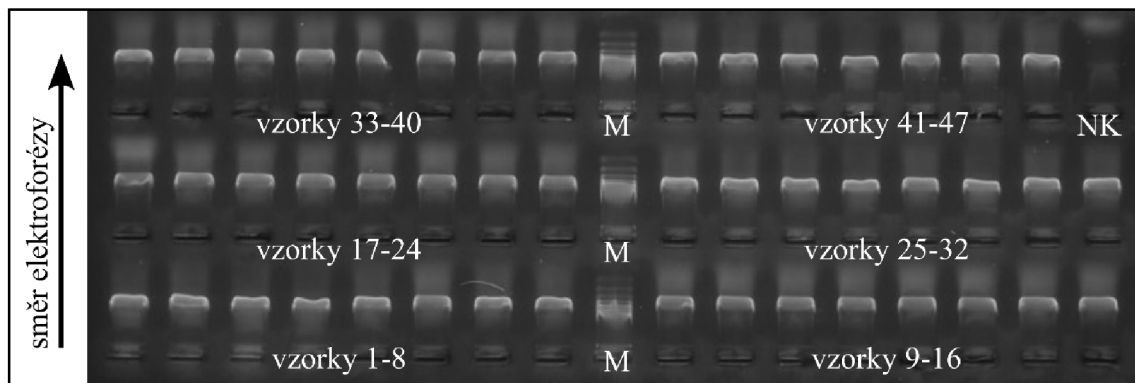
Kontrolní gelová elektroforéza byla provedena pro PCR produkty všech amplifikovaných vzorků v sériích po 48 včetně negativní kontroly. PCR byla považována za úspěšnou, pokud se pro daný vzorek při elektroforéze v gelu prokázal výrazný pruh v přibližné délce 400-500 bp a zároveň nebyl pozorovaný žádný pruh pro negativní kontrolu dané série. Úspěšná PCR byla elektroforézou prokázána pro 279/279 vzorků *TSHR*, 271/272 vzorků 10. exonu *PIK3CA*, 227/230 vzorků 21. exonu *PIK3CA*, 276/276 vzorků *EIF1AX* a 279/279 vzorků *EZH1*. Fotky kontrolních elektroforéz vždy jedné série pro každý gen jsou na obrázcích 4-7.

Obrázek 4 - kontrolní gelová elektroforéza genu *TSHR*



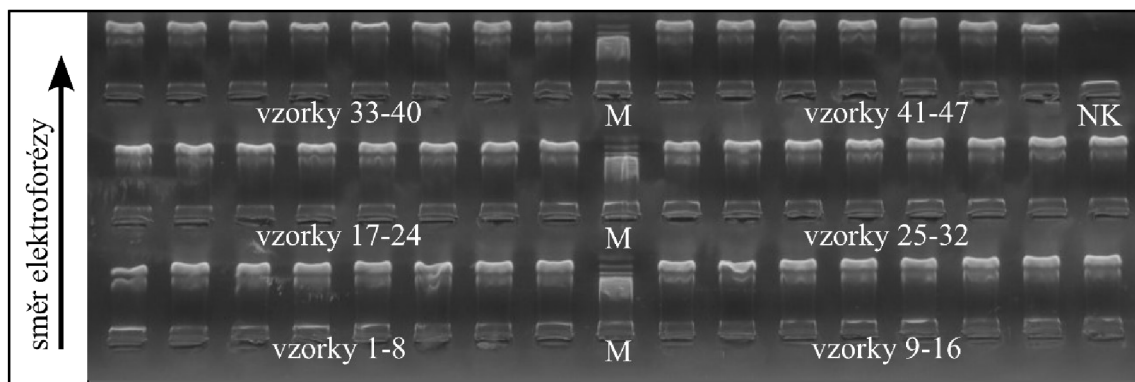
NK - negativní kontrola, M - DNA marker

Obrázek 5 - kontrolní gelová elektroforéza genu *PIK3CA*



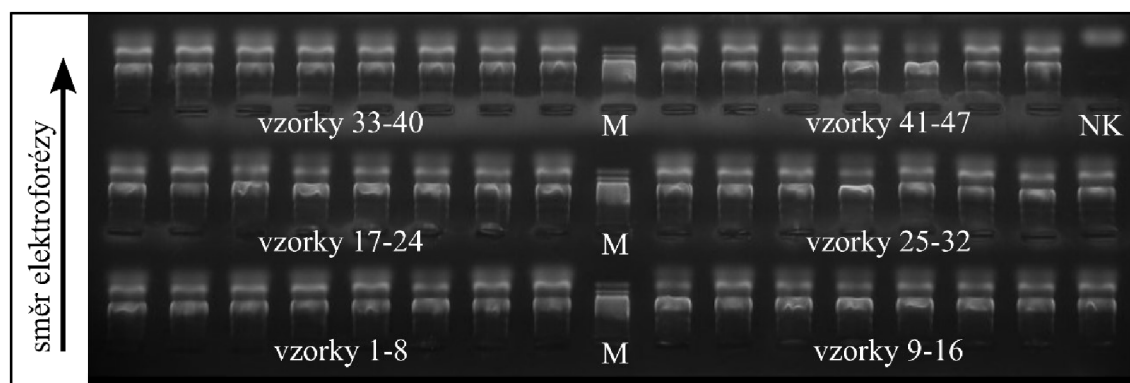
NK - negativní kontrola, M - DNA marker

Obrázek 6 - kontrolní gelová elektroforéza genu *EIF1AX*



NK - negativní kontrola, M - DNA marker

Obrázek 7 - kontrolní gelová elektroforéza genu *EZH1*



NK - negativní kontrola, M - DNA marker

4.3 Sekvence

Úspěšnost sekvenace byla hodnocena počtem čtení DNA v referenční souřadnici zvláště pro každý exon. Hranice pro úspěšnou sekvenaci byla stanovena na 500 čtení v místě referenční souřadnice. Osekvenováno bylo celkem 279 vzorků pro gen *TSHR*, 272 vzorků 10. exonu *PIK3CA*, 230 vzorků 21. exonu *PIK3CA*, 276 vzorků pro sledované exony genu *EIF1AX* a 279 vzorků pro exony genu *EZH1*. Z celkového počtu byl vyřazen 1 vzorek pro 10. exonu *PIK3CA* a 3 vzorky pro 21. exonu *PIK3CA* pro nízký počet čtení v referenční souřadnici. Počty úspěšně osekvenovaných vzorků pro jednotlivé geny rozdělené podle typu nádorů jsou uvedeny v tabulce 19.

Tabulka 19 - počty úspěšně osekvenovaných vzorků pro jednotlivé geny podle typu nádorů

		<i>TSHR</i>	<i>PIK3CA</i> exon 10	<i>PIK3CA</i> exon 21	<i>EIF1AX</i>	<i>EZH1</i>
Změny ve štítné žláze	CLT	10	4	1	9	7
	Toxická struma	4	-	-	6	4
Změny ve štítné žláze celkem		14	4	1	15	11
Benigní	FND	44	21	8	44	44
	FTA	13	6	5	13	15
	OA	4	2	1	9	8
Benigní celkem		61	29	14	66	67
Nízkorizikové	NIFTP	4	13	5	5	7
	T-UMP	9	18	6	10	9
	HTT	2	-	-	2	2
Nízkorizikové celkem		15	31	11	17	18
Maligní	PTC	158	168	163	145	140
	FTC	9	6	5	9	9
	OCA	10	7	7	10	14
	PDTC	-	8	8	1	1
	ATC	3	14	14	2	6
	MTC	9	4	4	11	13
Maligní celkem		189	207	201	178	183
Počet úspěšně osekvenovaných vzorků		279	271	227	276	279

ATC – anaplastický karcinom, CLT – chronická lymfocytární tyreoidita, FND – folikulární nodózní onemocnění štítné žlázy, FTA – folikulární adenom, FTC – folikulární karcinom, HTT – hyalinizující trabekulární tumor, MTC – medulární karcinom, NIFTP – neinvazivní folikulární tumor s papilárními jadernými znaky, OA – onkocytární adenom, OCA – onkocytární karcinom, PDTC – níže diferencovaný karcinom, PTC – papilární karcinom, T-UMP – tumor nejistého maligního potenciálu

4.4 Vyhodnocení detekovaných mutací

4.4.1 *TSHR*

V 10. exonu genu *TSHR* byla nalezena mutace celkem v 21 vzorcích (7,5%), přičemž v jednom vzorku byly nalezeny 2 různé mutace. Bylo nalezeno 6 různých mutací. Synonymní mutace A459A ve 12 vzorcích samostatně a v 1 vzorku společně s mutací F631L, mutace M453T byla nalezena ve 3 vzorcích, mutace D633Y a L669L každá ve 2 vzorcích a mutace D619G v 1

vzorku. Četnost jednotlivých mutací podle typů nádorů a maligního potenciálu je uvedena v tabulce 20.

Tabulka 20 - rozdělení nalezených mutací v genu *TSHR* podle typu nádoru a maligního potenciálu

Mutace	Maligní potenciál nádoru	Typ nádoru	Zastoupení mutované alely	Pohlaví	Věk	
A459A + F631L	benigní	FTA	A459A 53 % F631L 24 %	Ž	79	
A459A	benigní	FTA	61 %	M	43	
		nízkorizikové	T-UMP	49 %	Ž	60
			NIFTP	49 %	Ž	33
	maligní	PTC	48 %	Ž	52	
			49 %	Ž	56	
			49 %	Ž	31	
			49 %	Ž	70	
			51 %	Ž	38	
			51 %	Ž	63	
			53 %	Ž	19	
			ATC	32 %	M	33
MTC	51 %	Ž	42			
M453T	benigní	FTA	26 %	Ž	15	
		FND	32 %	M	54	
	maligní	FTC	44 %	Ž	28	
L669L	maligní	PTC	46 %	M	21	
		MTC	46 %	Ž	69	
D633Y	benigní	FND	9 %	Ž	14	
		FND	30 %	Ž	15	
D619G	benigní	FND	41 %	M	63	

ATC – anaplastický karcinom, FND – folikulární nodózní onemocnění štítné žlázy, FTA – folikulární adenom, FTC – folikulární karcinom, MTC – medulární karcinom, NIFTP – neinvazivní folikulární tumor s papilárními jadernými znaky, PTC – papilární karcinom, T-UMP – tumor nejistého maligního potenciálu, Ž – žena, M – muž

4.4.2 *PIK3CA*

Ve vzorcích pro gen *PIK3CA* bylo nalezeno celkem 9 mutací, v 10. exonu 4 (1,5 %) a 5 v exonu 21 (2,2 %). Z celkového počtu byly rozlišeny 3 různé mutace – E542K v exonu 10, v exonu 21

H1047R a T1025T. Počty jednotlivých mutací rozdělených podle maligního potenciálu a typu nádoru jsou uvedeny v tabulce 21.

Tabulka 21 - rozdělení nalezených mutací v genu PIK3CA podle typu nádoru a maligního potenciálu

Mutace	Maligní potenciál nádoru	Typ nádoru	Zastoupení mutované alely	Pohlaví	Věk
E542K ex. 10	maligní	PTC	8 %	Ž	60
			19 %	M	61
			25 %	Ž	70
H1047R ex. 21	maligní	ATC	8 %	Ž	31
		PTC	25 %	Ž	31
		ATC	40 %	Ž	66
T1025T ex. 21	maligní	PTC	88 %	Ž	76
			45 %	M	47
			49 %	Ž	31

ATC – anaplastický karcinom, PDTC – nízcce diferencovaný karcinom, PTC – papilární karcinom, Ž – žena, M – muž

4.4.3 *EIF1AX*

V genu *EIF1AX* byly pozorovány mutace v 7 vzorcích (2,5 %). Upstream od 1. exonu byla nalezena mutace c.-4C>T u 3 vzorků, v exonu 2 mutace G8E v 1 vzorku, v exonu 5 synonymní mutace D98D také v jednom vzorku a v 6. exonu 2 rozdílné A113_splice mutace. Počty zatopení jednotlivých mutací jsou uvedeny v tabulce 22.

Tabulka 22 - rozdělení nalezených mutací v genu *EIF1AX* podle typu nádoru a maligního potenciálu

Mutace	Maligní potenciál nádoru	Typ nádoru	Zastoupení mutované alely	Pohlaví	Věk
c.-4C>T exon 1	maligní	PTC	43 %	Ž	21
			51 %	Ž	18
		FTC	43 %	Ž	37
c.338-1G>T (A113_splice) exon 6	benigní	OA	36 %	Ž	64
c.338-2A>T (A113_splice) exon 6	maligní	PTC	37 %	Ž	70
D98D exon 5	maligní	PTC	38 %	Ž	50
G8E exon 2	benigní	FND	16 %	Ž	57

FND – folikulární nodózní onemocnění štítné žlázy, FTC – folikulární karcinom, OA – onkocytární adenom, PTC – papilární karcinom, Ž – žena

4.4.4 *EZH1*

V genu *EZH1* byla nalezena pouze mutace Q571R ve 2 vzorcích (0,7 %), u obou vzorků šlo o benigní uzly pacienta mužského pohlaví (tabulka 23).

Tabulka 23 - rozdělení nalezených mutací v genu *EZH1* podle typu nádoru a maligního potenciálu

Mutace	Maligní potenciál nádoru	Typ nádoru	Zastoupení mutované alely	Pohlaví	Věk
Q571R exon 16	benigní	OA	35 %	M	51
		FND	37 %	M	63

FND – folikulární nodózní onemocnění štítné žlázy, OA – onkocytární adenom M – muž

4.5 Návrh primerů a hydrolyzační sondy pro *THADA* fúzní geny

Sekvence navržených primerů a hydrolyzační sondy jsou uvedeny v tabulce 24. Funkčnost navržených primerů se potvrdila při real-time PCR tím, že pro pozitivní kontroly vznikl fluorescenční signál a zároveň pro negativní kontrolu signál přítomný nebyl.

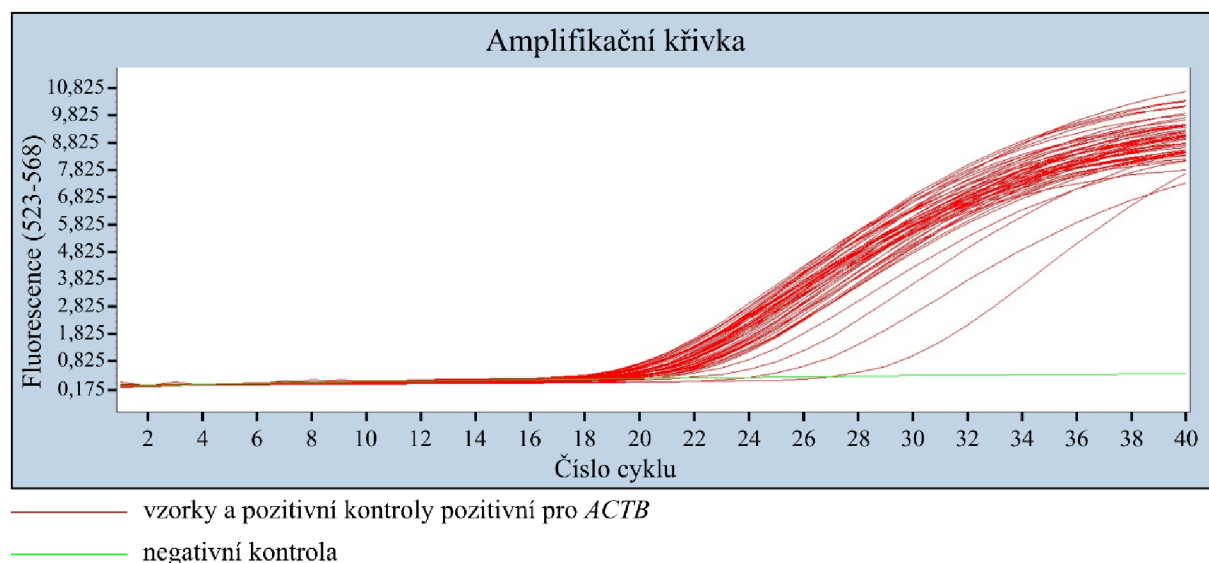
Tabulka 24 - Sekvence navržených primerů a hydrolyzační sondy

	exon	Sekvence oligonukleotidu
Forward primer	<i>THADA</i> 25	TTTTACATCACCGGTCTGG
Forward primer	<i>THADA</i> 26	GGACCTTTTGTTCCCTTCA
Forward primer	<i>THADA</i> 27	CAGTGTTTCCGGCAAAAC
Forward primer	<i>THADA</i> 28	TTGTACCAAAGCCAAACTCT
Forward primer	<i>THADA</i> 29	AGATCTGCAAAGGACAACC
Forward primer	<i>THADA</i> 30	AAATCACCCAGAATGCTTCT
Forward primer	<i>THADA</i> 31	GGAGTTCTTGATCTGGACG
Forward primer	<i>THADA</i> 34	ACTGCCATGTCACAAGAAA
Forward primer	<i>THADA</i> 36	GGCAGTTAACTCTTCCAAGA
Reverse primer	<i>IGF2BP3</i> 4	CCACTCCATACTGGACTAGT
Hydrolyzační sonda	<i>IGF2BP3</i> 3+4	CCCGCCTCATTTACAGTGGGAGGTGC

4.6 Kontrolní real-time PCR

Úspěšnost reverzní transkripce byla ověřena kontrolní real-time PCR s použitím primerů a sondy pro gen *ACTB* (forward primer pro 3. exon, reverse primer pro 4. exon). Jedná se o gen kódující β -aktin, tzv. housekeeping protein, takže by sekvence *ACTB* měla být přítomna v každém vzorku po úspěšné reverzní transkripci. Pro vyhodnocení byla použita metoda absolutní kvantifikace fluorescenčního signálu. Hodnoty C_p (cyklus prahu) byly určeny z maxima 2. derivace amplifikační křivky. Jako hraniční hodnota úspěšné amplifikace byl určen $C_p = 35$ (z celkového počtu cyklů 40). Kontrolní real-time PCR byla ověřena úspěšná reverzní transkripce pro 133 vzorků s hodnotami C_p do 35; u 3 vzorků nedošlo ke vzniku fluorescenčního signálu, byly proto z analýzy vyřazeny. Amplifikační křivka kontrolní real-time PCR pro jednu sérii vzorků včetně 3 pozitivních kontrol pro *THADA* fúzní geny a 1 negativní kontroly je zobrazena na obrázku 8.

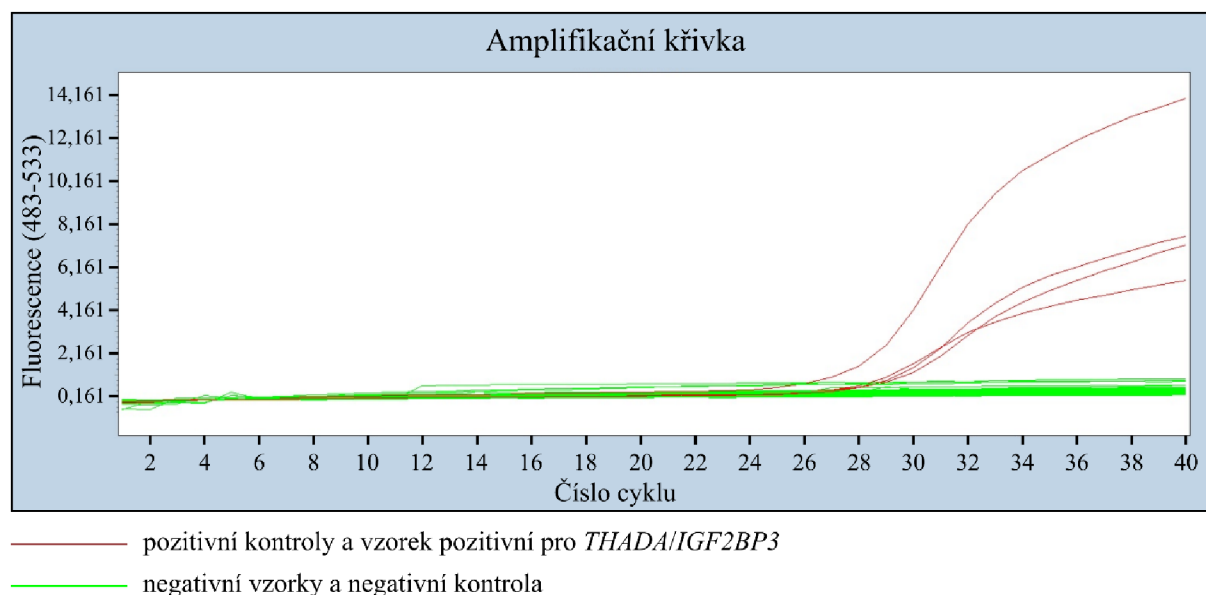
Obrázek 8 - Amplifikační křivka kontrolní real-time PCR pro ACTB



4.7 Real-time PCR

Metoda real-time PCR byla provedena pro 133 úspěšně naamplifikovaných vzorků nádorů s benigní histologií a navíc pro 41 vzorků maligních a nízkorizikových nádorů amplifikovaných již dříve pracovníky Endokrinologického ústavu. Jako pozitivní kontroly pro real-time PCR byly použity 3 PTC vzorky pozitivní pro *THADA/IGF2BP3* fúze z dřívějších analýz prováděných v Endokrinologického ústavu pomocí FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung Kitu (Invitae). U cDNA pozitivních kontrol společně s vyšetřovanými vzorky byla provedena real-time PCR. Pro vyhodnocení byla stejně jako pro kontrolní real-time PCR použita metoda absolutní kvantifikace fluorescenčního signálu, s C_p hodnotami určenými pomocí maxima 2. derivace amplifikační křivky. Hraniční hodnotou byl stanoven $C_p = 35$ (z celkového počtu cyklů 40). Amplifikační křivka jedné série real-time PCR je zobrazena na obrázku 9.

Obrázek 9 - Amplifikační křivka real-time PCR pro THADA/IGF2BP3 fúzní gen



Fúzní gen byl detekován u 3 vzorků z celkového počtu 174 (1,7 %), z toho jednou v benigním nádoru FND a 2x v nízkorizikovém NIFTP. Všichni pacienti s detekovanou fúzí byly ženy (tabulka 25).

Tabulka 25 - Rozdělení detekovaných THADA/IGF2BP3 podle maligního potenciálu a typu nádoru vzorku

Maligní potenciál nádoru	Typ nádoru	Pohlaví	Věk
benigní	FND	Ž	59
nízkorizikové	NIFTP	Ž	28
		Ž	50

FND – folikulární nodózní onemocnění štítné žlázy, NIFTP – neinvazivní folikulární tumor s papilárními jadernými znaky, Ž – žena

5 Diskuze

Amplifikace úseků DNA proběhla u většiny vzorků úspěšně, což bylo prokázáno kontrolní PCR a počtem čtení nad 500 na referenční souřadnici při sekvenaci. Výjimkou byly 3 vzorky u genu *PIK3CA* (1 pro exon 10 a 3 pro exon 21). Důvodem je pravděpodobně použití velmi starých vyizolovaných DNA, které již postrádaly potřebnou kvalitu.

Reverzní transkripce byla úspěšná pro 133/136 vzorků, u 3 vzorků k přepisu na cDNA nedošlo. Mohlo to být způsobeno použitím starých vzorků RNA, které již neměly dostatečnou kvalitu.

Fúze *THADA/IGF2BP3* byly již dříve pozorovány mezi exony 28, 29, 30, 31, 35 a 36 *THADA* genu a 2. či 3. exonem genu *IGF2BP3* (Panebianco *et al.*, 2017, Liang *et al.*, 2018). V této práci byly navrženy primery pro zachycení co nejvyššího spektra *THADA* fúzí, byly proto použity forward primery pro exony 25, 26, 27, 28, 29, 30, 34 a 36 genu *THADA* a reverse primer pro exon 3 *IGF2BP3*, který by měl zachytit fúze s 2. i 3. exonem. Komerčně dostupný FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung používá *THADA* exony 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 36, 37.

TSHR

Mutace v genu *TSHR* byly v této práci nalezeny v benigních (7/21, 33 %), nízkorizikových (2/21, 10 %) i v maligních (12/21, 57 %) novotvarech. Bylo nalezeno spektrum 7 mutací, přičemž nejčastější mutací byla A459A (13/22, 59 %) a po ní M453T (3/22, 14 %). Současné poznatky ukazují, že existuje velké spektrum různých mutací *TSHR* (Andrianus *et al.*, 2023), ale jejich konkrétní význam v tumorigenezi zatím nebyl zcela objasněn. Podle Varsome mají mutace A459A a L669L pravděpodobně benigní charakter, mutace F631L a D633Y spíše patogenní a mutace M453T a D619G patogenní charakter (Kopanos *et al.*, 2019). Landa *et al.* (2016) zkoumali výskyt mutací v maligních nádorech a našli *TSHR* mutace v 2 % (2/84) PDTC a 6 % (2/33) ATC. V jejich studii se mutace *TSHR* většinou vyskytovali společně s dalšími významnými mutacemi. Pozorovali kombinace *TSHR-NRAS-EIF1AX-TP53*, *TSHR-TERT* a *TSHR-BRAF-TERT*, tyto kombinace jsou pravděpodobně spojeny s agresivnějším charakterem. Mutace *TSHR* byly kromě toho pozorovány u hyperfunkčních a toxických uzlů a měly zastoupení také v dětské populaci, s velkou převahou pro benigní uzly (Eszlinger *et al.*, 2014, Führer *et al.*, 1997).

Andrianus *et al.* (2023) ve své studii vyšetřovali vzorky předoperačních biopsií tenkou jehlou s nejasnou cytologií (Bethesda III a IV). Zaznamenali výskyt mutací *TSHR* s frekvencí 1,6 %, přičemž nejčastější mutace byla M453T. Vzhledem k rozsáhlému souboru 4074 vzorků a

velkému spektru zjištěných mutací je zajímavé, že nejčastěji detekovanou mutací v této práci (A459A) Andrianus *et al.* (2023) vůbec nepozorovali. Mutace *TSHR* v předoperačních vzorcích pozorovali také Mon *et al.* (2018) s frekvencí 4,5 % a taktéž mutaci A459A nezaznamenali. Pro vyšetření tohoto rozdílu by bylo zapotřebí dalšího výzkumu na předoperačních vzorcích i nádorových tkáních. Poznatky týkající se mutací *TSHR* jsou v současné době poměrně omezené a pro lepší pochopení molekulárních souvislostí a klinického významu mutací je zapotřebí dalšího výzkumu.

PIK3CA

Všechny mutace nalezené v genu *PIK3CA* byly přítomné jen u nádorů s maligní histologií, a to v PTC, ATC a PDTC. Výsledky této práce jsou v souladu s dalšími studii, kde jsou mutace v genu *PIK3CA* pozorovány také u maligních nádorů a jsou spojeny s agresivnějšími charakteristikami a horší prognózou, často v přítomnosti *RAS* mutací (Landa *et al.*, 2016, Pozdeyev *et al.*, 2018, García-Rostán *et al.*, 2005). Pozdeyev *et al.* (2018) sledovali rozdíl ve výskytu *PIK3CA* mutací mezi diferencovanými karcinomy (PTC, FTC, OCA) a ATC. Mezi diferencovanými karcinomy našli mutaci pouze v 0,9 % případech, zatímco mezi ATC v 7,1 % případů. Podobně také García-Rostán *et al.* (2005) našli mutaci v *PIK3CA* u 23 % ATC ale jen u necelých 4% dobře diferencovaných folikulárních karcinomů. Také Varsome charakterizuje mutace E542K a H1047R jako silně patogenní, jedině mutaci T1025T jako benigní (Kopanov *et al.*, 2019).

Mutace E542K byla v této práci nejčastější mutací (1,5 %), podobně jako v dalších studiích (García-Rostán *et al.*, 2005, Landa *et al.*, 2016). V nádorech se vyskytovala s nízkým zastoupením mutované alely (do 25 %), což poukazuje na pravděpodobný silný projev mutovaného proteinu. Mutace E542 byla pozorována v relativně vysokém zastoupení ve skupině ATC (7 % sledovaných ATC). Vysokou frekvenci této mutace mezi ATC pozorovali také Landa *et al.* (2016). Poznatky z jejich studie se s výsledky této práce shodují také pro výskyt druhé nejčastější mutace v této práci – H1047R, která byla zachycena u 1,3 % všech případů (3/227), s převahou v hůře diferencovaných karcinomech. Landa *et al.* (2016), ji navíc zachytili současně s *NRAS* a *TERT* mutací. Tato pozorování potvrzují patogenní charakter mutace. Mutace T1025T je mutace s velmi vzácným výskytem a její význam u nádorů štítné žlázy zatím nebyl podrobněji poznán. Její charakteristika vyžaduje další výzkum. Přítomnost mutací *PIK3CA* v nádorech štítné žlázy je v současné době málo prozkoumané téma a je jen málo studií, které by zkoumali výskyt mutací *PIK3CA* také v benigních uzlech, což může být způsobeno jejich malým výskytem v těchto typech nádorů.

EIF1AX

V nedávné studii na 621 nádorech s nejasnou cytologií byly pozorované mutace *EIF1AX* v 5 % vyšetřovaných nádorů. Z těchto mutací bylo 38,7 % u maligních nádorů a 55 % u benigních. (Elsherbini *et al.*, 2022). Bandargal *et al.* (2022) také pozorovali mutace *EIF1AX* u benigních i maligních nádorů. Nalezli mutace v *EIF1AX* v 5,5 % vyšetřovaných nádorů ve studii na 764 nádorů štítné žlázy. Z toho se u 38 % jednalo o benigní nádory, 14 % nízkorizikové a 48 % maligní. Obě studie poukazují na nejasný patogenní charakter mutací *EIF1AX*. Pravděpodobně mají mutace větší diagnostický potenciál v kontextu s dalšími mutacemi, především v kombinaci s mutacemi *RAS*, v takových případech byly *EIF1AX* mutace spojeny s malignitou až v 86% případů (Bandargal *et al.*, 2022, Elsherbini *et al.*, 2022, Krishnamoorthy *et al.*, 2019). V této práci byly mutace v *EIF1AX* detekovány s menším výskytem – jen u 2,54 % analyzovaných nádorů. Může to být způsobeno tím, že se tato práce zaměřovala spíše na benigní novotvary a jejich podíl v celkovém souboru vzorků byl větší. Mutace byly nalezeny v maligních (86 %) i benigních (14 %) nádorech, s převahou maligních. Tento rozdíl může být způsoben celkově menším souborem a nízkým záchytem mutací.

V této práci byla nejčastější mutací v *EIF1AX* mutace c.-4C>T (3/7, 42,8%). Jedná se o mutaci v nukleotidu 4b upstream před 1. aminokyselinou proteinu, tedy v oblasti Kozakové sekvence – konzervovaná sekvence důležitá pro iniciaci translace (sekvence uvedená v tabulce 26). Nejdůležitější pro úspěšnou iniciaci jsou pozice nukleotidů -3 a 4 (Kozak, 2002). Zachycená mutace se nachází vedle jedné z těchto důležitých pozic. Tato mutace zatím nebyla podrobně popsána a její role v karcinogenezi není objasněna. Změna v Kozakové sekvenci, navíc vedle jednoho ze zásadních nukleotidů, by mohla vést k nižší míře translace proteinu EIF1A, nebo k častějšímu využití případného alternativního AUG startovacího kodónu, což by vedlo k nižší koncentraci funkčního EIF1A v buňce. To by mohlo omezit celkovou proteosyntézu. Pro bližší pochopení role této mutace v karcinogenezi by bylo potřeba provést analýzu vznikajících mRNA a mutantních proteinů. Mutace c.-4C>T byla pozorována také ve studii Küsters-Vandeveld *et al.* (2016) u leptomeningeálního melanocytárního nádoru. Podle Varsome jde o benigní mutaci (Kopanos *et al.*, 2019).

Tabulka 26 - Kozakové sekvence v genu *EIF1AX*

Pozice nukleotidu			-4	-3			1	2	3	4
Kozakové Sekvence	G	C	C	A/G	C	C	A	T	G	G
<i>EIF1AX</i>	A	C	C	G	C	C	A	T	G	C
<i>EIF1AX</i> c.-4C>T	A	C	T	G	C	C	A	T	G	C

Nejčastější popsanou mutací v genu *EIF1AX* bývá A113_splice site mutace a je spojena s největším maligním potenciálem (Bandargal *et al.*, 2022, Elsherbini *et al.*, 2022), což je ve shodě s Varsome (Kopanos *et al.*, 2019). Jedná se o mutace v sestřihovém místě, která vede ke vzniku alternativně sestřiženého, kratšího proteinu, spojeného s karcinogenezí indukci proteosyntézy (mechanismus popsaný v kapitole 1.4.3.) (Krishnamoorthy *et al.*, 2019). V této práci se jednalo o 2. nejčastější mutaci (2/7, 29%) zastoupenou dvěma variantami: c.338-1G>T, c.338-2A>T. V jednom případě šlo o mutaci v benigním OA, v druhém případě v maligním PTC. Podle těchto výsledků nelze potvrdit maligní potenciál této mutace, pro přesnější analýzu by bylo potřeba vyšetřit větší soubor nádorů.

Ve studiích byly z dalších mutací *EIF1AX* pozorovány převážně mutace na N konci proteinu jako G8E, G9R, G9V, G15D, R13H (Bandargal *et al.*, 2022, Krishnamoorthy *et al.*, 2019). Z těchto mutací v této práci byla pozorována pouze mutace G8E. Mutace má podle Varsome nejasné riziko patogeneze. Mutace v N oblasti proteinu mají podobný efekt jako A113_splice – zvýšení celkové proteosyntézy, zejména ATF4 (Krishnamoorthy *et al.*, 2019).

Poslední nalezenou mutací v této práci je synonymní D98D, jedná se o vzácnou mutaci s malým výskytem, podle Varsome se jedná o benigní mutaci (Kopanos *et al.*, 2019).

EZH1

U genu *EZH1* byly v této práci nalezeny pouze 2 mutace z celkového počtu nádorů 279, což odpovídá 0,7 %. Obě tyto mutace byly nalezeny v benigních uzlech, což je v souladu s dalšími studiemi. Jedna mutace byla nalezena v OA se zastoupením v 13 % všech sledovaných OA (1/8), druhá u FND. Je zajímavé, že obě tyto mutace byly nalezeny u muže, ačkoli nádorové onemocnění štítné žlázy se vyskytuje častěji u žen. Nalezenou mutací je Q571R – mutace v 16. exonu, nejčastější mutace pozorovaná v genu *EZH1*. Podle Varsome jde o variantu s pravděpodobně patogenním charakterem (Kopanos *et al.*, 2019).

Tuto mutaci vyšetřovali také Xu *et al.* (2023) a pozorovali ji jako vysoce specifickou pro benigní uzly. Vyšetřili soubor 583 nádorových tkání (252 s benigních histologií a s 331 maligní), kde zachytili 7 mutací (2,8 %) Q571R, všechny u benigních uzlů. Mezi karcinomy mutace v *EZH1* přítomné nebyly. Navíc vyšetřili také 161 předoperačních vzorků biopsií tenkou jehlou a objevili další 2 mutace (1,2 %) – jednu ve vzorku s kategorií Bethesda II s benigní predikcí a druhou s nejasnou cytologií klasifikovanou jako Bethesda IV. Korelaci s výskytem v benigních uzlech pozorovali také Ye *et al.* (2017), kteří našli *EZH1* mutace u 11 % benigních uzlů (v této

práci 1,5 %), a Jung *et al.* (2018), kteří navíc zachytili mutaci také v minimálně invazivním OCA. Což poukazuje na to, že s nízkou frekvencí se mutace může vyskytnout také u maligních lézí. Velkou část zachycených mutací (85 %) našli podobně jako v této práci u onkocytárních adenomů, mezi kterými pozorovali výskyt mutace 20 % (11/54).

Kvůli nízkému zachytu mutací v *EZH1* by bylo potřeba provést ještě další výzkum, ze současných výsledků včetně této práce ale lze vyvozovat vysokou specifitu těchto mutací pro benigní uzly a bylo by možné tento gen využívat jako silný genetický marker.

THADA/IGF2BP3

Ve studii Tali *et al.* (2023) detekovali 7 fúzí *THADA/IGF2BP3* z celkového počtu 697 nádorů (1 %) s preoperační cytologií v kategoriích Bethesda III, IV, V a VI. Z těchto mutací bylo 5/7 (71 %) nalezeno u maligních PTC, zbylé 2/7 (29 %) byly diagnostikovány u nízkorizikových NIFTP. Všechny 7 nádorů bylo předoperačně zařazeno do kategorie Bethesda III a IV. Morariu *et al.* (2021) ve své studii pozorovali *THADA* fúzní geny s podobně nízkým výskytem - 2 %. Popsali celkem 30 nádorů s *THADA* fúzními geny, které měli většinou nejasnou cytologií (min 73 %). Z 22 případů, které byly odoperovány, mělo 7 (32 %) maligní histologii PTC, což je méně, než ve studii Tali *et al.*, (2023), může to ale být způsobeno větším pozorovaným souborem. Dále bylo 10 (45 %) vzorků diagnostikováno jako nízkorizikové NIFTP a 5 (23 %) jako benigní FTA, všechny s indolentním charakterem. Ve většině případů z obou zmíněných studií se jednalo o nádory s pouzdrem s nízkým rizikem agresivního chování. V žádném z popsaných případů nebyly přítomny žádné další známé mutace. Podobných výsledků bylo dosaženo také ve studii Gubbiotti, Andrianus and Baloch (2023) na souboru 31 odoperovaných vzorků s *THADA/IGF2BP3*, kde bylo 61 % nalezených mutací u maligních nádorů a 39 % benigních nebo nízkorizikových.

Podle těchto poznatků je *THADA/IGF2BP3* fúze méně častá genetická mutace, kterou lze očekávat spíše u maligních a nízkorizikových nádorů spojených s indikací k operaci. Podle toho by *THADA/IGF2BP3* mohl mít významnou diagnostickou hodnotu. Výsledky z této práce odpovídají poznatkům ze zmíněných studií. Podobně jako ve zmíněných studiích byly *THADA/IGF2BP3* fúze detekovány ve větší míře u nádorů NIFTP, bylo ale také prokázáno, že se tato mutace může vyskytovat i u benigních uzlů. Mezi vyšetřovanými benigními uzly měl vzorek s mutací zastoupení 0,8 %. Podobně jako ve zmíněných studiích žádný vzorek pozitivní pro *THADA/IGF2BP3* neměl pozorované jiné mutace. Vyšetřovaný soubor byl ale nedostatečně velký pro vyvození přesnějších specifikací. V současných studiích se vyskytuje zpravidla jen

málo zachycených mutací a pro zjištění přesnějšího diagnostického významu je zapotřebí další studium na rozsáhlejších souborech.

6 Závěr

V této práci byl sledován výskyt vybraných vzácných genových variant u vzorků nádorů štítných žláz. Za účelem pozorování bodových mutací byly sekvenovány vybrané exony genů *TSHR*, *PIK3CA*, *EIF1AX* a *EZH1* u 14 typů nádorů štítné žlázy nebo změn ve štítné žláze se zastoupením benigních, nízkorizikových i maligních uzlů. Pro zkoumání genové přestavby *THADA/IGF2BP3* bylo využito analýzy real-time PCR u vzorků převážně z benigních uzlů a nízkorizikových neoplázií. Detekované varianty genů byly zhodnoceny a porovnány s předchozími studiemi.

Pro gen *TSHR* bylo nalezeno velké spektrum variant se zastoupením v benigních, nízkorizikových i maligních nádorech, jejich role zatím nebyla plně objasněna. *PIK3CA* varianty byly pozorovány jen u maligních nádorů a jsou spojeny s agresivními charakteristikami špatně diferencovaných karcinomů. Varianty *EIF1AX* byly v této práci pozorované převážně u maligních nádorů, vyskytují se ale také u benigních, podle dalších poznatků jejich diagnostický význam stoupá ve spojení s variantami v genech *RAS*. *EZH1* varianty byly pozorovány s nejnižší frekvencí, a to pouze u benigních uzlů. *THADA/IGF2BP3* fúze byla kromě častěji pozorovaného výskytu u nízkorizikových nádorů nalezena také u vzorku s benigní histologií. Výsledky byly v mnoha ohledech shledány v souladu s dostupnou literaturou.

Varianty v genech *TSHR*, *PIK3CA*, *EIF1AX*, *EZH1* a genová přestavba *THADA/IGF2BP3* jsou vzácné genetické mutace s nízkým pozorovaným výskytem. Současné poznatky i výsledky z této práce ale ukazují, že mají velký potenciál při využití v molekulární diagnostice jako genetické markery a pro důkladné porozumění jejich významu by bylo potřeba především rozšířit sledované soubory nádorových tkání i vzorků biopsií tenkou jehlou se zastoupením benigních, nízkorizikových i maligních nádorů a další výzkum zaměřit na popsání jednotlivých variant a jejich charakteru vzhledem k typu nádoru.

7 Seznam použité literatury

- Ali, S. Z. *et al.* (2023) 'The 2023 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology', *Thyroid*, 33(9). doi: 10.1089/thy.2023.0141.
- Andrianus, S. *et al.* (2023) 'Unraveling the significance of TSHR mutations in indeterminate thyroid cytology specimens', *Diagnostic Cytopathology*, 51(7). doi: 10.1002/dc.25138.
- Bandargal, S. *et al.* (2022) 'Prognostic Indicators of EIF1AX-Mutated Thyroid Tumor Malignancy and Cancer Aggressiveness', *Cancers*, 14(24). doi: 10.3390/cancers14246097.
- Barletta, J. A., Nosé, V. and Sadow, P. M. (2021) 'Genomics and Epigenomics of Medullary Thyroid Carcinoma: From Sporadic Disease to Familial Manifestations', *Endocrine Pathology*. doi: 10.1007/s12022-021-09664-3.
- Bateman, A. *et al.* (2023) 'UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023', *Nucleic Acids Research*, 51(D1). doi: 10.1093/nar/gkac1052.
- Benvenga, S. *et al.* (2018) 'Thyroid gland: Anatomy and physiology', in *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.96022-7.
- Borowczyk, M. *et al.* (2019) 'Differences in mutational profile between follicular thyroid carcinoma and follicular thyroid adenoma identified using next generation sequencing', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). doi: 10.3390/ijms20133126.
- Cantley, L. C. and Neel, B. G. (1999) 'New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.96.8.4240.
- Cargnello, M. and Roux, P. P. (2011) 'Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1). doi: 10.1128/mubr.00031-10.
- Censi, S. *et al.* (2019) 'Prognostic significance of TERT promoter and BRAF mutations in TIR-4 and TIR-5 thyroid cytology', *European Journal of Endocrinology*, 181(1). doi: 10.1530/EJE-19-0073.
- Chantreau, V. *et al.* (2015) 'Molecular insights into the transmembrane domain of the thyrotropin receptor', *PLoS ONE*, 10(11). doi: 10.1371/journal.pone.0142250.
- Ciampi, R. and Nikiforov, Y. E. (2005) 'Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors',

Endocrine Pathology. doi: 10.1385/EP:16:3:163.

D'Avanzo, A. *et al.* (2004) 'Follicular Thyroid Carcinoma: Histology and Prognosis', *Cancer*, 100(6). doi: 10.1002/cncr.20081.

Durante, C. *et al.* (2023) '2023 European Thyroid Association Clinical Practice Guidelines for thyroid nodule management', *European Thyroid Journal*, 12(5). doi: 10.1530/ETJ-23-0067.

Elisei, R. *et al.* (2008) 'Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: A 10-year follow-up study', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(3). doi: 10.1210/jc.2007-1714.

Elsherbini, N. *et al.* (2022) 'EIF1AX mutation in thyroid tumors: a retrospective analysis of cytology, histopathology and co-mutation profiles', *Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 51(1). doi: 10.1186/s40463-022-00594-6.

Eszlinger, M. *et al.* (2014) 'Somatic mutations in 33 benign and malignant hot thyroid nodules in children and adolescents', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 393(1–2). doi: 10.1016/j.mce.2014.05.023.

Ferlay, J. *et al.* (2024) *Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1)*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/en> (Accessed: 25 March 2024).

Fillon, M. (2021) 'Both leading molecular thyroid tests may reduce the need for diagnostic surgery', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3). doi: 10.3322/caac.21666.

Führer, D. *et al.* (1997) 'Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene and not in the G(s) α protein gene in 31 toxic thyroid nodules', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(11). doi: 10.1210/jcem.82.11.4382.

García-Rostán, G. *et al.* (2005) 'Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer', *Cancer Research*, 65(22). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4259.

Gasparre, G. *et al.* (2007) 'Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21). doi: 10.1073/pnas.0703056104.

Gene [Internet] (2004). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (Accessed: 4 April 2024).

- Gubbiotti, M. A., Andrianus, S. and Baloch, Z. (2023) 'THADA-IGF2BP3 fusions detected in fine-needle aspiration specimens of thyroid nodules: An institutional experience', *Diagnostic Cytopathology*, 51(6). doi: 10.1002/dc.25113.
- Haugen, B. R. *et al.* (2016) '2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer', *Thyroid*, 26(1). doi: 10.1089/thy.2015.0020.
- International Agency for Research on Cancer (2022) *WHO Classification of Tumours Editorial Board. Endocrine and neuroendocrine tumours [Internet], WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 10.* Available at: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/53>. (Accessed: 28 February 2024).
- Jiang, N. *et al.* (2020) 'Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior', *Molecular Biology Reports*. doi: 10.1007/s11033-020-05435-1.
- Jung, C. K. *et al.* (2018) 'Clinical utility of EZH1 mutations in the diagnosis of follicular-patterned thyroid tumors', *Human Pathology*, 81. doi: 10.1016/j.humpath.2018.04.018.
- Kelana, S., Susilo, D. H. and Sahudi (2022) 'The performance of various laboratory parameters to differentiate follicular thyroid carcinoma and follicular thyroid adenoma', *Bali Medical Journal*, 11(3). doi: 10.15562/bmj.v11i3.3521.
- Kitahara, C. M. and Sosa, J. A. (2020) 'Understanding the ever-changing incidence of thyroid cancer', *Nature Reviews Endocrinology*. doi: 10.1038/s41574-020-00414-9.
- Kopanos, C. *et al.* (2019) 'VarSome: the human genomic variant search engine', *Bioinformatics*, 35(11). doi: 10.1093/bioinformatics/bty897.
- Kozak, M. (2002) 'Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation', *Gene*. doi: 10.1016/S0378-1119(02)01056-9.
- Krishnamoorthy, G. P. *et al.* (2019) 'EIF1AX and RAS mutations cooperate to drive thyroid tumorigenesis through ATF4 and C-MYC', *Cancer Discovery*, 9(2). doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0606.
- Küsters-Vandeveldel, H. V. N. *et al.* (2016) 'SF3B1 and EIF1AX mutations occur in primary leptomeningeal melanocytic neoplasms; yet another similarity to uveal melanomas', *Acta neuropathologica communications*, 4. doi: 10.1186/s40478-016-0272-0.

- Landa, I. *et al.* (2016) ‘Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers’, *Journal of Clinical Investigation*, 126(3). doi: 10.1172/JCI85271.
- Lee, S. H. *et al.* (2022) ‘The role of EZH1 and EZH2 in development and cancer’, *BMB Reports*, 55(12). doi: 10.5483/BMBRep.2022.55.12.174.
- Liang, J. *et al.* (2018) ‘Genetic landscape of papillary thyroid carcinoma in the Chinese population’, *Journal of Pathology*, 244(2). doi: 10.1002/path.5005.
- Luo, Y. *et al.* (2020) ‘Clinical, Pathological, and Molecular Characteristics Correlating to the Occurrence of Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis’, *Frontiers in Oncology*. doi: 10.3389/fonc.2020.549882.
- Lupo, M. A. *et al.* (2020) ‘Multiplatform molecular test performance in indeterminate thyroid nodules’, *Diagnostic Cytopathology*, 48(12). doi: 10.1002/dc.24564.
- Mincer, D. and Jialal, I. (2023) *Hashimoto Thyroiditis, StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459262/>.
- Mon, S. Y. *et al.* (2018) ‘Cancer risk and clinicopathological characteristics of thyroid nodules harboring thyroid-stimulating hormone receptor gene mutations’, *Diagnostic Cytopathology*, 46(5). doi: 10.1002/dc.23915.
- Morariu, E. M. *et al.* (2021) ‘Clinicopathologic Characteristics of Thyroid Nodules Positive for the THADA-IGF2BP3 Fusion on Preoperative Molecular Analysis’, *Thyroid*, 31(8). doi: 10.1089/thy.2020.0589.
- Nielsen, L. *et al.* (2023) ‘Diagnostic clues for hyalinizing trabecular tumor on fine needle aspiration cytology’, *CytoJournal*, 20(1). doi: 10.25259/Cytojournal_34_2023.
- Novodvorsky, P. and Allahabadia, A. (2021) ‘Thyrotoxicosis’, *Medicine (United Kingdom)*. doi: 10.1016/j.mpmed.2021.05.014.
- Pacini, F. *et al.* (2000) ‘RET proto-oncogene mutations in thyroid carcinomas: Clinical relevance’, *Journal of Endocrinological Investigation*. doi: 10.1007/BF03343732.
- Panebianco, F. *et al.* (2017) ‘THADA fusion is a mechanism of IGF2BP3 activation and IGF1R signaling in thyroid cancer’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(9). doi: 10.1073/pnas.1614265114.
- PDQ® Adult Treatment Editorial Board (2023) *PDQ Thyroid Cancer Treatment*. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Available at:

<https://www.cancer.gov/types/thyroid/patient/thyroid-treatment-pdq> (Accessed: 30 March 2024).

Pozdeyev, N. *et al.* (2018) ‘Genetic analysis of 779 advanced differentiated and anaplastic thyroid cancers’, *Clinical Cancer Research*, 24(13). doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0373.

Tali, G. *et al.* (2023) ‘The Difference in Clinical Behavior of Gene Fusions Involving RET/PTC Fusions and THADA/IGF2BP3 Fusions in Thyroid Nodules’, *Cancers*, 15(13). doi: 10.3390/cancers15133394.

Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. and Mesirov, J. P. (2013) ‘Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration’, *Briefings in Bioinformatics*, 14(2). doi: 10.1093/bib/bbs017.

Untergasser, A. *et al.* (2012) ‘Primer3-new capabilities and interfaces’, *Nucleic Acids Research*, 40(15). doi: 10.1093/nar/gks596.

Wang, H. *et al.* (2020) ‘Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm With Papillary-Like Nuclear Features in Children: An Institutional Experience and Literature Review’, *Pediatric and Developmental Pathology*, 23(2). doi: 10.1177/1093526619866584.

WHO Classification of Tumours Editorial Board (2022) *Endocrine and neuroendocrine tumours [Internet]*. 5th edn, *WHO classification of tumours series*. 5th edn. Lyon (France). Available at: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/53> (Accessed: 28 February 2024).

Xu, B. and Ghossein, R. (2020) ‘Poorly differentiated thyroid carcinoma’, *Seminars in Diagnostic Pathology*. doi: 10.1053/j.semdp.2020.03.003.

Xu, S. *et al.* (2023) ‘A Combination of BRAF and EZH1/SPOP/ZNF148 Three-Gene Mutational Classifier Improves Benign Call Rate in Indeterminate Thyroid Nodules’, *Endocrine Pathology*, 34(3). doi: 10.1007/s12022-023-09782-0.

Ye, L. *et al.* (2017) ‘The genetic landscape of benign thyroid nodules revealed by whole exome and transcriptome sequencing’, *Nature Communications*, 8. doi: 10.1038/ncomms15533.