

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Genetické aspekty melanomu

Diplomová práce

Bc. Kateřina Koudelková

Školitelka: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D., Genlabs s.r.o.

České Budějovice 2020

Koudelková, K., 2020: Genetické aspekty melanomu. [Genetic aspects of melanoma. Mgr. Thesis, in Czech.] – 103 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The aim of this diploma thesis is to summarize findings about the cellular, molecular and mainly genetic characteristics of malignant melanoma, which is one of the most harmful human malignancies with steadily increasing incidence in recent decades. Malignant melanoma is a highly complex disease in which a huge number of genes play a role. The experimental part is devoted to the detection of mutations in the *CDKN2A* and *CDK4* genes and polymorphism C609T in the *NQO1* gene in participants with melanoma or pancreatic cancer in the family.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 22. 5. 2020

.....
Bc. Kateřina Koudelková

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D., za cenné rady, odborný dohled a čas věnovaný při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia.

Obsah

Úvod.....	1
1 Zhoubné nádory kůže	2
1.1 Epidemiologie	2
2 Maligní melanom	5
2.1 Klinické projevy.....	6
2.2 Etiologie a rizikové faktory	8
2.2.1 UV záření	8
2.2.2 Genetické faktory.....	9
2.2.3 Riziková populace	9
2.3 Diagnostika	10
2.4 Léčba	11
2.5 Prognóza	12
2.6 Pediatrický melanom.....	13
3 Genetika maligního melanomu.....	14
3.1 <i>CDKN2A</i>	14
3.1.1 Mutace genu <i>CDKN2A</i> s nefamiliárním výskytem	15
3.1.2 Mutace genu <i>CDKN2A</i> a její familiární výskyt.....	16
3.1.3 p16 ^{INK4A}	17
3.1.3.1 Mutace p16 ^{INK4A}	18
3.1.4 p14 ^{ARF}	19
3.1.4.1 Mutace p14 ^{ARF}	21
3.1.5 Další izoformy genu <i>CDKN2A</i>	23
3.2 <i>CDK4</i>	23
3.3 <i>MC1R</i>	24
3.4 <i>BRAF</i>	25
4 Další potenciálně predisponující geny	27
4.1 <i>NQO1</i>	27
4.1.1 Polymorfismus <i>NQO1</i> *2.....	30
5 Familiární melanom a karcinom pankreatu	32
6 Cíle práce	34
7 Materiál a metody.....	35
7.1 Účastníci studie	35
7.1.1 Dotazník	35

7.1.2	Odběr biologického materiálu	36
7.2	Izolace DNA	36
7.2.1	Izolace DNA z bukalního stěru	36
7.2.2	Izolace DNA z plné krve.....	37
7.3	Fluorometrie.....	38
7.4	Analýza genů <i>CDKN2A</i> a <i>CDK4</i>	39
7.4.1	PCR.....	39
7.4.2	Přečištění PCR produktů genu <i>CDKN2A</i> a <i>CDK4</i>	41
7.4.2.1	GeneAll Expin TM Combo GP kit.....	41
7.4.2.2	ExoSAP-IT TM PCR Product Cleanup	41
7.4.3	Sekvenační reakce	42
7.4.4	Analýza dat.....	42
7.5	Analýza genu <i>NQO1</i>	43
7.5.1	PCR.....	43
7.5.2	Restrikční štěpení	44
7.5.3	Analýza dat.....	45
7.6	Gelová elektroforéza	45
8	Výsledky	47
8.1	Koncentrace DNA	47
8.2	Zjištěné varianty v genu <i>CDKN2A</i> a <i>CDK4</i>	47
8.2.1	Varianta A148T	47
8.2.2	Varianta c.*29C>G (C500G, nt 500).....	48
8.3	Zjištěné varianty v genu <i>NQO1</i>	50
8.4	Vyhodnocení on-line dotazníku	52
9	Diskuse	54
	Závěr	62
	Seznam použité literatury	63
	Internetové zdroje	84
	Seznam obrázků	86
	Seznam tabulek	87
	Seznam příloh	88
	Přílohy	89

Seznam použitých zkratek

ALM – akrolentiginózní melanom

BRAF – B-Raf proto-oncogene

BRCA1 – breast cancer 1 gene

BRCA2 – breast cancer 2 gene

CCND1 – cyclin D1

CDK4 – cyclin-dependent kinase 4

CDK6 – cyclin dependent kinase 6

CDKN2A – cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CNS – centrální nervová soustava

CT – výpočetní tomografie

CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

ČR – Česká republika

DMBA – 7,12-dimethylbenz[a] anthracen

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

E2F – transkripční faktor

HDM2 – human double minute 2 homolog

KIT – KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase

LMM – lentigo maligna melanom

MC1R – melanocortin 1 receptor

MDM2 – mouse double minute 2 homolog

MEK – mitogen-activated protein kinase 1

MRI – magnetická rezonance

NADH – nikotinamidadenindinukleotid

NADPH –
nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NM – nodulární melanom

NOR – Národní onkologický registr

NQO1 – NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1

NRAS – NRAS proto-oncogen

NRF2 – nuclear factor, erythroid 2 like 2

OR – relativní riziko

p53 – tumor protein p53

PCR – polymerase chain reaction

PD-1 – programmed cell death protein 1

pRb – retinoblastoma protein

PS – fotosenzibilizátor

PTEN – phosphatase and tensin homolog

RB1 – RB transcriptional corepressor 1

RFLP – restriction fragment length polymorphism

ROS – reaktivní formy kyslíku

rpm – revolutions per minute

RT – room temperature

RTG – rentgen

SSM – povrchově se šířící melanom

TP53 – tumor protein p53 gene

UK – Velká Británie

USA – Spojené státy americké

USG – ultrasonografie

UTR – untranslated region

UV – ultrafialové záření

ÚZIS – Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR

Úvod

Maligní melanom je díky rychlému lymfогennímu a hematогennímu metastazování jednou z nejzhubnějších lidských malignit pocházející z neoplastické proliferace melanocytů a jeho incidence v posledních desetiletích neustále roste. I když melanom tvoří pouze 4 % všech dermatologických malignit, je zodpovědný za 80 % všech úmrtí na rakovinu kůže. Jedním z nejvýznamnějších rizikových faktorů je rodinná anamnéza onemocnění, kdy přibližně 5-10 % všech melanomů je dědičného charakteru a přítomnost melanomu v rodině přináší až dvojnásobné riziko vzniku tohoto onemocnění. Recentní studie poukazují také na souvislost mezi výskytem melanomu a dědičným karcinomem pankreatu.

Detekce této nemoci v časném stádiu může vést k plnému vyléčení pacientů, ale pozdní stádium s již přítomnými metastázemi má extrémně špatnou prognózu se střední dobou přežití menší než 10 měsíců. Tato špatná prognóza do značné míry vyplývá z rezistence na konvenční chemoterapii, a proto jsou v současných studiích zkoumány molekulárně cílené terapie a jsou objevovány další a další potencionálně účinné látky.

Nedostatek účinných terapeutik je částečně způsoben neúplnou znalostí patogeneze melanomu a nedostatkem informací o převládajících genech pozmeněných během jeho vývoje. Maligní melanom je vysoce komplexní onemocnění, v jehož genetice hraje roli obrovské množství genů. Mezi několik málo genů označovaných za predisponující se mohou řadit geny *CDKN2A* a *CDK4*, které hrají důležitou úlohu v regulaci buněčného cyklu. Existuje celá řada potencionálně predisponujících genů jako je např. gen *NQO1*, u kterých bude záviset na dalším výzkumu, zda budou použity jako biomarkery či nikoliv.

Cílem této diplomové práce bylo v literárním přehledu shrnout doposud známé poznatky o buněčných, molekulárních a genetických charakteristikách maligního melanomu vycházející z neustále se rozšiřujících genomických informací. Experimentální část se pak věnuje detekci mutací v genech *CDKN2A*, *CDK4* a polymorfismu C609T v genu *NQO1* pomocí metod PCR, PCR-RFLP a sekvenace u dobrovolníků s melanomem či karcinomem pankreatu v rodině.

1 Zhoubné nádory kůže

Kůže je nejrozsáhlejším lidským orgánem spojující člověka s okolním světem a zároveň ho chrání před chladem, světlem, poškozením infekcí a zadržuje vodu, tuk či vitamin D. Je nejvíce vystavena působení jak fyzikálních, tak chemických kancerogenů vnějšího prostředí. Skládá se z těchto částí: epidermis (pokožky), corium (dermis-škára) a tela subcutanea (podkožní vazivo). Vrchní část pokožky tvoří ploché buňky neboli epitelie, pod nimi se nachází buňky bazální a ve třetí části jsou melanocyty (pigmentové buňky), které jsou zodpovědné za barvu kůže (Vorlíček et al., 2012; Costin a Hearing, 2007).

Mezi nejčastější zhoubné novotvary kůže patří karcinomy, melanom a dále se mohou vzácně vyskytovat sarkomy, maligní lymfomy, metastázy jiných nádorů či leukemické infiltráty (Vorlíček et al., 2012).

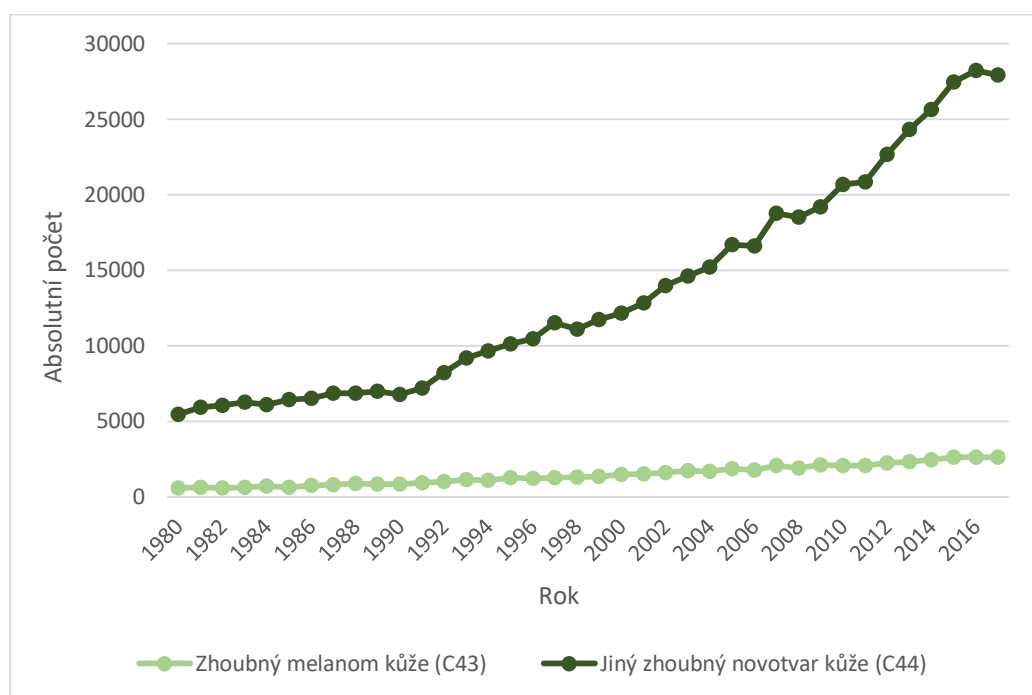
1.1 Epidemiologie

V incidenci zhoubných nádorů kůže jsou obrovské regionální a rasové rozdíly. Incidence stoupá u bílé populace směrem k rovníku a také u osob žijících ve vyšších nadmořských výškách. Nejvíce jsou ohroženi lidé s menším množstvím melanocytů, světlou pletí a světlými vlasy a v oblastech s vysokým počtem dní plného slunečního svitu. Největší incidenci tak mají obyvatelé Austrálie a Nového Zélandu a také státy severní Evropy, u Asiatů je incidence nízká a u černochoů se nádory kůže téměř nevyskytují. Snědí lidé s černými vlasy a vysokým obsahem melanocytů jsou díky charakteru své kůže chráněni před slunečním zářením mnohem efektivněji (Chudnovsky et al., 2005).

Od počátku devadesátých let dochází k strmému nárůstu výskytu kožních nádorů, což je spojeno zejména se zvýšenou expozicí obyvatel slunečnímu záření. Celosvětově incidence narůstá o zhruba 4-5 % ročně. Mortalita rovněž stoupá, ale ne tak strmě jako incidence (Šlampa et al., 2007; Vorlíček et al., 2012; Arenbergerová, 2016).

Podle dat Národního onkologického registru (NOR) incidence zhoubných novotvarů kůže v České republice dlouhodobě roste. Rostoucí počet hlášených případů souvisí zejména se stárnutím populace, kdy věk je hlavním rizikovým faktorem zhoubného bujení. Dalším možným vlivem na rostoucí incidenci je vyšší výskyt fyzikálních a chemických kancerogenů a dále také přesnější diagnostika a celková kvalita lékařské péče. Vyšší počet hlášených případů může také souviset se zavedením celoplošných onkologických screeningů. Incidence je vyšší u mužů než u žen (ÚZIS ČR, 2016. [online]). Nejčastěji diagnostikovaným onkologickým onemocněním je tzv. jiný zhoubný novotvar kůže, kam patří zejména

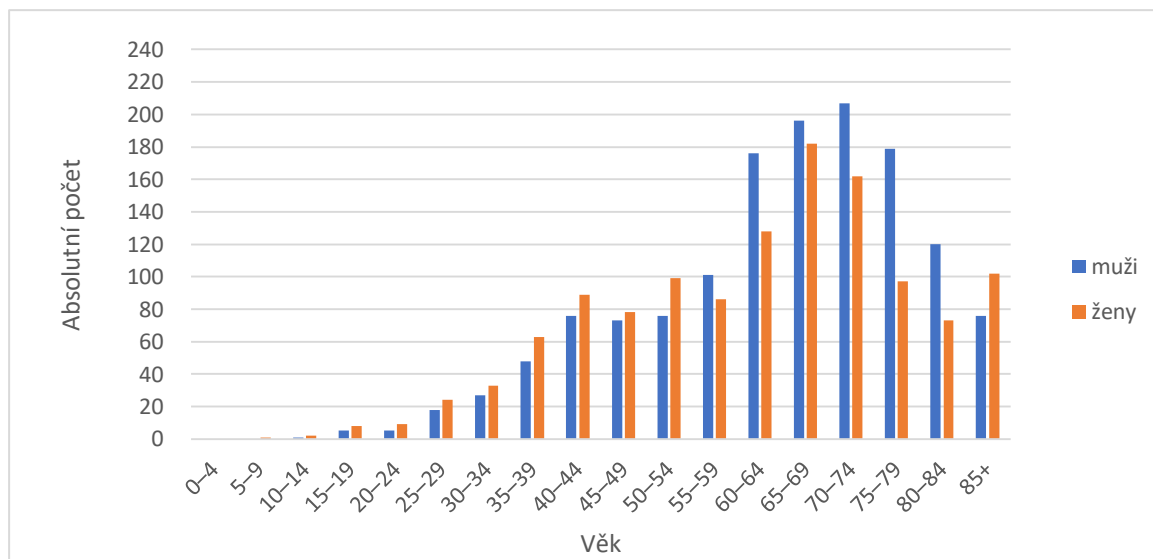
bazaliomy a spinocelulární karcinomy. V roce 2017 bylo hlášeno celkem 27916 těchto nádorů (muži – 14870, ženy – 13046), což je v celkovém počtu necelá třetina všech nahlášených zhoubných novotvarů v tomto roce. Případů kožního melanomu bylo v roce 2017 nahlášeno 2620, opět s vyšším počtem u mužů (1384), což ho řadí na sedmé místo ze všech zhoubných novotvarů. Z dat také vyplývá, že incidence kožního melanomu vzrostla za posledních 30 let zhruba trojnásobně viz Obr. 1 (ÚZIS ČR, 2019. [online]).



Obr. 1: Růst incidence zhoubného melanomu kůže (C43) a jiných zhoubných novotvarů kůže (C44) (převzato a upraveno dle ÚZIS ČR, 2019. [online]).

Zajímavé je srovnání mortality, která vykazuje v absolutních číslech stagnaci, což je zapříčiněno zejména zvyšující se kvalitou lékařské péče, lepší organizací protinádorové léčby (např. vznik Komplexních onkologických center v roce 2005), dostupností nových diagnostických a terapeutických prostředků anebo časnější diagnostikou nádorových onemocnění, kdy vysoké procento je diagnostikováno v příznivějších stádiích. V roce 2016 zemřelo v ČR na zhoubné novotvary kůže 590 lidí, což je pouze o 114 lidí více než v roce 1994, o 101 lidí více než v roce 2010 a o 24 lidí více než v roce 2015 (ÚZIS ČR, 2016. [online]).

Z dat z let 2010-2014 vyplývá i průměrný věk pacientů se zhoubným melanomem. U mužů je tento medián věku 65 let, u žen je nižší a to 61 let. V roce 2017 bylo nejvíce případů hlášeno u mužů mezi roky 70-74, u žen pak mezi roky 65-69 viz Obr. 2 (Mužík a Malúšková, 2014; ÚZIS, 2019. [online]).



Obr. 2: Věk pacientů s maligním melanomem (převzato a upraveno dle ÚZIS ČR, 2019[online]).

Ve srovnání se světem se Česká republika dle incidence nachází na 18. místě. Na předních místech se nachází Austrálie, Nový Zéland a severské státy jako Norsko, Dánsko či Švédsko (Global Cancer Observatory, 2018. [online]).

2 Maligní melanom

Maligní melanom nebo také jen melanom či melanoblastom je ve srovnání s ostatními nádory kůže relativně vzácný, ale jde o jeden z nejzhoubnějších kožních nádorů vůbec. Jedná se o neuroektodermový nádor, který vzniká z pigmentových buněk (melanocytů), které se během embryonálního vývoje dostaly z embryonálního základu pro nervovou tkáň do kůže, ale i do jiných orgánů a sliznic jako je oko, sliznice urogenitálního či gastrointestinálního traktu. Kožní pigmentové buňky jsou označovány jako klasické melanocyty a podílejí se na pigmentaci kůže a vlasů, zatímco melanocyty na jiných místech, jako je oko, ucho či srdce jsou označovány jako neklasické. Prekurzorem pigmentových buněk je melanoblast a zralá pigmentová buňka se nazývá melanocyt. Melanocyty hrají důležitou roli v ochraně kůže před ultrafialovým (UV) zářením (Borovanská a Riley, 2011; Colombo et al., 2011; Ryška et al., 2017).

Melanocyty produkují melanin, polymer založený na tyrosinu, ve specializovaných organelách příbuzných lysozomu, melanosomech. Syntéza melaninu je katalyzována enzymem tyrosinásou a zahrnuje některé toxické meziprodukty, které právě melanosom redukuje, čímž chrání buňku před škodlivými účinky těchto sloučenin. Během melanogeneze se syntetizují dva melaninové pigmenty, eumelanin, který je hnědý/černý a pheomelanin, který je žlutý/červený. Lidé, kteří produkují převážně eumelanin, mají hnědé nebo černé vlasy a tmavou pleť, která se snadno opálí. Eumelanin také chrání pokožku před poškozením způsobeným UV zářením. Lidé, kteří produkují převážně pheomelanin, mají rzzavé nebo blondřaté vlasy, pihy a světle zbarvenou pleť, která se špatně opaluje. Vzhledem k tomu, že pheomelanin nechrání pokožku před UV zářením, lidé s více pheomelaninem mají mnohem větší riziko poškození kůže způsobené slunečním zářením (Colombo et al., 2011).

Kožní melanom se primárně nachází na kůži, ale může se vyskytovat prakticky kdekoliv, jelikož melanocyty během embryogeneze putují nejen do kůže, ale i do celé řady orgánů (Borovansky a Riley, 2011). Proto se dá melanom rozdělit do několika podskupin, kterými jsou povrchově se šířící melanom, nodulární melanom, akrolentiginózní melanom, lentigo maligní melanom a další neobvyklé varianty:

- Povrchově se šířící melanom (SSM) – je zodpovědný asi za 70 % všech maligních melanomů. U mužů se nachází zejména v horních partiích trupu a u žen na bérkách či stehnech. Jeho charakteristickým znakem je horizontální růst, přičemž jeho okraje jsou zpočátku relativně pravidelné, ale později už mají nepravidelné melanomové kontury;

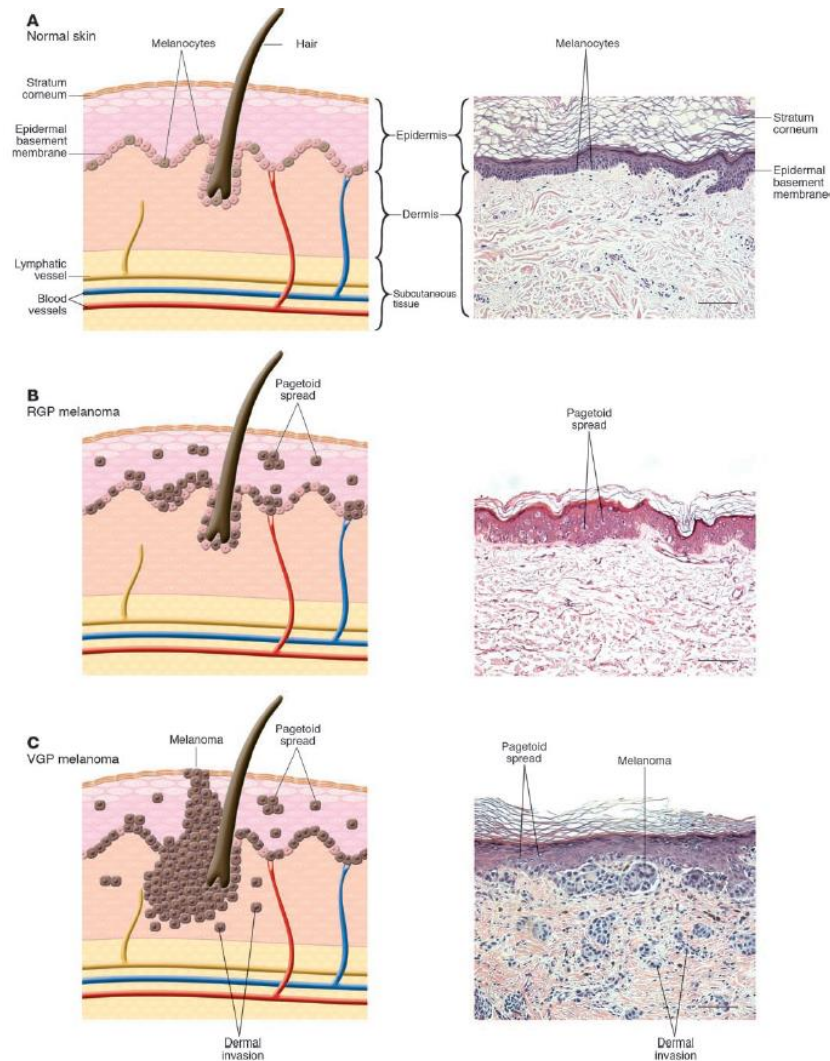
- Nodulární melanom (NM) – tvoří 20 % melanomů a je charakteristický rychlým vertikálním růstem na podkladě melanocytárního névu nebo vzniká na intaktní kůži a prognosticky se jedná o jednu z nejzávažnějších variant melanomu;
- Lentigo maligna melanom (LMM) – tvoří se na podkladě lentigo maligna zejména u starších osob na obličeji, může mít v průměru až 10 cm a k vertikálnímu růstu dochází až po mnoha letech;
- Akrolentiginózní melanom (ALM) – jedná se o NM či SSM šířící se v místech bez vlasových folikulů - dlaně, plošky, pod nehty. Prognosticky se jedná o nejrizikovější typ. Pokud je přítomna tmavá skvrna pod nehtem je důležité sledovat, zda odrůstá spolu s nehtem a jde o tzv. podnehtovou modřinu nebo zůstává na stejném místě, pak by se mohlo jednat o ALM (Arenbergerová a Arenberger, 2005; Chudnovsky et al., 2005).

Jednotlivé typy se od sebe liší i geneticky, a to zejména spektrem chromozomálních aberací a také frekvencí mutací jednotlivých specifických genů, ale i biologickým a klinickým chováním (Chin et al., 2006; Ryška et al., 2017).

2.1 Klinické projevy

Každý kožní melanom vzniká jako plošné ložisko a pokud je zachycen v této fázi, chirurgické odstranění znamená trvalé uzdravení. Tento plošný růst je nenápadný a může trvat několik let. Poté dochází k vertikálnímu růstu (viz Obr. 3), nádor se mění na vysoce maligní a je prognosticky nepříznivý. Plošný melanom je třeba odlišit od běžných pigmentových skvrn. Na rozdíl od jiných kožních nádorů jako je basaliom či spinaliom se melanom nevyznačuje lokálním destruktivním růstem, ale především nebezpečím metastáz (Vorlíček et al., 2012; Arenbergerová, 2016). Kožní melanom musí mít změny vzhledu ložiska, které jsou vyjádřeny pěti kritérii pravidla ABCDE (obrázkové znázornění pravidel viz Příloha 1) a čím více těchto pravidel se vyskytuje, tím je větší riziko, že se jedná o maligní melanom.

- A – Asymmetry – ložisko je nepravidelné s asymetrickým tvarem;
- B – Borderline – okraje ložiska jsou cípaté, nepravidelné se zářezy a výběžky;
- C – Colour – barva ložiska se mění, tmavne a stává se skvrnitým;
- D – Diameter – průměr ložiska je nad 5 mm a trvale se zvětšuje;
- E – Elevation – růst do výšky či evolution – vývoj v čase.



Obr. 3: Fáze histologické progresse transformace melanocytů. A) normální kůže, B) radiální růstová fáze – melanomové buňky migrují do horní části epidermis C) vertikální růstová fáze – melanomové buňky pronikají do dermis (Chudnovsky et al., 2005).

Charakteristický pro kožní melanom je změněný kožní reliéf, jemné šupinkatění, zvětšování, zhrubění povrchu, svědění, vertikální růst, mokvání a krvácení. Změny všech névů jako např. změna okrajů, barvy a vyvýšení mohou znamenat maligní zvrát. Symptomy jako krvácení, svědění, zánětlivý okraj či ulcerace jsou známkou již pokročilého stadia melanomu (Arenbergerová a Arenberger, 2005).

Biologické chování maligního melanomu je vysoce variabilní a do značné míry nepředvídatelné. Dnes je maligní melanom chápán jako skupina morfoloicky podobných nádorů, které se však liší nejen svou histologií, charakterem a dynamikou šíření a růstu, ale zejména svou etiopatogenezí, molekulárními změnami, signálními dráhami, které jsou aktivovány či deaktivovány a interakcí mezi nádorovými buňkami a hostitelským organismem. Proto je důležité charakterizovat melanomy na molekulární úrovni a neklasifikovat nádory pouze dle jejich morfoloie (Viros et al., 2008; Rýška et al., 2017).

2.2 Etiologie a rizikové faktory

Přesná příčina vzniku melanomu není známa, ale existuje řada faktorů, které se podílejí na jeho rostoucí incidenci.

Melanom může vzniknout na intaktní kůži, ale riziko vzniku je vyšší, pokud je na kůži přítomna některá tzv. prekurzorová afekce – vrozené névy (mateřská znaménka), lentigo maligna (maligní melanocyty, které ještě nenapadly epidermis) či dysplastické névy (nepravdělně probarvené útvary). Na podkladě dysplastických névů vzniká melanom ve 25-30 % případů a riziko melanomu u osob s těmito névy je 30x vyšší než u osob bez nich (Vorlíček et al., 2012). Incidence dysplastických névů v populaci je okolo 4 %, ale u pacientů s melanomem je to až 34-59 % (Duffy a Grossman, 2012). U velkých vrozených névů je riziko vzniku melanomu tím větší, čím je névus větší, avšak vznik nových pigmentových névů po 60. roce života by měl být vždy hodnocen s možným vznikem melanomu (Kodet a Krajsová, 2017).

2.2.1 UV záření

Z environmentálních vlivů je pro vznik melanomu zásadní ultrafialové záření. UV záření působí pravděpodobně jako iniciátor karcinogeneze. Nejrizikovější je expozice UV záření v dětství, ale ani expozice v dospělosti není bezvýznamná. Nejvíce nebezpečné jsou nárazové pobyty na přímém slunci spojené se solární dermatitidou. Taktéž se nedoporučuje návštěva solárií (Vorlíček et al., 2012).

UV záření poškozuje DNA tak, že buňky se sami destruuji nebo trvale zastavují buněčné dělení. Nicméně melanocyty jsou odolnější k UV záření než jiné druhy buněk a pokud dojde k poškození jejich DNA, tak melanocyty téměř nikdy nepodstoupí apoptózu. Proto začnou abnormální melanocyty růst a začnou se v nich kumulovat mutace zejména v genech, které řídí buněčný cyklus. Nakonec můžou buňky nekontrolovatelně proliferovat a mohou odolávat apoptóze, což vede k tvorbě a růstu melanomu (Melanoma. [online]).

Vzhledem k tomu, že UV záření je považováno za nejrizikovější faktor pro vznik melanomu, měl by být nejvyšší výskyt melanomu u lidí profesně pravidelně vystavených slunečnímu záření, jako jsou např. zemědělci. Ze studií však vyplývá, že přerušované sluneční záření zvyšuje riziko daleko více než kumulativní sluneční záření (Vuong et al., 2014). V dnešní době už proto není UV záření považováno za hlavní příčinu vzniku melanomu vzhledem k tomu, že u nejvíce ohrožených typů (světlá kůže, světlé vlasy) se melanomy nevyskytují na těch místech, které jsou nejvíce exponovány slunečnímu záření,

ale na místech jako jsou dlaně, plosky nohou, sliznice dutiny ústní, genitálu a podobně (Ryška et al., 2017).

Maligní melanom už dnes není chápán jako jedno nádorové onemocnění, ale jako skupina nádorových onemocnění, které se liší např. histologií či molekulárními změnami. Typickým příkladem může být rozdíl mezi melanomem, který vznikne na kůži občasně vystavené UV záření, který se vyznačuje výskytem mutace v genu *BRAF*, zatímco u melanomu vznikajícího po chronickém vystavení kůže UV záření jsou mutace genu *BRAF* vzácné, ale vyskytuje se zvýšený počet kopií genu *CCND1* (Sauter et al., 2002; Maldonado et al., 2003; Lee et al., 2010).

2.2.2 Genetické faktory

Odhaduje se, že zhruba 5-10 % všech melanomů může mít familiární výskyt. Familiární melanom je pak spojen s autozomálně dominantní dědičností germinálních mutací genů *CDNK2A* a *CDK4*. Mezi další rizikové geny pak můžeme řadit geny *MC1R*, *BRAF*, *RBI*, *BRCA1* a *BRCA2*. Mohou se uplatňovat i další dědičné syndromy jako je xeroderma pigmentosum či syndrom dysplastických névů (Aoude et al., 2015; Potrony et al., 2016).

2.2.3 Riziková populace

Za rizikovou populaci můžeme považovat pacienty s již diagnostikovaným melanomem nebo melanomem v rodinné anamnéze, ale také pacienty s velkým počtem dysplastických névů. Dále také pacienty s genetickou predispozicí či pacienty s imunosupresí. Velký význam má také fenotyp jedince, kdy vnímavějšími jedinci jsou pacienti se světlým fototypem kůže, se světlou barvou vlasů a také jedinci s četnými pihami a světlou barvou očí (Gilchrest et al. 1999; Gandini et al. 2005a; Gandini et al., 2005b; Kodet a Krajsová, 2017). Riziko jednotlivých faktorů je uvedeno v tabulce níže (Tab. I).

Samotnou rizikovou skupinou jsou pak bělošští muži s věkem nad 50 let a nižším socioekonomickým statutem, kdy celosvětově téměř 60 % úmrtí na melanom tvoří právě tato skupina. To může být způsobeno tím, že ve srovnání se ženami mají muži výrazně menší informovanost a péči o vlastní pokožku, včetně samovyšetřovacích postupů (Kodet a Krajsová, 2017).

Za rizikovou skupinu může být považován také letecký personál, především piloti, kteří dle meta-analýzy Sanlorenzo et al. (2015) mají dvojnásobný výskyt melanomu ve srovnání s běžnou populací. Čím výš piloti stoupají od zemské atmosféry, tím více jsou

vystavování nejen UV záření, ale také kosmickému záření, což je vysokoenergetické záření, které je pro tělo nepřirozenou zátěží, s níž se musí vyrovnat. Významnou příčinou vzniku melanomu i ostatních malignit u těchto povolání může být časté narušení cirkadiálního rytmu z důvodu překračování časových pásem a nepravidelná pracovní doba (Rafnsson et al., 2000; McNeely et al., 2018).

Tab. I: Rizikové faktory pro vznik melanomu (Badenas et al. (2012)).

Faktor	Přibližné relativní riziko
člen rodiny náchylné k melanomu*	35-70
předchozí melanom	8,5
historie melanomu v rodině#	2-3
typ pleti I (světlá kůže)	1,4
pihovatá kůže	2-3
modré oči	1,6
zrzavé vlasy	2,4-4
spálení kůže s puchýři	2-3
vícečetná či atypická znaménka	2-12,7

* více postižených příbuzných na stejné straně rodiny

jeden nebo více postižených příbuzných prvního stupně

2.3 Diagnostika

Většina melanomů je odhalena klinicky. Při histologickém vyšetření se hodnotí morfologické uspořádání, intenzita pigmentace, způsob šíření a růstu či povrchové vředovatění. Histologické vyšetření je doplněno vyšetřením stupně invaze (hloubky invaze) podle Clarka a tloušťky nádoru podle Breslowa (v mm). Součástí klinického vyšetření je palpáce uzlin, doplňuje ji rentgen (RTG) plic, ultrasonografie (USG) břicha, eventuálně výpočetní tomografie (CT vyšetření) (Vorlíček et al., 2012).

Genetické vyšetření predispozic pro melanom týkající se genů *CDKN2A* a *CDK4* má význam u pacientů s familiárním výskytem melanomu a také u pacientů s více diagnostikovanými melanomy a u pacientů s melanomem v raném věku (Kodet a Krajsová, 2017).

V České republice dosud nebyl zaveden plošný screening populace, který by se zaměřoval na prevenci kožních nádorů, i když samozřejmě existují edukativní programy, např. akce Stan proti melanomu, která každoročně vyšetří a diagnostikuje stovky nových případů kožních nádorů (Melanom.cz. [online]). Význam klinického screeningu potvrzují

studie, které poukazují na zvýšení incidence melanomů po zavedení preventivních screeningových programů a edukace populace. Takovou studií je i studie Breitbart et al. (2012), kdy zhruba 19 % populace severního Německa podstoupilo vyšetření na melanom, přičemž 90 % nově diagnostikovaných případů bylo zachyceno v raném stádiu a mortalita na melanom v této oblasti byla až o 50 % menší než ve zbytku Německa. Studie také poukazují na finanční nenáročnost dermatologických vyšetření ve srovnání s vyšetřením jiných nádorových onemocnění (Losina et al., 2007).

2.4 Léčba

Pokročilý melanom a melanom s metastázemi dlouhou dobu zůstával jednou z nejhorších diagnóz s nepříznivou prognózou a velmi krátkou dobou celkového přežití. To se však postupně mění s pokroky v oblastech biologie, molekulární genetiky a nádorové imunologie. Bylo schváleno 6 léků pro léčbu pokročilého melanomu se čtyřmi rozdílnými mechanismy účinku, při nichž dochází k inhibici blokátorů imunitních kontrolních bodů CTLA-4 či PD-1 a inhibici genů *BRAF*, *MEK* (Bajčiová, 2016a).

Základní léčebnou metodou je odstranění primárního ložiska s dostatečným lemlem okolní zdravé tkáně (zhruba 0,5-2 cm podle tloušťky nádoru) do dostatečné hloubky. Chirurgické odstranění nádoru znamená u tenkých melanomů prakticky stoprocentní vyléčení. Radioterapie se používá tam, kde není možné chirurgické odstranění a chemoterapie má význam pouze paliativní, ale používá se hlavně u plicních a jaterních metastáz (Ditrichová a Tichý, 2006).

Jednou z novějších chirurgických technik je operace sentinelové uzliny, která může pacienta ochránit před invazivnějším chirurgickým postupem. Zjistilo se, že lymfa, a tedy i nádorové buňky přestupují nejprve do jedné uzliny, tzv. sentinelové a teprve pak se šíří do dalších v okolí. Sentinelová uzlina je označena izotopem a patentní modří a dermatochirurg hledá úplně první lymfatickou uzlinu, která filtruje tkáňový mok z oblasti s nádorem. Sentinelová uzlina je poté vyjmuta a vyšetřena histopatologicky. Pokud se v ní najdou nádorové buňky, provede se následné odstranění všech uzlin ve spádové oblasti. Velikou výhodou této techniky je, že místo odstranění všech mízních uzlin ve spádové oblasti se při negativním výsledku odstraní pouze jedna uzlina (Arenbergerová a Arenberger, 2005).

2.5 Prognóza

Prognóza onemocnění souvisí zejména s hloubkou invaze podle Clarka a celkovou tloušťkou nádoru dle Breslowa (Chudnovsky et al., 2005; Ryška et al., 2017).

Nejdůležitějším ukazatelem je tloušťka nádoru podle Breslowa (viz Tab. II). Léze tloušťky menší než 0,75 mm mají velmi malé riziko diseminace. S narůstající tloušťkou se toto riziko zvyšuje a největší riziko činí tloušťka 4 a více mm. Příznivými známkami je tenký nádor, nepřítomnost exulcerace, časné stádium, nepřítomnost klinických změn v nádoru a přídatných ložisek a nepronikání nádorových buněk do cév (Vorlíček et al., 2012). Prognóza je také příznivá, pokud se melanom vyskytuje na povrchu, pokud však proniká vertikálně do hlubších vrstev, prognóza se rapidně zhoršuje. Proto je velice důležitá včasná diagnostika melanomu. Z klasifikace a prognózy vyplývá, že za časnou diagnostiku je považován melanom s hodnotou Breslowa do 1 mm (Arenbergerová a Arenberger, 2005; Kodet a Krajsová, 2017).

Tab. II: Klasifikace podle Breslowa (Šlampa et al., 2007).

Stupeň postižení dle Breslowa	Hloubka invaze melanomu
Tis	Melanom in situ
pT1	Tloušťka nádoru méně než 0,75 mm
pT2	Tloušťka nádoru 0,75 – 1,5 mm
pT3	Tloušťka nádoru 1,5 – 4 mm
pT4	Tloušťka nádoru více než 4 mm

Melanom může metastazovat do lymfatických uzlin a také hematogenně v podstatě kamkoliv, nejčastěji do kůže, podkoží, plic, jater, CNS, kostní dřeně, ale také do vcelku raritních míst jako je srdce, slezina či štítná žláza. Přičemž kožní metastázy jsou známkou minimálně třetího stádia nádoru. Prognóza maligního melanomu je vždy závažná a při vzdálených metastázách se medián přežití pohybuje okolo 7 měsíců (Ditrichová a Tichý, 2006; Ryška et al., 2017).

Důležitá je i tzv. dispenzarizace neboli aktivní sledování osob s odstraněným melanomem kvůli vzniku metastáz, které se mohou objevit i 10 let po jeho odstranění. Pravidelně jsou tedy prováděna klinická vyšetření kůže a lymfatických uzlin a další zobrazovací vyšetření jako RTG plic, sonografie břicha a lymfatických uzlin, biochemické vyšetření krve nebo magnetická rezonance (MRI) a CT (Arenbergerová a Arenberger, 2005).

2.6 Pediatrický melanom

Pediatrický melanom je definován jako melanom vyskytující se u dětí od narození do 21 let věku. Maligní melanom u dětí a dospívajících patří mezi vzácná maligní onemocnění, ale je u dětí nejčastějším typem kožního zhoubného nádoru. Dle věku, ve kterém se melanom vyskytne, se rozděluje do 4 skupin:

- kongenitální melanom – je diagnostikován prenatálně a při narození a vzniká transplacentárním přenosem;
- neonatální (infantilní) – je diagnostikován od narození do 1 roku věku;
- dětský – je diagnostikován od 1 roku do 13 let;
- adolescentní – je diagnostikován od 13 do 21 let (Mills a Mesina, 2009).

Dle dat National Cancer Database je pediatrický melanom častější u dívek (55 %), u nichž se vyskytuje především na horních a dolních končetinách a trupu, u chlapců se vyskytuje výrazně více ve věkové skupině od 1 do 4 let s výskytem na hlavě a krku (Lange et al., 2007; Bajčiová, 2016b).

V České republice bylo v roce 2017 u pacientů do 24 let diagnostikováno 31 případů maligního melanomu. Ze všech případů melanomu v tomto roce tak mladí pacienti tvoří 1,2 % (ÚZIS ČR, 2019. [online]). Maligní melanom patří mezi nádory s nejrychleji stoupající incidencí a přesunem do mladších věkových kategorií. U mladistvých do 24 let je meziroční nárůst incidence až 20 % ročně, nejvíce ve skupině od 15 do 24 let (Bajčiová, 2016b).

Příčina vzniku maligního melanomu u dětí není přesně známá a zřejmě se jedná o multifaktoriální proces podobně jako u dospělých i s mutacemi genů *CDKN2A*, *BRAF*, *PTEN*, ale liší se frekvence těchto mutací. Studie Whiteman et al. (1997) zkoumala melanomy u pacientů mladších 15 let a frekvence mutací *CDKN2A* byla velmi nízká, pouze u 1 z 31 případů, přičemž tento pacient měl silnou rodinnou anamnézu melanomu. Podobnou studii publikovali Youl et al. (2002), kde mutace *CDKN2A* byla nalezena pouze u 2 ze 147 pacientů ve věku 15-19 let. Proto není zcela jasné, zda má pediatrický melanom stejný či jiný mechanismus vzniku (Lu et al., 2015; Bajčiová, 2016b). Diagnóza u těchto pacientů je problematická hlavně kvůli vzácnému výskytu tohoto onemocnění v nízkém věku. Ve srovnání s dospělými však mají melanomy u pacientů mladších 20 let obvykle větší rozměry a tloušťku (Mills a Mesina, 2009).

3 Genetika maligního melanomu

Mnoho studií provedených v průběhu několika desetiletí na benigních a maligních melanocytických lézích a na melanomových buněčných liniích poukázalo na četné geny účastníci se vývoje a progresu melanomu. Maligní melanom má ze všech nádorů nejširší spektrum mutací signálních drah. Maligní transformace není důsledkem mutace jednoho genu, a tak mutací popsanych u maligního melanomu je velké množství, z nichž nejdůležitější jsou germinální mutace genů *CDNK2A*, *CDK4*, *MC1R*, *RBI* a *TP53*, somatické mutace protoonkogenů *BRAF*, *NRAS*, *KIT* a tumorsupresorických genů *CCDN1* a *PTEN* (Chudnovsky et al., 2005; Bajčiová, 2016a).

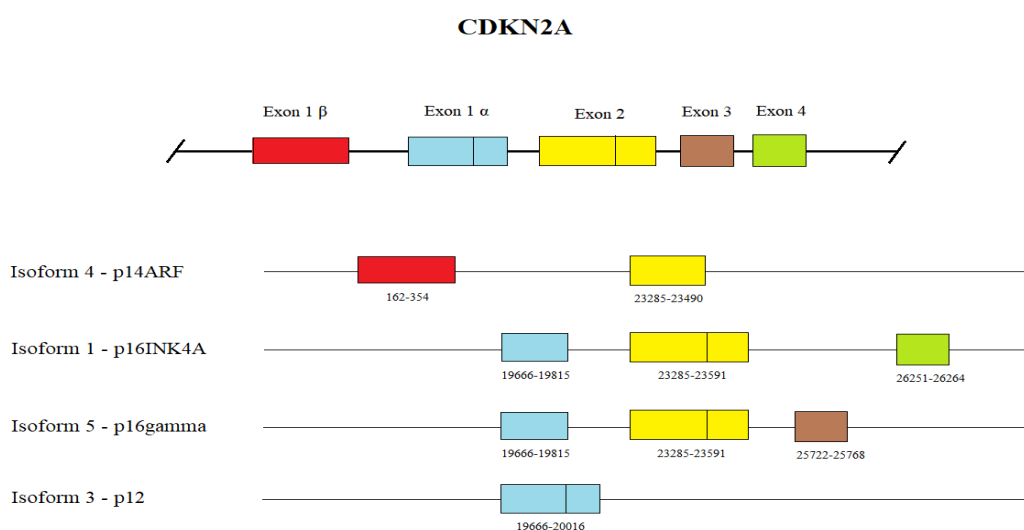
Melanom, podobně jako jiné malignity, vzniká v důsledku akumulace mutací v genech kritických pro buněčnou proliferaci, diferenciaci a buněčnou smrt (Hanahan a Weinberg, 2011; Bajčiová, 2016a). Přibližně 5-10 % všech melanomů je dědičného charakteru a přítomnost melanomu v rodině přináší vyšší riziko vzniku melanomu. Familiární maligní melanom je onemocnění s autozomálně dominantní dědičností, ale otázka genetické predispozice k malignímu melanomu je velice komplikovaná. V současnosti je popsáno několik genů, jejichž mutace může způsobit dědičnou predispozici ke vzniku maligního melanomu. Nejčastěji zmiňovanými mutacemi jsou mutace v genech *CDKN2A* a *CDK4* (Hayward, 2003; Gandini et al., 2005b; Macháčková et al., 2008). Familiární melanom je charakteristický výskytem u pacientů mladších 40 let, kdy ve studii Goldstein et al. (1994) byl průměrný věk diagnózy 33 let a u 9 % pacientů došlo k rozvoji melanomu před 20. rokem života ve srovnání se 2 % u běžné populace.

V následujících kapitolách budou popsány jednotlivé geny predisponující k melanomu.

3.1 *CDKN2A*

Na základě shromažďování informací o rodinách jedinců s melanomem byl jako kandidátní lokus, který hraje rozhodující roli v predispozici k familiárnímu melanomu, zvolen lokus 9p21, tedy gen *CDKN2A* (Cannon-Albright et al., 1992). *CDKN2A* neboli cyklin-dependent kinase inhibitor 2A, se nachází na 9. chromozomu v oblasti 9p21.3. Gen *CDKN2A* patří mezi nejčastější místa genetické změny u lidské rakoviny. Delece tohoto lokusu byla pozorována u glioblastomu, melanomu, pankreatického adenokarcinomu, nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu močového měchýře a orofaryngeálního karcinomu a u celé řady dalších malignit (Ruas a Peters, 1998; Zhao et al., 2016; Biomarkers: *CDKN2A*. [online]).

Gen *CDKN2A* kóduje informace pro tvorbu několika proteinů (viz Obr. 4) přes různé čtecí rámce. Nejvíce studované jsou proteiny p16^{INK4A} a p14^{ARF}, které oba fungují jako tumor supresory, což znamená, že udržují buňky tak, aby nerostly a nedělily se nekontrolovaně. Oba proteiny se také podílejí na zastavení buněčného dělení ve starších buňkách. Tyto dva proteiny sdílejí druhý exon, ale mají odlišné promotory a první exon (1 α pro p16^{INK4A} a 1 β pro p14^{ARF}). Je také důležité, že první exony se spojují do různých čtecích rámců v exonu 2 a proto jsou proteiny translatovány v alternativních čtecích rámcích a nemají homologii aminokyselin (Sharpless et al., 2003; CDKN2A gene. [online]).



Obr. 4: Izofomy genu *CDKN2A* (převzato a upraveno dle CDKN2A [online]).

3.1.1 Mutace genu *CDKN2A* s nefamiliárním výskytem

Gen *CDKN2A* je zodpovědný za asi 25-50 % hereditárních melanomů a 0,2-2 % sporadických melanomů. Kromě rizika melanomů mohou mít přenašeči také zhruba 11-17 % riziko vzniku nádorů pankreatu (Hussussian et al., 1994; Begg et al., 2005; Hocker et al., 2008; Foretová et al., 2009; Vasen et al., 2000).

Většina zárodečných mutací se vyskytuje v exonech 1 α a 2, což naznačuje, že p16^{INK4A} je funkčně dominantní složkou *CDKN2A*. Byly také popsány i vzácnější hluboké intronové mutace, i když se celosvětově jedná jen o velmi málo případů (Harland et al., 2001, Harland et al., 2005a; Tsao et al., 2012). Tyto mutace by se však mohly stát středem zájmu u pacientů, u nichž nelze jednoznačně prokázat jinou mutaci v kódujících oblastech genů predisponujících k melanomu.

Výskyt zárodečných mutací v genu *CDKN2A* je v populaci velmi nízký. V první populační studii zaměřené na melanomy v Queenslandu v Austrálii bylo pouze 0,2 % všech melanomů způsobeno mutacemi tohoto genu (Aitken et al., 1999). V dalších studiích melanomů v Severní Americe, Itálii a Austrálii byla prevalence mutace okolo 2 % (Begg et al., 2005) a ve studii z roku 2011 v řecké populaci bylo 5 % melanomů způsobeno mutacemi genu *CDKN2A* (Nikolaou et al., 2011). Poslední populační studie je z roku 2015 z Queenslandu, kde mělo spojitost s mutací v genu *CDKN2A* 1,31 % melanomů (Aoude et al., 2015).

3.1.2 Mutace genu *CDKN2A* a její familiární výskyt

Frekvence mutací genu *CDKN2A* je výrazně vyšší u pacientů s rodinnou historií melanomu než u pacientů bez ní, což prokazuje např. studie Puig et al. (2005), kdy mutace byla přítomna u 35,5 % pacientů s melanomem v rodině a u 8,2 % pacientů bez rodinné anamnézy. Navíc u pacientů s rodinnou anamnézou a mutací p16-Leiden (c.225_243del, rs730881674), což je nejčastější mutace u familiárního melanomu v Nizozemsku, došlo k rozvoji melanomu o 15,3 roku dříve než u kontrolních pacientů bez rodinné anamnézy (van der Rhee et al., 2011).

Ve skupině pacientů s více primárními melanomy, a tedy vyšší pravděpodobností zvýšené frekvence mutací genu *CDKN2A*, byla tato frekvence relativně nízká v rozmezí od 9 do 15 %, kdy ale opět mnoho pacientů mělo pozitivní rodinnou anamnézu (MacKie et al., 1998; Monzon et al., 1998; Hashemi et al., 2000; Auroy et al., 2001; Pastorino et al., 2008).

Ve studii Bishop et al. (2002) provedené na území Evropy (Francie, Itálie, Nizozemsko, Anglie a Švédsko), USA a Austrálie mělo z 320 melanomových pacientů z rodin postižených melanomem 291 (91 %) přítomno mutaci v genu *CDKN2A*. Bylo také testováno 713 nepostižených členů rodin, z nichž 194 (27 %) bylo nositelem mutace. Celková penetrace byla vypočtena na 0,3 ve věku 50 let a 0,67 ve věku 80 let. Statisticky významný byl také vliv prostředí, ve kterém pacienti žijí. Ve věku 50 let byla penetrace vypočtena na 0,13 v Evropě, 0,5 v USA a 0,32 v Austrálii, ve věku 80 let pak 0,58 v Evropě, 0,76 v USA a 0,91 v Austrálii. Tato studie tedy naznačuje, že penetrace se liší dle incidence melanomu, a tedy stejné faktory, které ovlivňují incidenci melanomu, mohou ovlivňovat penetraci *CDKN2A*.

Největší celosvětová studie, která byla dosud publikována na toto téma je studie Goldstein et al. (2006), která zahrnovala celkem 466 rodin (2137 jedinců) s nejméně

3 případy melanomu v rodině. Mutace genu *CDKN2A* byla detekována ve 190 rodinách (41 %), z toho 178 případů se týkalo izoformy p16^{INK4A}. Celkem bylo v této studii detekováno 66 různých mutací, které byly ve 40 % detekovány v exonu 1α a v 53 % v exonu 2, přičemž nejčastější z nich jsou uvedeny v tabulce III i s jejich nejčastějším geografickým výskytem.

Tab. III: Nejčastější mutace genu *CDKN2A* (Goldstein et al., 2006).

Exon	Mutace	Počet rodin s mutací	Nejvyšší výskyt
5'UTR	c.-34G>T	11	Severní Amerika (8)
Exon 1α	c.32_33ins9-32	6	UK, Austrálie, Severní Amerika (2)
Exon 1α	c.71G>C	9	UK, Austrálie (3)
Exon 1α	c.95T>C	6	UK, Austrálie (3)
Exon 2	c.159G>A	19	UK (10)
Exon 2	c.225_243del19	21	Holandsko (18)
Exon 2	c.301G>T	16	Španělsko + Itálie (9)
Exon 2	c.331_332insGTC	11	Švédsko (11)
Exon 2	c.377 T>A	7	Severní Amerika (6)
Intron 2	c.IVS2-105A>G	11	UK (7), Austrálie (3)

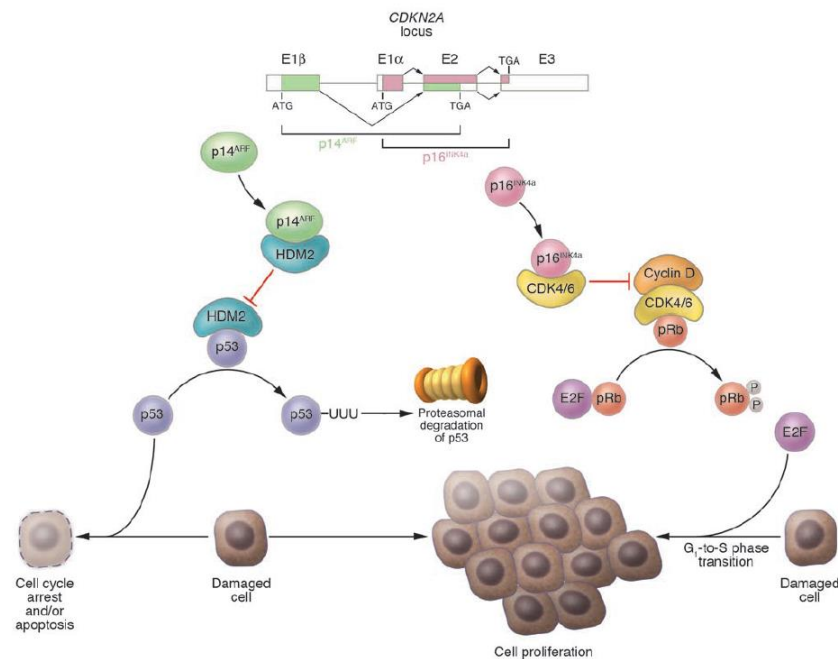
Do celosvětové studie Goldstein et al. (2007) bylo zahrnuto 358 rodin se 1720 pacienty postižených melanomem. Mutace byla přítomna u 39 % (150) rodin a frekvence mutací se pohybovala od 20 % v Austrálii tedy v regionu s nejvyšší mírou výskytu melanomu, 45 % v Severní Americe až do 57 % v Evropě tedy v regionu s nejnižší mírou výskytu, což může být způsobeno rozdílnými příčinami vzniku melanomu než jen mutacemi genu *CDKN2A*.

3.1.3 p16^{INK4A}

Nejdůležitější izoformou genu *CDKN2A* je izoforma p16^{INK4A}, která se účastní dráhy p16^{INK4A}/CDK4,6/pRb. Inaktivace této dráhy se ukázala jako klíčová pro vznik melanomu. Tato dráha pomáhá řídit G1 fázi buněčného cyklu a nejčastěji je inhibována mutacemi v genu *CDKN2A* a jeho izoformě p16^{INK4A} (Chudnovsky et al., 2005). Celá tato dráha zahrnuje mutace, které predisponují jedince k melanomu, a proto je důležité brát v potaz celou tuto signální dráhu v souvislosti s potlačením melanomu u člověka (Chin et al., 2006).

Izoforma p16^{INK4A} se váže na komplex CDK4/6, který normálně stimuluje buňku k pokračování buněčného cyklu a dělení. Nicméně navázáním p16^{INK4A} na tento komplex

nemůže buňka pokračovat do S fáze a dělit se, protože se udržuje pRb v aktivním hypofosforylovaném stavu. Pokud však dojde k mutaci a p16^{INK4A} chybí, komplex naváže cyklin D. Tím dojde k fosforylaci pRb, který uvolní transkripční faktor E2F, který umožní přechod buňky z G1 do S fáze (viz Obr. 5). Rb (retinoblastoma) má za úkol udržovat buňku v interfázi. Buňky produkují p16^{INK4A}, pokud už nejsou schopny se dále dělit (Koh et al., 1995; Chudnovsky et al., 2005; CDKN2A gene. [online]).



Obr. 5: Mechanismus působení p16^{INK4A} a p14^{ARF} v buněčné proliferaci (Chudnovsky et al., 2005).

3.1.3.1 Mutace p16^{INK4A}

Mutace specificky inaktivující p16^{INK4A} se týkají především exonu 1α, ale byly také objeveny polymorfismy v 5' a 3' UTR, které mění translaci či regulují stabilitu p16^{INK4A}, stejně jako mutace promotorové a sestříhové (Hussussian et al., 1994; Fitzgerald et al., 1996; Liu et al., 1999; Kumar et al., 2001; Sharpless, 2004).

Ve studii Monzon et al. (1998) zabývající se pacienty s vícečetnými sporadickými melanomy bez rodinné historie melanomu v severní Americe se ukázala přítomnost mutace *CDKN2A* u 15 % pacientů. Jednalo se o inserce, missense mutace a delece, přičemž 4 z 5 mutací způsobovali dysfunkční protein, který vykazoval zhoršenou vazbu na *CDK4*. U dalších členů rodiny ve třech rodinách byly nalezeny identické mutace vyskytující se u vyšetřovaných pacientů tedy probandů. Navíc se první nádor u pacientů s mnohočetnými primárními melanomy vyvíjí v mladším věku než u pacientů se solitárním melanomem. Frekvence zárodečných mutací *CDKN2A* v této studii (15 %) je podobná jako frekvence

pozorovaná v rodinách postižených melanomem v jižním Ontariu (28 %). Z toho vyplývá, že pacient s vícečetnými melanomy má přibližně stejnou pravděpodobnost výskytu mutace *CDKN2A* jako při jeho familiární dědičnosti. U pacientů s mnohočetnými melanomy bez rodinné anamnézy melanomu je fenotypová exprese mutací *CDKN2A* pravděpodobně ovlivněna dalšími vrozenými či environmentálními faktory.

Studie Soufir et al. (2004) vyšetřila 23 rodin s melanomem. Byly detekovány 4 pravděpodobně patogenní mutace ve třech rodinách a u jednoho pacienta, který měl navíc karcinom pankreatu. Jednalo se o inzerci 24bp lokalizovanou v nukleotidu 23 exonu 1 α (c.9_32dup24, rs 587780668), která pravděpodobně vznikne nesprávným crossing-overem mezi dvěma 24bp opakováními, které se přirozeně vyskytují ve wild type sekvenci. Vložení 8 aminokyselin neovlivňuje vazebnou aktivitu p16^{INK4A} na *CDK4*, ale funkční význam této inserce je nejistý (Monzon et al., 1998). Druhou mutací byla substituce C>G (c.209C>G, rs 786202575) v exonu 2, která způsobuje posun čtecího rámce isoformy p16^{INK4A} (Pro70Arg), ale je neutrální pro p14^{ARF} (Ala184Ala). V případě p16^{INK4A} by mohlo nahrazením prolinu argininem dojít k narušení prostorového uspořádání dvou sousedních helixů. Třetí mutace byla substituce A>C (c.229A>C, rs 1563889628) umístěná také v exonu 2, která mění jak čtecí rámec p16^{INK4A} (Thr77Pro), tak p14^{ARF} (His91Pro). Genotyp *CDKN2A* p16 Thr77 je lokalizován v těsném kontaktu s *CDK6* zapojenou do vazby s p16^{INK4A}, proto tato mutace (*CDKN2A* p16 Thr77Pro) mění terciární strukturu p16^{INK4A} v důsledku chybné interakce s proteinem *CDK4*. Změna u p14^{ARF} je lokalizována v nukleární doméně proteinu, a proto je potenciálně škodlivá i pro její funkci. Čtvrtá mutace pak byla detekována u pacienta, který měl kromě kožního melanomu také karcinom pankreatu a je charakterizována substitucí C>T (c.170C>T, rs 372266620) v nukleotidu 70, která mění čtecí rámec p16^{INK4A} (Ala57Val), ale je neutrální pro p14^{ARF} (Arg71Arg). V případě p16^{INK4A} může dojít ke změně prostorového uspořádání. Kromě toho byla tato mutace ve studii Soufir et al. (1998) popsána jako zárodečná v případě familiárního melanomu.

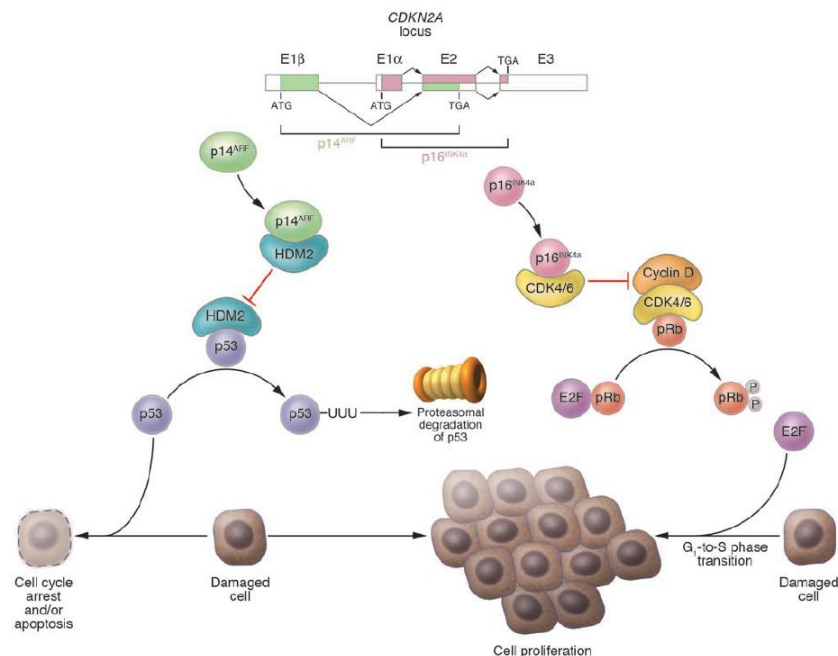
3.1.4 p14^{ARF}

Stejně jako p16^{INK4A}, tak i p14^{ARF} je tumor-supresorový protein., který se ale účastní dráhy p14^{ARF}/HDM2/p53 jejíž inaktivace je stejně jako u dráhy zahrnující p16^{INK4A} klíčová pro vývoj melanomu. Tato dráha pomáhá řídit G1 fázi buněčného cyklu a nejčastěji je

inhibována mutacemi v genu *CDKN2A* a jeho izoformě $p14^{ARF}$ (Zhang a Xiong, 1999; Chudnovsky et al., 2005).

Tato izoforma pomáhá zdržovat buňky v G1 a G2 fázi pomocí interakce s proteiny HDM2 a p53. Za normálních okolností se $p14^{ARF}$ naváže na protein HDM2 a tím podpoří jeho degradaci, což vede k stabilizaci p53. Pokud je ale $p14^{ARF}$ mutován, není schopen této vazby a volný HDM2 označí protein p53 a přednostně ho destrukuje. Protein p53 je důležitý tumor supresorový gen, který je nezbytný pro regulaci buněčného cyklu tím, že odhaluje poškozenou DNA. Destrukce toho proteinu pak vede k proliferaci poškozených buněk, a ne k jejich apoptóze (viz Obr. 6). Jak p53, tak $p14^{ARF}$ se vyskytují především v buňkách, které už nejsou schopny se dále dělit (Pomerantz et al., 1998; Chudnovsky et al., 2005).

Mutace poškozující dráhy proteinu p53 vedoucí k její inaktivaci je přítomna prakticky u všech nádorových buněk. U většiny solidních nádorů se jedná přímo o mutaci genu TP53, melanom je však výjimkou. Četné průzkumy prokázaly, že výskyt mutací TP53 v případě melanomu je výrazně méně častý. Např. studie Hocker a Tsao (2007) prokázala mutaci genu TP53 pouze u 13 % melanomů. Navíc k amplifikaci HMD2 dochází pouze u 3-5 % lidských melanomů, z čehož vyplývá, že mutace vedoucí k melanomu se musí vyskytovat jinde v této dráze, a to především v genu *CDKN2A* (Muthusamy et al., 2006; Hocker a Tsao, 2007; Hocker et al., 2008).



Obr. 6: Mechanismus působení $p16^{INK4A}$ a $p14^{ARF}$ v buněčné proliferaci (Chudnovsky et al., 2005).

3.1.4.1 Mutace p14^{ARF}

Mutace, které ovlivňují výlučně exon 1 β a tedy izoformu p14^{ARF}, jsou vzácné, což vedlo k domněnce, že p16^{INK4A} hraje v predispozici k melanomu rozhodující roli. Ve studii Harland et al. (2005b) bylo prokázáno 5 zárodečných mutací u rodin s melanomem v exonu 1 β na donorovém sestřihovém místě, které neměli žádnou jinou mutaci p16^{INK4A} či genu *CDK4*. Předpokládá se, že tyto mutace vedou k aberantnímu proteinu, což potvrzuje jejich roli v predispozici k melanomu, i když jejich přesná role doposud nebyla prokázána. Na druhé straně v případě mutací ve sdíleném exonu 2 se zdá, že cílí především na transkript p16^{INK4A} než na p14^{ARF}. Dříve se předpokládalo, že změny v tomto exonu vedou k inaktivaci obou transkriptů. Studie Yang et al. (2005) však zjistila, že změny jsou závažnější pro p16^{INK4A} než pro p14^{ARF}. Exon 2 je však v případě p14^{ARF} nutný ke správné funkci dráhy p14^{ARF}/HDM2/p53 a pro plnou aktivitu p14^{ARF} důležitou pro stabilizaci p53 a proto mutace, které ovlivňují jak p16^{INK4A}, tak p14^{ARF} mohou být pro p14^{ARF} taktéž velmi závažné (Zhang a Xiong, 1999). Transkript je p14^{ARF} silným tumor-supresorem *in vivo* např. u myši. Pozorování u lidí pak potvrdilo významné role v potlačení melanomu *in vivo* pro oba produkty, jak p16^{INK4A}, tak i p14^{ARF} (Hewitt et al., 2002).

Studie Randerson-Moor et al. (2001) zjistila delecii p14^{ARF} u dvou rodin s melanomem a řadou nádorů nervového systému. Z této studie vyplývá, že mutace p14^{ARF} predisponují jedince nejen k melanomu, ale také k nádorům nervového systému. Zda je v těchto rodinách přítomna i mutace p16^{INK4A} není z této studie jasné, a proto nelze zcela říci, že tyto nádory jsou způsobeny pouze delecí p14^{ARF}. To potvrzuje i studie Petronzelli et al. (2001), která zkoumala mutace u rodiny s 9 případy melanomů, u čtyř z nich se také vyvinuly neurofibromy. Tato rodina nese zárodečnou mutaci v exonu 2, která ovlivňuje jak p16^{INK4A}, tak p14^{ARF} a oba transkripty jsou tedy defektní.

V mnoha dalších studiích bylo objeveno velké množství dalších mutací, jak benigních, tak patogenních, z nichž nejčastější včetně jejich vlivu na transkripty p16^{INK4A} i p14^{ARF} jsou uvedeny v tabulce IV.

Tab. IV: Nejčastější mutace v genu *CDKN2A* včetně jejich účinku (Borg et al., 2000; Yakobson et al., 2000; Hewitt et al., 2002; Goldstein, 2004; Begg et al., 2005; Goldstein et al., 2006; Orlow et al., 2007; Ghiorzo et al., 2012).

Mutace	Exon	Změna u p16 ^{INK4A}	Změna u p14 ^{ARF}	Účinek mutace
c.-34 G>T	5'UTR	Novel AUG	Beze změny	Snižuje transkripci p16 ^{INK4A}
c.71 G>C	1α	R24P	Beze změny	Snížená nebo nulová vazba na CDK4/6
c.79 G>T	1α	E27X	Beze změny	Předčasný stop kodon
c.95 T>C	1α	L32P	Beze změny	Neschopnost vazby na CDK4/6
c.132 C>A	1α	Y44stop	Beze změny	Částečná nebo úplná neschopnost zastavení růstu
c.131_132insA	1α	Y44stop	Beze změny	Částečná nebo úplná neschopnost zastavení růstu
c.334 G>C	1β	Beze změny	G122R	Zřejmě ovlivňuje sestřih ARF
c.159 G>A	2	M53I	D109N	Snížená nebo nulová vazba na CDK4/6 Částečná nebo úplná neschopnost zastavení růstu
c.301 G>T	2	G101W	R156L	Snížená nebo nulová vazba na CDK4/6 Částečná nebo úplná neschopnost zastavení růstu Inhibice fosforylace Rb Nestabilita proteinu
c.331_332insGTC	2	p.R112_L113insR	Beze změny	Neschopnost vazby na CD4/6
c.377 T>A	2	V126D	Beze změny	Snížená nebo nulová vazba na CDK4/6
c.212 A>G	2	N71S	Beze změny	Snížená nebo nulová vazba na CDK4/6 Částečná nebo úplná neschopnost zastavení růstu
c.247 C>T	2	H83Y	A138V	Snížená nebo nulová vazba na CDK4/6 Částečná nebo úplná neschopnost zastavení růstu Inhibice fosforylace Rb Nestabilita proteinu
c.365 G>T	2	G122V	Beze změny	Nestabilita proteinu
c.IVS2-105 A>G	Intron 2			Ovlivňuje sestřih

3.1.5 Další izoformy genu *CDKN2A*

Mezi další z hlediska své funkce zřejmě méně významné, a proto méně prostudované izoformy genu *CDKN2A* se řadí izoformy p12, p16^γ, p19 a smARF. Kódující oblast izoformy p12 se částečně shoduje s p16^{INK4A}, kdy mají společný promotor a exon 1α, p12 má však navíc alternativní donorovou oblast intronu 2 s terminačním kodónem a má tedy jiný C-konec než p16^{INK4A}, a proto neinteraguje s *CDK4*. Protein p12 je exprimován především v pankreatu a v nádorových buňkách potlačuje jejich růst. Přesná funkce p12 však dosud není zcela známá, ale dle recentních výzkumů p12 představuje potenciální tumor-supresor, jehož inaktivace je významně asociována s výskytem karcinomu pankreatu (Poi et al., 2013).

Izoforma p16^γ má identický exon 1α a 2 s p16^{INK4A} a odlišný exon 2γ. S p16^{INK4A} se shoduje i v terciární struktuře a také reguluje buněčný cyklus inhibicí *CDK4* (Lin et al., 2007).

Izoformy p19 a smARF jsou exprimované u myši a jsou homology k p14^{ARF}. Izoforma p19 je delší než p14^{ARF}, ale má stejnou funkci, a to inhibici proliferaci interakcí s MDM2 (homolog HDM2 u myši) (Ouelle et al., 1995). Izoforma smARF je kratší než p14^{ARF} a její funkcí je indukce apoptózy (Reef et al., 2007).

3.2 *CDK4*

Gen *CDK4* (cyklin-dependent kinase 4) se nachází na chromozomu 12 v oblasti 12q14.1. Tento gen kóduje protein, který je členem Ser/Thr protein kinázové rodiny. Je to katalytická podjednotka protein kinázového komplexu, který je nezbytný pro progresi G1 fáze buněčného cyklu. Bylo prokázáno, že je také zodpovědný za fosforylaci genového produktu retinoblastoma (Rb) (*CDK4* gene. [online]). *CDK4* se účastní stejné dráhy jako p16^{INK4A}. Proto pokud dojde k mutaci v genu *CDK4*, nedojde k navázání p16^{INK4A} na komplex *CDK4/6* a dojde k inaktivaci pRb a přechodu buňky do S fáze (Chudnovsky et al., 2005; Hocker et al., 2008). Tím, že se *CDK4* a *CDKN2A* účastní stejné regulační dráhy, klinické charakteristiky melanomů jako je průměrný věk či průměrný počet melanomů se u pacientů s těmito mutacemi neliší (Goldstein et al., 2000).

Klíčové mutace genu *CDK4* byly prozatím potvrzeny pouze v několika rodinách. Jedinými objevenými mutacemi jsou mutace R24C (c.70C>T, CGT→TGT) nebo R24H (c.71G>A, CGT→CAT), které se vyskytují jak u sporadického, tak familiárního melanomu (Zuo et al., 1996; Soufir et al., 1998; Tsao et al., 1998; Chudnovsky et al., 2005; Karagianni et al., 2018). K těmto mutacím, které jsou vzácnou příčinou melanomu, dochází

v konzervovaném zbytku argininu v pozici 24, který je rozhodující pro vazbu p16^{INK4A} na *CDK4*. Substituce této aminokyseliny vede ke zrušení interakce s p16^{INK4A} a ke zrušení schopnosti inaktivovat kinázu. To má za následek zvýšení fosforylace pRb navázaného na transkripční faktor E2F a zvýšené uvolňování tohoto faktoru, který následně podporuje přechod buňky do S fáze (Hayward, 2003; Tsao et al., 2012). Pacienti, kteří nesli tyto zárodečné mutace, nemají přítomnou mutaci p16^{INK4A}, což zároveň naznačuje, že inaktivace p16^{INK4A} a aktivace *CDK4* se vzájemně vylučují (Chin et al., 2006). Stejná mutace (*CDK4* R24H) byla prokázána také u pacienta s rodinnou anamnézou melanomu v Lotyšsku. Zajímavé je, že pro lotyšskou populaci jsou mutace genu *CDKN2A* vzácnější než mutace genu *CDK4* (Pjanova et al., 2007; Veinalde et al., 2013).

CG dinukleotid je potenciálním methylačním místem a jako takový je náchylný k mutacím, protože metylovaný cytosin může spontánně deaminovat za vzniku thyminu. Pokud dojde k metylaci v *CDK4* v kodonu 24 (CGT), tak tímto mechanismem lze vysvětlit jak mutaci TGT, tak CAT. Kodon 24 tedy může sloužit jako mutační hotspot. Z toho také vyplývá, že negativní selekce může být důležitá k zabránění dalším mutacím tohoto genu postihující jeho funkci (Molven et al., 2005).

Studie Muthusamy et al. (2006) prokázala v melanomových buňkách nadměrnou expresi genů *CDK4* a *HDM2* bez ovlivnění exprese p16^{INK4A} a p14^{ARF}, což jsou geny, které jsou v melanomech běžně mutovány. Toto zjištění naznačuje, že amplifikace *CDK4* a *HDM2* může nahradit ztrátu funkce p16^{INK4A} či p14^{ARF}.

3.3 *MC1R*

Gen *MC1R* neboli melanocortin 1 receptor se nachází na chromozomu 16 v pozici 16q24.3. Lidský gen *MC1R* kóduje 317aminokyselinový receptor spřažený s G-proteiny (Rees, 2004). *MC1R* je exprimován v melanocytech, ale také např. v keratinocytech, zánětlivých buňkách či dermálních buňkách (Böhm et al., 2002; Luger et al., 2003). Je umístěn na povrchu melanocytů a hraje důležitou roli v normální pigmentaci, kdy kontroluje, jaký typ melaninu je produkován. Pokud je aktivován, stimuluje tvorbu eumelaninu, pokud není aktivován nebo je blokován je stimulována tvorba pheomelaninu, který nechrání pokožku před UV zářením. Obvyklé polymorfismy tohoto genu jsou spojeny s normálními rozdíly v barvě kůže a vlasů. Některé polymorfismy jsou častější u lidí se světlou pokožkou a vlasy a tyto polymorfismy snižují schopnost *MRC1R* stimulovat produkci eumelaninu, tudíž dochází

k tvorbě především pheomelaninu a tedy ke zvýšenému riziku vzniku melanomu (Valverde et al., 1995; MC1R gene. [online]).

Studie naznačují, že jiné změny v tomto genu mohou také zvyšovat riziko vzniku melanomu bez poškození kůže UV zářením. V těchto případech se může melanom vyskytnout i u lidí s tmavší pletí. To je často spojeno s mutacemi v dalších genech, jako jsou geny *BRAF* a *CDKN2A* (MC1R gene. [online]). Studie Fagnoli et al. (2008) na italské populaci pak potvrdila hypotézu Landi et al. (2006), která spojovala různé polymorfismy genu *MC1R* s *BRAF*-mutantními melanomy, přičemž u melanomů bez *BRAF* mutace tato spojitost prokázána nebyla.

MC1R gen byl zkoumán v rodinách s mutacemi genu *CDKN2A*. Bylo zjištěno, že u jedinců, kteří nesli nějaký polymorfismus v genu *MC1R* a mutaci *CDKN2A* došlo k rozvoji melanomu v dřívějším věku než pouze u jedinců s mutací *CDKN2A* (Box et al., 2001; van der Velden et al., 2001). Studie Debniak et al. (2006) poukázala na asociaci mutací *MC1R* s melanomovým rizikem a toto riziko se zvyšuje aditivně, pokud pacienti mají také přítomnou mutaci A148T genu *CDKN2A*. Tato mutace spolu s mutací R151C genu *MC1R* vede až ke čtyřnásobnému zvýšení rizika vzniku maligního melanomu.

3.4 *BRAF*

BRAF je serin/treoninová protein kináza aktivovaná fosforylovanou formou RAS proteinu působící v RAS/RAF/MAPK signální dráze a nachází se na chromozomu 7 v pozici 7q34. Gen *BRAF* je protoonkogen, který je zodpovědný za regulaci mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK), která hraje hlavní roli v progresi melanomů regulací buněčné proliferace, diferenciaci a smrti (Bhatia et al., 2015).

Nejčastěji se vyskytující mutací *BRAF* je V600E v exonu 15, která vede k aktivaci MAPK dráhy a rozvoji rakoviny (Bhatia et al., 2015). Tato mutace představuje 90 % všech *BRAF* mutací v melanomu (Goydos et al., 2005). Vzácnější je pak záměna V600K a V600R, kdy V600K se vyskytuje často u starších pacientů a u pacientů s chronickým poškozením UV zářením (Menzies et al., 2012). Somatické onkogenní mutace genu *BRAF* jsou nejčastěji mutovanými onkogeny u kožních melanomů vyskytující se u 40-60 % pacientů s melanomem, a to především u melanomů, které vznikají u jedinců, jejichž kůže nebyla tolik poškozena UV zářením a často se vyskytují ve spojení s mutací genu *MC1R* (Fagnoli et al., 2008; Lee et al., 2010). Mutace *BRAF* byla nalezena také u jiných nádorových onemocnění jako je např. zhoubný nádor plic, sarkom, karcinom vaječníku,

zhoubný nádor prsu či jater, ale vždy už u menšího množství případů než v případě melanomu (Davies et al., 2002).

Studie Bezić et al. (2019) zkoumala klinickopatologické rysy u $BRAF^{V600E}$ mutovaných melanomů, kdy tyto melanomy byly spojeny s mladším věkem, s ženským pohlavím a častěji se nacházely na končetinách.

Prognostický význam mutací $BRAF$ u maligního melanomu zůstává kontroverzní. Existují studie, které prokázaly špatné přežití u pacientů s mutací $BRAF$ (Ardekani et al., 2012), zatímco jiné nezjistily žádnou souvislost (Edlunch-Rose et al., 2006). Studie Tas a Erturk (2020) zkoumala prognostický význam mutací genu $BRAF^{V600E}$, kdy do studie bylo zahrnuto 151 pacientů s melanomem, u kterých byla tato mutace přítomna v 51 %, a to především u mladších pacientů a také u melanomů nacházejících se na horních končetinách, hrudi, hlavě a krku. Dolní končetiny pak byly postiženy u pacientů bez mutace V600E. Zjistili také, že pacienti s touto mutací měli lepší celkovou dobu přežití ve stádiích III a IV ve srovnání s pacienty bez mutace. Došli tedy k názoru, že mutace V600E by mohla u pacientů s melanomem znamenat snížené riziko relapsu a metastáz, ale že její prognostický význam by měl být ještě zkoumán ve větších studiích. Diagnostika mutace $BRAF^{V600E}$ však zůstává důležitá pro výběr pacientů, u kterých lze použít léčbu BRAF inhibitory, jako je vemurafenib a dabrafenib. Maldonado et al. (2003) došli ke stejnému závěru, že se mutace $BRAF^{V600E}$ téměř nevyskytuje u melanomů nacházejících se na místech neexponovaných slunci, jako jsou dlaně či chodidla. Souhrnně lze tedy říci, že nerovnoměrná distribuce této mutace u různých melanomů naznačuje odlišné genetické dráhy, které vedou ke vzniku nádoru.

Mutace $BRAF^{V600E}$ byla ve studii Kozak et al. (2020) zjišťována v cirkulující nádorové DNA (cfDNA) izolované z plazmy pacientů s metastatickým melanomem léčených BRAF inhibitory. Mutace v cfDNA byla nalezena u 77 % pacientů na začátku léčby a u 29 % po 4-8 týdnech léčby. Pacienti s mutací V600E zjištěnou na začátku léčby měli kratší dobu přežití bez progresu onemocnění než pacienti bez mutace V600E na začátku léčby. Nedetekovaná mutace V600E v cfDNA byla spojena s příznivou prognózou. Studie Calbet-Llopart et al. (2020) sledovala mutaci $BRAF^{V600E}$ v cfDNA u pacientů s melanomem a bez melanomu. U pacientů ve stádiu IV byla tato mutace detekována u 71 % případů, ve stádiu III u 15 % pacientů a u pacientů bez melanomu u 1,4 %. Mutace však nebyla nalezena u vyléčených pacientů bez relapsu delšího než 3 roky. Z výsledků těchto studií vyplývá, že analýza mutace $BRAF^{V600E}$ je významným biomarkerem pro sledování prognózy a odpovědi na léčbu u pacientů s metastatickým melanomem.

4 Další potenciálně predisponující geny

Kromě charakteristických změn signálních drah p16^{INK4A} a p14^{ARF} odhalilo genomické profilování lidského melanomu vysoce přeskupený melanomový genom, což svědčí o heterogenitě této choroby. Zkoumání této heterogenity a dalších potenciálních predisponujících genů může vést k pochopení patogeneze onemocnění a možné reakci na terapii.

4.1 *NQO1*

Jedním z takových potenciálně predisponujících genů by mohl být i gen *NQO1* neboli NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza, který se nachází chromozomu 16 v pozici 16q22.1. Gen *NQO1* zahrnuje 6 exonů, 5 intronů a kóduje 274 aminokyselin (Ross et al., 2000). Protein NQO1 vykazuje nejvyšší expresi v ledvinách, kosterních svalech a plicích, zatímco nejnižší exprese se objevuje v buňkách pankreatu (Jaiswal, 1994). NQO1 je hlavně cytosolový enzym a je přítomen téměř ve všech typech tkání, které poskytují ochranu proti různým stresům, včetně xenobiotik, oxidantů, UV světla a ionizujícího záření (Garate et al., 2010).

Gen *NQO1* kóduje protein, který využívá NADH nebo NADPH k bioaktivaci i detoxikaci potenciálně mutagenních a karcinogenních chinonů získaných oxidací fenolických metabolitů benzenu. Chinony se vyskytují ve všech organismech jako flavonoidy, tedy koenzymy přenášející elektrony a metabolické konečné produkty oxidace. Komerčně se chinony využívají při výrobě barviv, činění kůží a ve fotografii (Vasiliou et al., 2006).

NQO1 katalyzuje redukci chinonů na hydrochinony, které jsou méně toxické a lépe vylučitelné. Tím dojde ke snížení množství chinonů, které by mohly vstoupit do redoxního cyklu a vést k oxidačnímu stresu a neopláziím, protože chinony a jejich redukované formy-hydrochinony, pokud nejsou eliminovány, představují mutageny, které interagují s DNA (Joseph a Jaiswal, 1998; Lin et al., 2001; Arif et al., 2003). Ne všechny hydrochinony jsou však redoxně stabilní a v některých případech mohou redoxně labilní hydrochinony reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku semichinonů a generovat ROS, které mohou ovlivnit proteiny, lipidy a funkce DNA. O chinony soutěží NQO1 s NADPH-cytochromem P450, který přeměňuje chinony na hydrochinony za vzniku velmi reaktivního meziprojektu semichinonu a vedlejšího produktu superoxidanionradikálu, který vyvolává oxidační stres (Jaiswal et al., 1988; Joseph a Jaiswal, 1998; Ross et al., 2000).

Moran et al. (1999) použili ve své studii lidské promyeloblasty, aby zjistili schopnost metabolitu benzenu hydrochinonu indukovat aktivitu NQO1 a zjistili, že detoxikační systémy včetně NQO1 a glutathionu chrání organismus před toxicitou vyvolanou metabolity benzenu. Nemutovaný gen *NQO1* tedy chrání buňky před mutační aktivitou chinonů, a především reaktivního meziprojektu semichinonu, ale i následně vznikajících reaktivních forem kyslíku. Nositelé variantního mutantního genotypu (C609T) nemají plně funkční *NQO1*, a proto mají při expozici těmto látkám zvýšené riziko vzniku nádorových onemocnění (NQO1 gene. [online]; Jaiswal et al., 1988).

Indukce NQO1 je zprostředkována výhradně prostřednictvím Keap1/NRF2/ARE dráhy. Keap funguje jako senzor, který při vystavení externím (chemikálie) či interním (stresová reakce) signálům ztrácí schopnost označit NRF2 k degradaci. NRF2 je tedy stabilizován, váže se na ARE a iniciuje expresi cytoprotektivních genů včetně *NQO1* (Dinkova-Kostova et al., 2002; NRF2 gene. [online]).

NQO1 byl dlouho považován za „dobrý“ protein, který chrání člověka před genotoxickým poškozením. Kromě toho bylo zjištěno, že NQO1 je vyžadován při stabilizaci tumor-supresorového p53, jehož degradace je obvykle regulována ubikvitinací. Bylo však zjištěno, že k jeho degradaci může dojít i v reakci nezávislé na ubikvitinu, které se účastní právě NQO1, který stabilizuje p53 a chrání ho před degradací. Jedinci se sníženou aktivitou NQO1 mají sníženou stabilitu p53, což může vést k rezistenci vůči lékům, jako jsou chemoterapeutika (Asher et al., 2005). Vysoká hladina exprese NQO1 byla korelována s četnými lidskými malignitami, což svědčí o její roli v progresi rakoviny a chemorezistenci. Rakovinné buňky díky NQO1 přežijí v relativně vysokém oxidačním stresovém stavu ve srovnání s normálními buňkami, a také jsou rakovinné buňky díky nadměrné expresi NQO1 chráněné před toxickým působením chemoterapeutických látek, což vede k progresi rakoviny. Bylo zjištěno, že inhibitory enzymu NQO1 zlepšují účinky chemoterapeutických látek (Srijawangsa a Na-Bangchang, 2017).

Studii týkajících se *NQO1* a jeho úlohy v patogenezi melanomu bylo doposud publikováno relativně málo a zabývaly se spíše léčbou melanomu. Na druhou stranu bylo zjištěno, že *NQO1* hraje roli v melanogenezi, kdy normální lidské melanocyty byly ošetřeny inhibitory NQO1 a došlo k snížení melanogeneze, zatímco po podání rekombinantního adenoviru byla melanogeneze jasně indukována, a to současně se zvýšením hladiny proteinu TYR, tedy enzymu, který katalyzuje melanogenezi (Choi et al., 2010).

Studie Garate et al. (2010) se pokusila určit expresi a základní funkci NQO1 při proliferaci melanomových buněk a zjistili, že NQO1 je ve většině melanomových buněčných

linií nadměrně exprimován. Expresie této oxidoreduktázy dále významně indukuje progresi buněčného cyklu, což vede k proliferaci melanomových buněk.

Již bylo zmíněno, že většina studií *NQO1* v souvislosti s melanomem se týkala léčiv. Jedním z takových léčiv je i přírodní produkt β -lapachon. Pokud byl spolu s β -lapachonem použit ještě induktor *NQO1* (aktivátor Keap1/NRF2 dráhy, kyselina karnosová) došlo k další expresi *NQO1* prostřednictvím stabilizace NRF2 a tím se zvýšila cytotoxicita β -lapachonu ve všech melanomových buňkách. Z toho tedy vyplývá, že osa *NRF2-NQO1* může být potenciálně využita jako terapeutický cíl u maligního melanomu (Arakawai et al., 2018). β -lapachon použili i ve studii Lamberti et al. (2018), kteří však pozorovali i jeho toxicitu, a proto použili jeho derivát PFB spolu s fotodynamickou terapií, která spočívá v podání fotosenzibilizátoru (PS), po kterém následuje *in situ* radiace viditelným světlem o specifické vlnové délce. Excitace PS vede k řadě fotochemických reakcí a produkci ROS, což ve výsledku vede k indukci *NQO1*. Tím tedy dokázali, že současné použití PFB a fotodynamické terapie zlepšilo terapeutické účinky na melanomové buňky.

Úloha *NQO1* v toxicitě a karcinogenezi byla prokázána na modelu myši *NQO1* (-/-). Tyto myši vykazovaly zvýšenou citlivost na karcinogenezi kůže vyvolanou 7,12-dimethylbenz[a]anthracenem (DMBA). Pokud byla tato látka podávána *NQO1* (-/-) myším a wild type myším, měly po 23 týdnech od prvního podání DMBA *NQO1* (-/-) myši větší nádory s vyšší frekvencí než wild type myši. Přičemž kožní nádor se vyvinul u 100 % *NQO1* (-/-) myši a u 33 % u normálních myši. Z této studie vyplývá, že *NQO1* (-/-) myši jsou náchylnější k rakovině kůže a že *NQO1* může chránit buňky před karcinogenezí. (Long et al., 2001). Ke stejnému výsledku došli i Long et al. (2000) pouze s použitím benzo(a)pyrenu.

Ve studii Iskander et al. (2005) byla u *NQO1* (-/-) myši po podání benzo(a)pyrenového metabolitu benzo(a)pyren-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu pozorována zvýšená frekvence kožních nádorů. Současně také pozorovali nižší indukci p53 a také sníženou apoptózu a došli tedy k názoru, že změněný redoxní stav buňky spolu s nedostatkem indukce p53 hraje významnou roli ve zvýšení citlivosti *NQO1* (-/-) myši na rakovinu kůže indukovanou chemickými látkami. Studium myši s nulovou expresí genu *NQO1* může být základem pro určení úlohy tohoto enzymu v souvislosti s citlivostí na toxicitu a karcinogenezi také u lidí.

Gen *NQO1* není vysoce polymorfním a u člověka byly identifikovány pouze dvě polymorfní varianty genu, a to *NQO1**2 a *NQO1**3 (Maitland-van der Zee a Daly, 2012). Polymorfismus *NQO1**3 vzniká substitucí T za C v pozici 465, která vede ke změně

argininu za tryptofan v pozici 139 (R139W, rs 1131341). Tato záměna vede k produkci enzymu NQO1, který postrádá vazebné místo pro chinon, vykazuje tedy omezenou aktivitu v případě některých substrátů a zřejmě pouze snižuje celkovou expresi proteinu NQO1, aniž by nějak významně ovlivnil jeho přirozenou buněčnou aktivitu ve srovnání s wild type genotypem (Lienhart et al., 2017). Frekvence výskytu variantní alely je v populaci relativně nízká, a to v rozmezí 0-5% (Gaedigk et al., 1998), bez významného vlivu na funkci NQO1 a z tohoto důvodu se stanovení polymorfismu NQO1*3 standardně neprovádí a tedy i tato diplomová práce se dále bude zabývat pouze polymorfismem NQO1*2.

4.1.1 Polymorfismus NQO1*2

Traver et al. (1992, 1997) charakterizovali polymorfismus v genu *NQO1* při kterém dochází k substituci T za C v pozici 609, která vede ke změně prolinu na serin v pozici 187 (P187S, rs1800566). NQO1*1 kóduje normální enzym, zatímco alela NQO1*2 kóduje enzym se sníženou aktivitou a genotyp NQO1*2/*2 má enzym katalyticky neaktivní. Frekvence alely NQO1*2 se v různých etnických populacích pohybuje mezi 0,22 (běloši) až 0,45 (Asiaté). Frekvence genotypu NQO1*2/*2 se pohybovala mezi 4 % u bělochů, 5 % u Afroameričanů, 16 % u mexických Hispánců a 22 % v čínských populacích (Kelsey et al., 1997; Vasiliou et al., 2006).

Polymorfismus C609T v exonu 6 je rizikovým faktorem pro řadu malignit, včetně plic, tlustého střeva, jater, prsu a také pankreatu (Lafuente et al., 2000; Siegel a Ross, 2000; Menzel et al., 2004; Šarmanová et al., 2004; Siegel et al., 2012; Zheng et al., 2014). V metaanalýze Lajin a Alachkar (2013) zahrnující 92 studií s 21178 případy rakoviny byla posouzena kombinace výskytu C609T polymorfismu a malignit. V rámci této metaanalýzy bylo zjištěno, že polymorfismus genu C609T genu *NQO1* je důležitým genetickým rizikovým faktorem u rakoviny, a to zejména u rakoviny močového měchýře.

Studie prokázaly, že homozygotní jedinci s touto mutací (TT) vystavení benzenu mají až 7x vyšší riziko rakoviny kostní dřeně, což může vést např. k aplastické anémii či leukémii (Rothman et al., 1997; Nebert et al., 2002). Fagerholm et al. (2008) zjistili, že homozygotní varianta 609TT silně předpovídá špatné přežití u žen s rakovinou prsu, což je zvláště patrné po chemoterapii epirubicinem a u p53-aberantních nádorů. Přežití po metastázování bylo sníženo u homozygotů NQO1*2*2, což dále implikuje nedostatek *NQO1* v progresi rakoviny a rezistenci na léčbu. Z této studie vyplývá, že genotyp *NQO1* je prognostickým a prediktivním markerem u rakoviny prsu.

Analýza španělské populace složené z 247 pacientů s kolorektálním karcinomem ukázala významnou úlohu variantní alely *NQO1**2 jako rizikového faktoru, a navíc byla tato alela spojena se zvýšenou frekvencí mutací genu *KRAS*, který je také mutován u pacientů s melanomem (Lafuente et al., 2000; Cicenias et al., 2017). Ve spojitosti s genem *NQO1* byly také publikovány pohlavní rozdíly u rakoviny plic, kde ženy nekuřačky, které měly alespoň jednu variantní alelu, měly významně vyšší riziko onemocnění (Saldivar et al., 2005). Pohlavní rozdíly by mohly souviset např. s hormonálními vlivy uvnitř organismu.

Ve studii Sarbia et al. (2003) určovali prevalenci polymorfismu C609T u pacientů s adenokarcinomem jícnu (OAC), srdce (CAC) a žaludku (GAC). Distribuce genotypu *NQO1* C609T byla mezi kontrolami významně odlišná ve srovnání s pacienty s těmito malignitami. Celková frekvence alely 609T byla 0,141 u kontrol, 0,270 u pacientů s OAC, 0,241 u pacientů s CAC a 0,192 u pacientů s GAC. Jednotlivci nesoucí jednu nebo obě 609T alely měli 2,85krát vyšší riziko pro vývoj OAC a 2,18krát vyšší riziko pro vývoj CAC než wild type homozygoti. Z těchto závěrů vyplývá, že určení genotypu *NQO1* může nabýt na významu jako prediktivní marker v budoucích studiích adenokarcinomu horního gastrointestinálního traktu.

NQO1 hraje důležitou roli zejména v léčbě nádorů, chinony totiž představují velkou a rozmanitou skupinu protinádorových léčiv. *NQO1* je exprimován ve vysokých hladinách v celé řadě solidních nádorů, a proto je tento enzym vhodný pro intracelulární aktivaci léčiva. Použití *NQO1* jako prediktivního biomarkeru pro senzitivitu na chinonová protinádorová léčiva je přesvědčivý. Aktivita *NQO1* a jeho exprese lze snadno měřit ve vzorcích biopsie nádorů, ale hladiny *NQO1* se mohou v průběhu času značně lišit působením xenobiotik či faktorů prostředí. Alternativním testem pro predikci exprese *NQO1* tak může být stanovení polymorfismu *NQO1**2, kdy by tento test identifikoval mutované jedince, kteří budou na léčbu reagovat méně příznivě nebo mohou mít zvýšenou toxicitu kvůli neschopnosti aktivovat tyto léky v nádorových buňkách. Je proto důležité v dalších studiích potvrdit, zda *NQO1* a jeho polymorfismus *NQO1**2 hraje klinicky významnou roli v protinádorové aktivitě jednotlivých léků (Siegel et al., 2012). Řada z těchto léků jako např. 17-AAG či mitomycin C by mohla být také používána u léčby melanomu (Demirci et al., 2000; Kasai et al., 2016; Mielczarek-Lewandowska et al., 2020).

NQO1 je tedy důležitým prvkem v protinádorové terapii, ale existuje jen málo informací o tom, zda odpověď na tato léčiva je ovlivněna polymorfismem *NQO1**2. Proto je potřeba dalších studií k testování této hypotézy.

5 Familiární melanom a karcinom pankreatu

Recentní studie poukazují na souvislost mezi výskytem (familiárního) melanomu a dědičným karcinomem pankreatu. Jedná se především o stejné mutace zárodečné linie genu *CDKN2A*. Všechny tyto studie prokazují zvýšené riziko karcinomu pankreatu u rodin s melanomem a mutací v genu *CDKN2A*, ale přesný vztah mezi tímto genem a karcinomem pankreatu zůstává neznámý.

Karcinom pankreatu je vysoce agresivním onemocněním se špatnou prognózou a vysokou mortalitou. Míra přežití 5 let je menší než 5 % a smrt obvykle nastává po 1 roce od diagnózy a pouze u 20 % pacientů může být nádor v době diagnózy odoperován. Problémem je hlavně pozdní diagnostika tohoto onemocnění díky nejednoznačným příznakům. Zhruba 3-10 % karcinomů pankreatu je dědičného charakteru (Bartsch et al., 2002; Lynch et al., 2002).

Stejně jako u melanomu je genetika karcinomu pankreatu značně neznámá. Studie Bartsch et al. (2002) zkoumala frekvenci mutací genu *CDKN2A* u rodin s přítomností melanomu či karcinomem pankreatu. 18 rodin pouze s karcinomem pankreatu nemělo žádnou mutaci, zatímco u 2 z 5 rodin s karcinomem pankreatu i melanomem se vyskytovaly patogenní mutace Q50X a E119X. Jednalo se o mutace postihující izoformu p16^{INK4A}, u izoformy p14^{ARF} nebyla prokázána žádná mutace.

Ghiorzo et al. (2012) testovali 225 jedinců italské populace s karcinomem pankreatu, která ukazuje, že mutace genu *CDKN2A* se vyskytují u 5,7 % z nich s převládající mutací E27X a G101W. U 16 rodin s rakovinou pankreatu byla mutace nalezena u 5 rodin. Tato zjištění naznačují, že tyto rodiny mohou nést různé mutace genu *CDKN2A*, což může být užitečné pro identifikaci rizikových pacientů.

Mutace p16-Leiden (c.225_243 del) je nejčastější mutací genu *CDKN2A* způsobující familiární melanom v Nizozemsku. Tato delece způsobuje posun čtecího rámce, o kterém se předpokládá, že vede k výrazně zkrácenému proteinu p16^{INK4A}. Jedinci s touto mutací také mají 15-20% celoživotní riziko rozvoje rakoviny pankreatu. Ve studii Vasen et al. (2000) byla tato mutace přítomna u 19 rodin z 27 a v těchto rodinách bylo 86 pacientů s melanomem. Druhou nejčastější malignitou byl právě zhoubný nádor pankreatu. V 8 rodinách bez mutace p16-Leiden nebyl ani jeden případ rakoviny pankreatu. Zmiňují však, že tato mutace nemusí být jediným rizikovým faktorem pro rozvoj rakoviny pankreatu, protože mezi rodinami existuje variabilita ve výskytu této malignity (Gruis et al., 1995; Vasen et al., 2000).

Studie Harinck et al. (2012) zpochybnila předpokládanou zbytečnost testování rodin postižených karcinomem pankreatu, ale bez melanomu, na mutace v genu *CDKN2A*. Zkoumali 28 takových rodin a zjistili, že mutace p16-Leiden (c.225_243 del) a mutace c.19_23dup se nachází u 6 rodin. Došli tedy k závěru, že analýza mutací genu *CDKN2A* by měla být zahrnuta také do genetického testování rodin pouze s karcinomem pankreatu.

Studie Lal et al. (2000) prokázala u 2 ze 14 pacientů jak s karcinomem pankreatu, tak melanomem mutace I49S a M53I, přičemž obě varianty vedou ke snížené funkci proteinu *CDKN2A*. Díky těmto výsledkům dospěli k názoru, že vznik pankreatického karcinomu a melanomu není náhoda, ale může v některých případech souviset se zárodečnými mutacemi genu *CDKN2A*. Tato studie také posiluje představu, že genetická predispozice by měla být zvažována u všech pacientů s více různými primárními malignitami.

Další studie německé populace naopak naznačuje, že mutace genu *CDKN2A* se nevyskytují u pacientů s karcinomem pankreatu v rodině, z čehož vyplývá, že je nepravděpodobné, aby mutace tohoto genu byly ukazatelem predispozice ke karcinomu pankreatu, pokud současně není v rodině diagnóza melanomu (Slater et al., 2010).

Z těchto studií vyplývá, že analýza genu *CDKN2A* by měla být zahrnuta do genetického testování v rodinách, které mají v rodinné anamnéze jak melanom, tak karcinom pankreatu. Stejným způsobem by na vyšetření mutací *CDKN2A* měli být testovány i rodiny pouze s karcinomem pankreatu. Tím by došlo k lepšímu rozpoznávání osob ohrožených karcinomem pankreatu a melanomem.

Z důvodů popsaných výše proto byly pro naši studii vybráni nejen pacienti s melanomem v rodině, ale také s výskytem karcinomu pankreatu v rodině. Bohužel jsme nezískali data ani od jednoho pacienta přímo s karcinomem pankreatu vzhledem ke špatné prognóze tohoto onemocnění.

6 Cíle práce

Hlavním cílem experimentální části bylo otestovat pacienty, kteří měli v rodině melanom či karcinomem pankreatu. Rozdělení dílčích částí experimentů bylo následovné:

- i. Získání dobrovolníků pro studii.
- ii. Praktické zvládnutí vybraných laboratorních metod v laboratoři klinické genetiky.
- iii. Zjištění mutací v genu *CDKN2A*, *CDK4* a *NQO1* u účastníků studie.
- iv. Vytvoření dotazníku pro pacienty a jeho zpracování.
- v. Zpracování získaných dat.

7 Materiál a metody

Praktická část mé diplomové práce byla vykonána v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích pod vedením Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. V praktické části se věnuji analýze sledovaných mutací a polymorfismů v genech *CDKN2A*, *CDK4* a *NQO1*. Mutace a polymorfismy v genech *CDKN2A* a *CDK4* byly vyšetřeny metodou PCR a mutace v genu *NQO1* pomocí metody PCR-RFLP. V rámci praktické části bylo analyzováno 35 dobrovolníků. 25 experimentů bylo prováděno s DNA izolovanou z bukálního stěru, kde vyšetřovaným materiálem jsou epiteliální buňky z ústní sliznice a 10 experimentů bylo provedeno s DNA izolovanou z periferní krve, kde vyšetřovaným materiálem jsou leukocyty.

Analýza genu *CDKN2A* zahrnovala stanovení mutací ve vybraných exonových oblastech (exony 1 α , 1 β , 2, 3 a 4), některých intronových oblastech a exon-intronových přechodech.

Analýza genu *CDK4* zahrnovala stanovení mutací v exonu 2.

Analýza genu *NQO1* zahrnovala stanovení alelové varianty NQO1*2, která vzniká substitucí thyminu za cytosin v nukleotidové pozici 609, a nemutované varianty genu NQO1*1 (wild type).

7.1 Účastníci studie

V rámci výzkumu bylo nutné vyhledat dobrovolníky s výskytem melanomu či karcinomu pankreatu v rodině. Celkem se studie zúčastnilo 35 dobrovolníků (20 žen a 15 mužů). Všichni dobrovolníci byli s výzkumem seznámeni a podepsali informovaný souhlas s účastí ve výzkumu, který byl přiložen ke každé odběrové bukální soupravě, či byl předán pacientovi osobně. Informovaný souhlas je uveden v Příloze 2.

7.1.1 Dotazník

Pro získání dalších informací o pacientech byl vytvořen on-line dotazník týkající se jejich zdravotního stavu a zdravotního stavu jejich rodinných příslušníků. Otázky byly formulovány následovně, např.: „Byl Vám při vyšetření kůže diagnostikován kožní nádor (melanom)?“; „Vyskytuje se ve Vaší rodině někdo jiný s diagnostikovaným melanomem?“. Dotazník je uveden v Příloze 3. Data získaná z dotazníku byla následně statisticky zpracována.

7.1.2 Odběr biologického materiálu

V rámci výzkumu byly odebrány primární vzorky periferní krve či bukálního stěru pro izolaci DNA u všech 35 selektivně vybraných dobrovolníků. Odběrové soupravy pro bukální stěr (Isohelix SK1 Buccal Swab) byly pacientům zaslány poštou nebo předány osobně. Periferní krev byla odebírána v Biochemické laboratoři EUC Kliniky v Českých Budějovicích. Bukální stěr i periferní krev byli ihned zpracovány tak, aby nedošlo k jejich znehodnocení.

7.2 Izolace DNA

Izolace DNA probíhala z bukálního stěru či periferní krve. Vzhledem k malým odchylkám ve výsledné koncentraci DNA nebyla volba primárního zdroje DNA zásadní. Pouze u jednoho pacienta, který provedl bukální stěr, bylo zažádáno o nový odběr kvůli nízké koncentraci DNA.

7.2.1 Izolace DNA z bukálního stěru

Izolace DNA ze stěru bukální sliznice byla prováděna pomocí izolačního kitu GeneAll ExGeneTM Clinic SV mini dle doporučení výrobce. Reagenty izolačního kitu jsou uvedeny níže (Tab. V).

Odchytky od protokolu doporučeného výrobcem jsou v použitých koncentracích reagentů. Dále se lišili některé kroky postupu, kdy první krok s přidáním PBS pufru byl vynechán a došlo pouze k přidání proteínasy K a BL pufru. V posledním kroku bylo přidáno 50 μ l místo doporučených 200 μ l elučního AE pufru z důvodu získání vyšší koncentrace izolátu DNA. Následovala inkubace při pokojové teplotě (RT) prodloužená na dobu 5 min. místo doporučené 1 minuty. Tento eluční krok byl opakován tak, že získaný objem ze zkumavky byl napipetován zpět na kolonku a zopakována byla také inkubace prodloužená na 5 min. a centrifugace. Po zopakování byly u všech vzorků kolonky odstraněny a u vzorků bylo provedeno měření koncentrace DNA. Vyizolovaná a řádně označená DNA byla skladována v mrazicím boxu při -20 °C.

Tab. V: Reagenty izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini použité pro 1 izolační reakci z bukalního stěru.

Reagenty	Objem (μl)
Proteinasa K	40
BL buffer	400
BW buffer	600
TW buffer	700
AE buffer	50

7.2.2 Izolace DNA z plné krve

Izolace DNA z plné krve byla prováděna pomocí izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini dle doporučení výrobce. Reagenty izolačního kitu jsou uvedeny níže (Tab. VI).

Odchytky od protokolu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini jsou pouze v posledním kroku, kdy bylo přidáno 50 μl místo doporučených 200 μl elučního AE pufru z důvodu získání vyšší koncentrace izolátu DNA a následovala inkubace při pokojové teplotě (RT) po dobu 5 min. místo doporučené 1 minuty. Tento eluční krok byl opakován tak, že získaný objem ze zkumavky byl napipetován zpět na kolonku a zopakována byla také inkubace prodloužená na 5 min. a centrifugace. Po zopakování byly u všech vzorků kolonky odstraněny a u vzorků bylo provedeno měření koncentrace DNA. Vyizolovaná a řádně označená DNA byla skladována v mrazicím boxu při -20 °C.

Tab. VI: Reagenty izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini použité pro 1 izolační reakci z plné krve.

Reagenty	Objem (μl)
Proteinasa K	20
BL buffer	200
100% ethanol	200
BW buffer	600
TW buffer	700
AE buffer	50

7.3 Fluorometrie

Koncentrace DNA u všech vzorků byla měřena fluorometrem (*Qubit Fluorometr 2.0, Thermo Fisher Scientific*) za použití kitu QubitTM dsDNA HS Assay (*Invitrogen*). Reagenty kitu jsou uvedeny níže (Tab. VII). Po vytemperování všech reagensů na RT byl připraven zásobní roztok. Bylo smícháno 199 μ l QubitTM dsDNA BR pufru s 1 μ l QubitTM dsDNA BR reagentu a směs byla pomocí stolní centrifugy (*Microspin FV-2400; Biosan*) vortexována a stočena. Pro přípravu standardů bylo ve dvou mikrozkušavkách QubitTM assay tubes smícháno 190 μ l zásobního roztoku s 10 μ l příslušných standardů. Pomocí roztoků obsahujících standardy byl fluorometr zkalibrován a připraven pro měření koncentrace DNA u vzorků.

Pro měření vzorků bylo smícháno 198 μ l zásobního roztoku se 2 μ l měřené DNA ve speciálních mikrozkušavkách QubitTM assay tubes. Směs byla krátce zvortexována a inkubována při RT alespoň 2 minuty. Následně byla změřena koncentrace u všech vzorků DNA na zkalibrovaném fluorometru.

Tab. VII: Reagenty kitu QubitTM dsDNA HS Assay (*Invitrogen*) použité pro měření koncentrace DNA.

Reagenty	Objem (μ l)
Qubit dsDNA BR buffer	199
Qubit dsDNA BR reagent	1
Qubit dsDNA BR standard #1	10
Qubit dsDNA BR standard #2	10

7.4 Analýza genů *CDKN2A* a *CDK4*

Pro analýzu genů *CDKN2A* a *CDK4* se využívá metoda PCR. Během PCR se v požadovaném vzorku amplifikují úseky DNA o různých velikostech. Analýza genu *CDKN2A* zahrnovala stanovení mutací v exonových oblastech (exony 1 α , 1 β , 2, 3 a 4), některých intronových oblastech a exon-intronových přechodech. Analýza genu *CDK4* zahrnovala stanovení mutací exonu 2. Po PCR reakci došlo k přečištění produktů a jejich sekvenaci v externí firmě SEQme s.r.o. Analýza sekvenačních reakcí byla provedena opět v laboratoři pomocí programu Chromas.

7.4.1 PCR

Po izolaci DNA a změření její koncentrace byly pomocí metody PCR specificky amplifikovány oblasti genu *CDKN2A* a *CDK4*. Jeden vzorek byl problematický jak nízkou koncentrací DNA, tak zřejmě i přítomností inhibitorů a PCR reakce byla několikrát opakována i se změnou vstupního množství DNA, změnou použité polymerázy či modifikací reakčního protokolu. Ani jeden přístup se však neosvědčil, a proto bylo požádáno o nový odběr, který byl zpracován původním postupem popsáním níže.

Pro PCR amplifikaci byly použity specifické primery uvedené v tabulce VIII. Sekvence primerů byly převzaty z Biopstické laboratoře v Plzni a primery byly vyrobeny firmou Elisabeth Pharmacon, spol. s r. o.

Tab. VIII: Sekvence primerů pro PCR reakci.

	PCR reakce	Exon/intron	Směr	Sekvence primeru 5'-3'	Velikost templátu (bp)
Gen <i>CDKN2A</i>	1	1 β	F	AGTTAAGGGGGCAGGAGTG	333
			R	AAACAAAACAAGTGCCGAATG	
	2	1 α	F	ACCGGAGGAAGAAAGAGGAG	510
			R	CCCTTCAGATCTTCTCAGCATT	
	3	2	F	AGCTTCCTTTCCGTCATGC	399
			R	GGGTACAAATTCTCAGATCATCA	
	4	3	F	CAGAAGCCAGAGCACATGAA	156
			R	CAGCTTGCATAACCAAAGG	
	5	4	F	GGTAGGGACGGCAAGAGAG	168
			R	CCTGTAGGACCTTCGGTGAC	
	6	Intron 4	F	TACATGCACGTGAAGCCATT	159
			R	TTCTTTCAATCGGGGATGTC	
Gen <i>CDK4</i>	7	2	F	GCGACTTTTGGTGATAGGAGTC	292
			R	CAACCCTCCACCACCTTCT	

Nejprve bylo potřeba připravit tzv. master mix. K tomu byl použit kit MyTaq™ Red DNA polymerase (*Bioline*) dle doporučení výrobce. Pro větší výtěžnost PCR reakce byl navíc použit dimethylsulfoxid (DMSO). Reagencie a jejich objemy použité pro přípravu mastermixu jsou uvedeny níže (Tab. IX). Příprava PCR mixu byla prováděna v chladícím stojanu v PCR boxu. Do 1,5 ml mikrozkušavky byla napipetována deionizovaná H₂O, 5x MyTaq Red Reaction Buffer, MyTaq Red DNA polymerase, DMSO, forward a reverse primery. Výsledný objem jedné reakce byl 48μl. Do mastermixu byly následně připipetovány 2 μl izolátu DNA. Zkušavka byla následně zvortexována a stočena v minicentrifuze (*Microspin FV-2400; BioSan*).

Tab. IX: Složení 1 PCR reakce.

Reagenty	Objem (μl)
deionizovaná H ₂ O	34
5x MyTaq Red Reaction Buffer	10
MyTaq Red DNA polymerase 5U/μl	0,5
DMSO (100%)	2,5
Forward primer (20 pmol)	0,5
Reverse primer (20 pmol)	0,5

Průběh PCR reakce je uveden v tabulce X. Pro amplifikaci byl použit gradientový PCR cycler (*MultiGene, Labnet*). Po PCR amplifikaci byly PCR produkty vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (*viz kapitola 7.6 Gelová elektroforéza*).

Tab. X: Průběh PCR reakce.

1 cyklus	Teplota (°C)	Čas (min)
Denaturace	95	9
40 cyklů	Teplota (°C)	Čas (min)
Denaturace	95	1
Annealing	60	1
Elongace	72	1
1 cyklus	Teplota (°C)	Čas (min)
Finální elongace	72	7

7.4.2 Přečištění PCR produktů genu *CDKN2A* a *CDK4*

7.4.2.1 GeneAll Expin™ Combo GP kit

Po provedení PCR reakce byly PCR produkty přečištěny pomocí GeneAll Expin™ Combo GP kitu, jehož reagenty jsou uvedeny v tabulce XI.

Odchylka od protokolu je pouze v posledním kroku, kdy bylo přidáno 10-30 μl ddH₂O (podle kvality PCR produktu) namísto doporučených 50 μl .

Po přečištění byly vzorky vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (viz kapitola 7.6 *Gelová elektroforéza*). Takto přečištěné vzorky byly připraveny pro sekvenační reakce.

Tab. XI: Reagenty GeneAll Expin™ Combo GP kitu použité k přečištění 1 vzorku.

Reagenty	Objem (μl)
PCR produkt	45
PB buffer	225
NW buffer	700
ddH ₂ O	10-30

7.4.2.2 ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup

Pokud po PCR reakci nebyly PCR produkty na gelové elektroforéze dobře viditelné, byly přečištěny enzymaticky pomocí ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup, jehož reagenty jsou uvedeny v tabulce XII. Po smíchání reagentů byla směs pomocí PCR cycleru (*MultiGene*, *Labnet*) inkubována 15 min. při 37 °C kvůli degradaci zbývajících primerů a nukleotidů a dále byla směs inkubována 15 min. při 80 °C kvůli inaktivaci ExoSAP-IT™ činidla. Takto přečištěné vzorky byly připraveny pro sekvenační reakce.

Tab. XII: Reagenty ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup použité k pro přečištění 1 vzorku.

Reagenty	Objem (μl)
PCR produkt	5
ExoSAP-IT™	2

7.4.3 Sekvenační reakce

Přečištěné PCR produkty byly připraveny pro sekvenační analýzu tak, že bylo smícháno potřebné množství přečištěného PCR produktu odpovídající 50 ng DNA (1-5 μ l dle kvality přečištěného PCR produktu) s 10 pmol forward či reverse primerem stejným jako při PCR amplifikaci a směs byla doplněna ddH₂O do 10 μ l. Reagenty pro jeden vzorek jsou uvedeny v tabulce XIII.

Tab. XIII: Složení 1 vzorku pro sekvenaci.

Reagenty	Objem (μ l)
PCR produkt	1-5
Forward či reverse primer	0,5
ddH ₂ O	4,5-7,5

Primery použité pro sekvenaci jsou uvedeny v tabulce XIV. Takto připravené vzorky byly odeslány na sekvenační analýzu firmě SEQme s.r.o. Celkem bylo provedeno 344 sekvenačních reakcí včetně opakování některých problematických reakcí.

Tab. XIV: Primery použité k sekvenační analýze.

	PCR reakce	Směr	Sekvence primeru 5'-3'	Velikost templátu (bp)
Gen <i>CDKN2A</i>	1	F	AGTTAAGGGGGCAGGAGTG	333
	2	F	ACCGGAGGAAGAAAGAGGAG	510
	3	F	AGCTTCCTTTCCGTCATGC	399
	4	R	CAGCTTGCGATAACCAAAGG	156
	5	F	GGTAGGGACGGCAAGAGAG	168
	6	R	TTCTTTCAATCGGGGATGTC	159
Gen <i>CDK4</i>	7	F	GCGACTTTTGGTGATAGGAGTC	292
	8	R	CAACCCTCCACCACCTTCT	292

7.4.4 Analýza dat

Získaná data ze sekvenace od firmy SEQme s.r.o. byla upravena pomocí programu Chromas a pomocí programu BLAST® byly sekvence porovnány s databází sekvencí NCBI. Na základě porovnání sekvenačních dat testovaného vzorku a referenční sekvence ve výše uvedené genové databázi bylo ověřeno, zda jsou pacienti nositelem nějaké mutace. Výsledky sekvenační analýzy budou blíže popsány v kapitole 8.

7.5 Analýza genu *NQO1*

Pro analýzu polymorfismu genu *NQO1* (rs1800566) se využívá metoda PCR-RFLP, která kombinuje dvě metody: polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP). Během PCR se v požadovaném vzorku amplifikuje specifický úsek genu o velikosti 196 bp. Poté se provádí restriční štěpení PCR produktu pomocí restriční endonukleázy Hinf I. V případě výskytu polymorfismu *NQO1**2 se v PCR produktu vyskytuje štěpné místo a Hinf I rozštěpí PCR produkt na fragmenty o jasně definované velikosti, a to 119 bp a 77 bp.

7.5.1 PCR

Po izolaci DNA a změření její koncentrace byl pomocí metody PCR a specifických primerů amplifikován požadovaný úsek genu *NQO1*.

Pro PCR amplifikaci byly použity specifické primery, jejichž sekvence byly převzaty z práce Bian et al. (2008). Primery byly vyrobeny firmou Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o. a jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce XV.

Tab. XV: Sekvence primerů pro PCR reakci.

	Směr	Sekvence primeru 5'-3'	Velikost templátu (bp)
Gen <i>NQO1</i>	F	AAGCCCAGACCAACTTCT	196
	R	GCGTTTCTTCCATCCTTC	

Nejprve bylo potřeba připravit tzv. master mix. K tomu byl použit kit MyTaqTM Red DNA polymerase (*Bioline*) dle doporučení výrobce. Pro větší výtěžnost PCR reakce byl navíc použit DMSO. Reagencie a jejich objemy použité pro přípravu mastermixu jsou uvedeny níže (Tab. XVI). Příprava PCR mixu byla prováděna v chladícím stojanu v PCR boxu. Do 1,5 ml mikroskopavky byla napipetována deionizovaná H₂O, 5x MyTaq Red Reaction Buffer, MyTaq Red DNA polymerase, DMSO, forward a reverse primery. Výsledný objem jedné reakce byl 48μl. Do mastermixu bylo následně připipetováno 1-5 μl izolátu DNA (objem závisel na koncentraci DNA ve vzorku). Do pozitivní kontroly byly napipetovány 2 μl DNA již změřeného vzorku s heterozygotní variantou genu *NQO1* a do druhé pozitivní kontroly byly napipetovány 2μl DNA již změřeného vzorku s homozygotní (wild type) variantou genu *NQO1*. Zkumavky byly následně zvortexovány a stočeny v minicentrifuze (*Microspin FV-2400*; *BioSan*).

Tab. XVI: Složení 1 PCR reakce.

Reagenty	Objem (μl)
deionizovaná H ₂ O	34,3
5x MyTaq Red Reaction Buffer	10
MyTaq DNA Polymerase 5U/μl	0,2
DMSO (100 %)	2,5
Forward pmer (20 pmol)	0,5
Reverse primer (20 pmol)	0,5

Průběh PCR reakce je uveden v tabulce XVII. Pro amplifikaci byl použit gradientový PCR cycler (*MultiGene, Labnet*). Po PCR amplifikaci byly PCR produkty vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (viz kapitola 7.6 *Gelová elektroforéza*).

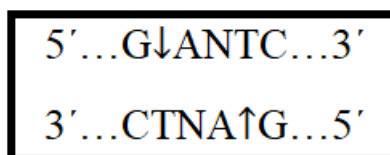
Tab. XVII: Průběh PCR reakce.

1 cyklus	Teplota (°C)	Čas
Denaturace	95	5 min
32 cyklů	Teplota (°C)	Čas
Denaturace	95	30 s
Annealing	55	30 s
Elongace	72	1 min
1 cyklus	Teplota (°C)	Čas
Finální elongace	72	10 min

7.5.2 Restrikční štěpení

Výsledné PCR produkty o velikosti 196 bp byly štěpeny za použití restrikčního enzymu Hinf I. Reagencie použité pro restrikční štěpení jsou uvedeny v tabulce XVIII. Restrikční místo je zobrazeno na obr. 7.

Nejprve bylo potřeba připravit mix pro restrikční štěpení. Do zkumavky bylo napipetováno pro každý vzorek 4,5 μl restrikčního pufru 10x CutSmart a 10 U (1μl) restrikčního enzymu Hinf I dle následného počtu reakcí. Směs restrikčního enzymu a pufru byla pipetou promíchána a stočena. Následně bylo ke každému PCR produktu připipetováno 5,5 μl této směsi a zkumavky byly stočeny pomocí stolní centrifugy (*Microspin FV-2400; BioSan*) a inkubovány v miniinkubátoru (*Mini Incubator, Labnet*) při teplotě 37 °C po dobu minimálně 60 minut. Vizualizace produktů restrikčního štěpení byla provedena pomocí gelové elektroforézy (viz kapitola 7.6 *Gelová elektroforéza*).



Obr. 7: Restrikční místo enzymu Hinf I.

Tab. XVIII: Reagenty použité pro restrikční štěpení 1 PCR produktu.

Reagenty	Objem (μl)
Restrikční enzym Hinf I (10 U/μl)	1
10x Restrikční pufr CutSmart	4,5

7.5.3 Analýza dat

V důsledku záměny nukleotidu C za T na pozici 609 v genu *NQO1* vzniká nové štěpné místo. Restriktáza Hinf I rozštěpí PCR produkt o velikosti 196 bp na 2 fragmenty o velikosti 119 bp a 77 bp. Pokud není přítomna mutovaná alela, PCR produkt se neštěpí. Pokud je v PCR produktu přítomna mutovaná i normální alela vznikají následkem restrikčního štěpení 3 fragmenty o velikosti 196 bp, 119 bp a 77 bp. Výsledky PCR-RFLP budou popsány v kapitole 8.

7.6 Gelová elektroforéza

Po provedení PCR reakce byly PCR produkty vizualizovány pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu. Zásobní roztok 10x TBE byl připraven z prášku 10x TBE Buffer (*Thermo Scientific*), který se rozpustil v deionizované vodě a doplnil se na objem 1 litru deionizovanou vodou. Ze zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok 1x TBE, který byl získán smícháním 50 ml 10x TBE se 450 ml deionizované vody.

Pro přípravu barveného gelu byly použity 4 tablety obsahující 0,5g agarózy (*FastGene Agarose Tablets, Nippon Genetics*), 50 ml 1xTBE a pro vizualizaci 15 μl fluorescenční barvy Midori Green Advanced DNA Stain (*Nippon Genetics*). Směs byla ohřívána, částečně zchlazena a poté nalita do elektroforetické formy s hřebenem, kde také ztuhla. Ztuhlý gel přenesen do elektroforetické vany (*Mupid® One Electrophoresis System*) a zalit roztokem 1xTBE tak, aby byl v pufru zcela ponořen.

Pro kontrolu amplifikace bylo na 4% gel nanášeno v případě 7 amplifikačních reakcí pokrývajících vybrané oblasti genů *CDKN2A*, *CDK4* anebo v případě amplifikační reakce odpovídající genu *NQO1* vždy 5 μl PCR příslušného PCR produktu a 5 μl hmotnostního markeru FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU (*Nippon Genetics*) umožňujícího stanovení přibližné

délky PCR fragmentů. Elektroforéza probíhala zhruba 10 minut při 135 V. Poté byl gel přenesen na detekční systém (*FastGene GelPic LED Box, Nippon Genetics*) a byly odečteny výsledky amplifikace. Stejným způsobem byly také vizualizovány přečištěné PCR produkty použité pro sekvenaci. V případě restrikčního štěpení bylo na gel pipetováno 20 μ l štěpeného PCR produktu.

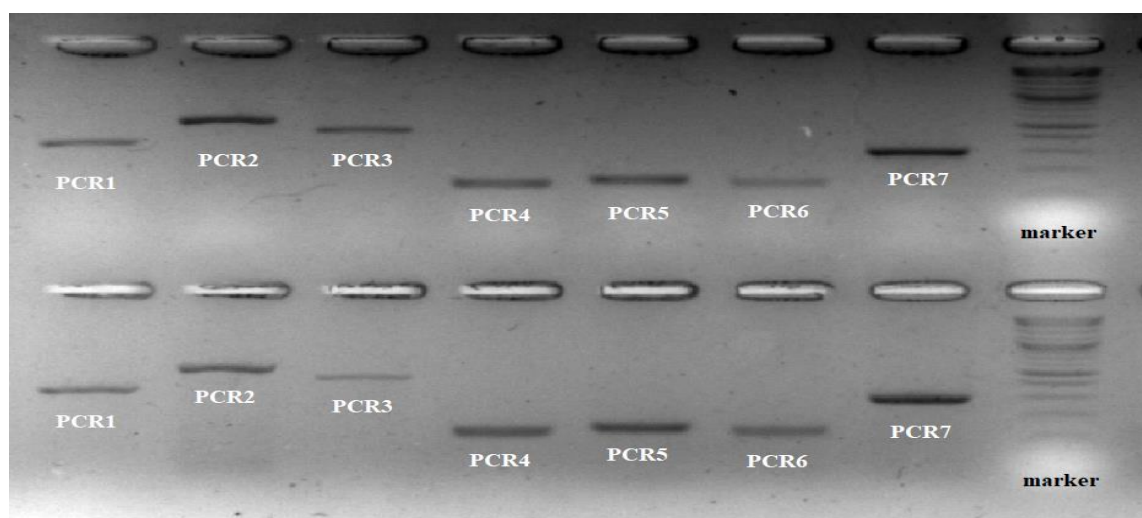
8 Výsledky

8.1 Koncentrace DNA

Koncentrace DNA u izolovaných vzorků se pohybovala v rozmezí od 5,64 do 467 ng/μl (podrobný přehled naměřených koncentrací u jednotlivých vzorků viz Příloha 4), což bylo pro použité metody (PCR, sekvenace, PCR-RFLP) dostačující.

8.2 Zjištěné varianty v genu *CDKN2A* a *CDK4*

Typický výsledek gelové elektroforézy po PCR amplifikaci vybraných oblastí genů *CDKN2A* a *CDK4* je znázorněn na obrázku 8.

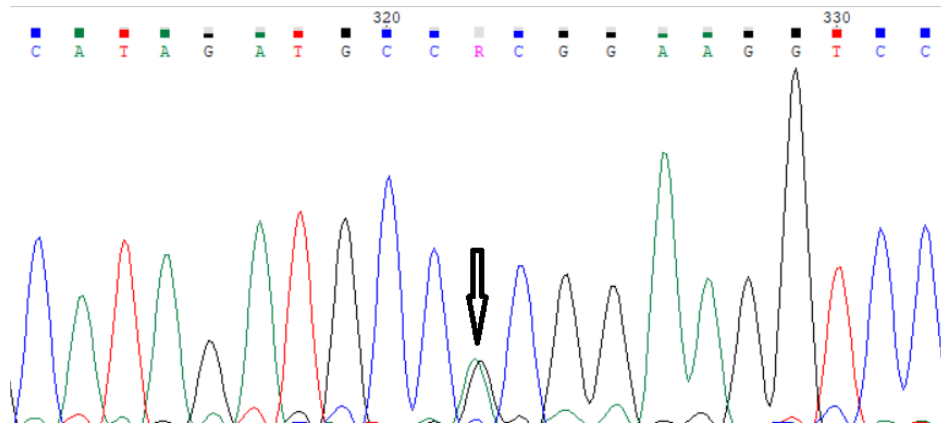


Obr. 8: Vizualizace PCR produktů genu *CDKN2A* a *CDK4* pomocí gelové elektroforézy. PCR1 (333bp), PCR2 (510bp), PCR3 (399bp), PCR4 (156bp), PCR5 (168bp), PCR6 (159bp), PCR7 (292bp), marker – FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU (Nippon Genetics) (zdroj vlastní).

V této diplomové práci byly diagnostikovány dva genové polymorfismy v genu *CDKN2A* a to A148T a c.*29C>G, které budou dále popsány.

8.2.1 Varianta A148T

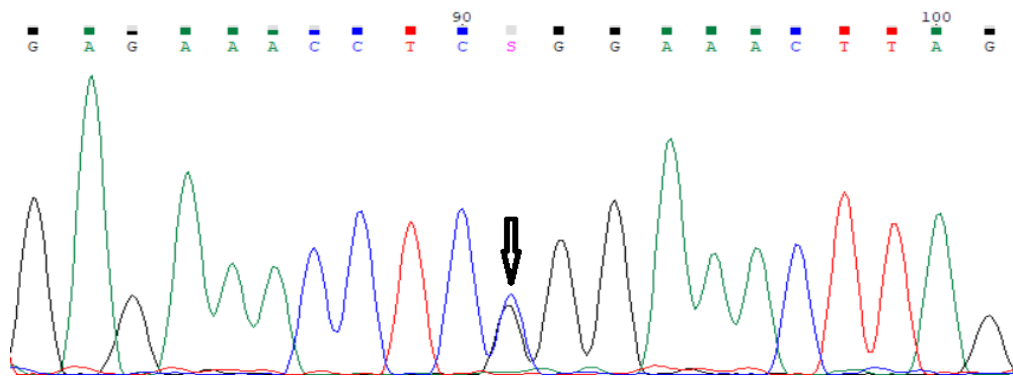
Na základě porovnání sekvencí byl u vzorku č. 10, tedy u pacienta s maligním melanomem v rodině, prokázán výskyt benigní varianty A148T (c.442G>A; rs3731249) v heterozygotním stavu v exonu 2. Při této mutaci dochází k záměně alaninu kódovaného sekvencí GCG za threonin kódovaný sekvencí ACG v kodonu 148. Typický výsledek sekvenace pro heterozygotní stav je vidět na obrázku 9.



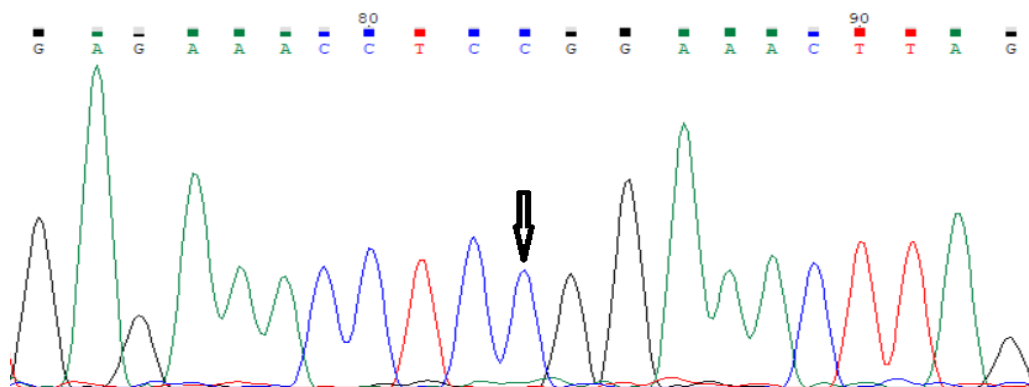
Obr. 9: Příklad sekvenační analýzy genu *CDKN2A*, PCR 3, vzorek č. 10. Černá šipka označuje heterozygotní stav R (G i A) pro benigní mutaci v genu *CDKN2A* c.442G>A (rs3731249) (zdroj vlastní).

8.2.2 Varianta c.*29C>G (C500G, nt 500)

Druhou variantou nalezenou u pacientů byla varianta c.*29C>G (rs11515), která je v literatuře popisována také jako nt500 či C500G. Typický výsledek sekvenace pro heterozygotní stav (CG) je vidět na obrázku 10 a pro homozygotní (wild type) stav (CC) na obrázku 11.



Obr. 10: Výsledek sekvenační analýzy genu *CDKN2A*, PCR5, vzorek č. 34. Černá šipka označuje S (C i G) stav pro *CDKN2A* c.*29C>G (rs11515) (zdroj vlastní).



Obr. 11: Výsledek sekvenační analýzy genu *CDKN2A*, PCR5, vzorek č. 35. Černá šipka označuje homozygotní stav C/C pro genovou variantu genu *CDKN2A* c.*29C>G (rs11515) (zdroj vlastní).

Tab. XIX ukazuje poměrné zastoupení genových variant *CDKN2A* pro c.*29C>G. Heterozygotní genotyp CG byl nalezen u 8 pacientů (22,9 %), homozygotní varianta CC byla prokázána u 27 pacientů (77,1 %). Homozygotní varianta GG se nevyskytovala ani v jednom případě.

Tab. XIX: Zastoupení variant polymorfismu c.*29C>G v této studii.

Genotyp	Počet (%)	Melanom v rodině	Karcinom pankreatu v rodině	Neznámý výskyt melanomu či karcinomu pankreatu v rodině
CC	27 (77,1 %)	16	4	7
CG	8 (22,9 %)	5	1	2
GG	0	--	--	--

Zajímavé je porovnání různých výskytů genotypů c.*29C>G u jednotlivých pacientů. U 6 pacientů, kteří onemocněli maligním melanomem se wild type genotyp CC vyskytoval v pěti případech (83 %) a heterozygotní varianta CG pouze v jednom případě (17 %). Zkoumaný soubor dále zahrnoval 17 účastníků, u nichž se maligní melanom vyskytl v rodině, přičemž varianta CC byla prokázána ve 12 případech (75 %) a varianta CG pak pouze ve 4 případech (25 %). Podobně to bylo u pacientů s výskytem karcinomu pankreatu v rodině, kdy varianta CC se vyskytovala ve 4 případech (80 %) a varianta CG pak pouze v jednom případě (20 %). Od 9 pacientů jsme bohužel nezískali vyplněný dotazník, proto jsme nemohli s jistotou určit rodinnou anamnézu, a zjistit, zda mají pouze maligní melanom nebo i karcinomem pankreatu v rodině.

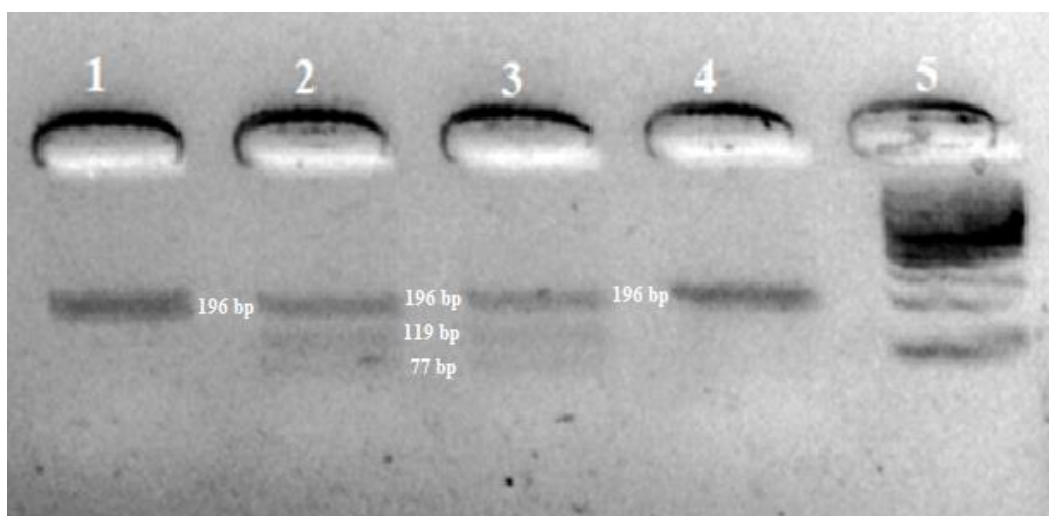
Tab. XX ukazuje poměrné zastoupení variant polymorfismu c.*29C>G v populačních studiích ve srovnání s výsledky této diplomové práce.

Tab. XX: Zastoupení variant polymorfismu c.*29C>G.

	Genlabs s.r.o.	Orlow et al. (2007)	Polakova et al. (2009)
Genotyp	Počet (%)	Počet (%)	Počet (%)
CC	27 (77,1 %)	2645 (73,2 %)	431 (71 %)
CG	8 (22,9 %)	922 (25,5 %)	159 (26 %)
GG	0	46 (1,3 %)	18 (3 %)

8.3 Zjištěné varianty v genu *NQO1*

Typický výsledek gelové elektroforézy po PCR amplifikaci je znázorněn na obrázku 12.



Obr. 12: Vizualizace PCR produktů genu *NQO1* po restrikním štěpení pomocí gelové elektroforézy. Jamka 1 a 4 obsahuje vzorek s genotypem *NQO1**1/*1 (196 bp), jamka 2 a 3 obsahuje vzorek s genotypem *NQO1**1/*2 (fragmenty o velikosti 196 bp, 119 bp a 77 bp) jamka 5 obsahuje hmotnostní marker – FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU (Nippon Genetics) (zdroj vlastní).

V tabulce XXI jsou uvedeny referenční hodnoty pro PCR RFLP popsanou v kapitole 7.5 a pro polymorfismus genu *NQO1*.

Tab. XXI: Referenční hodnoty pro polymorfismus genu *NQO1* C609T.

Štěpený PCR produkt	Výsledný genotyp
196 bp	Nemutovaný homozygot C/C (wild type)
196+119+77	Heterozygot C/T
119+77	Mutovaný homozygot T/T

Tab. XXII pak ukazuje poměrné zastoupení variant polymorfismu genu *NQO1* v této studii. Homozygotní (wild type) genotyp CC byl nalezen celkem u 19 pacientů (68 %) a heterozygotní varianta CT u 9 pacientů (32 %). Homozygotní varianta TT se nevyskytla ani v jednom případě.

Tab. XXII: Zastoupení variant polymorfismu C609T genu *NQO1* této studii.

Genotyp	Počet (%)	Melanom v rodině	Karcinom pankreatu v rodině	Neznámý výskyt melanomu či karcinomu pankreatu v rodině
CC	19 (68 %)	10	4	5
CT	9 (32 %)	5	1	3
TT	0	--	--	--

Zajímavé je opět porovnání, u jakých pacientů se jaký genotyp polymorfismu C609T vyskytoval. U 7 dobrovolníků nebylo možné tento polymorfismus detekovat z důvodu až už malé koncentrace DNA či nedostatku DNA pro analýzu z důvodu opakování sekvenačních reakcí při zjišťování mutací genů *CDKN2A* a *CDK4*. U 6 pacientů s maligním melanomem se genotyp CC vyskytoval u třech pacientů (50 %) a ve třech případech pak heterozygotní genotyp CT (50 %). U 11 dobrovolníků s maligním melanomem v rodině se varianta CC vyskytovala u 8 případů (73 %) a varianta CT pak u 3 případů (27 %). Podobně to bylo u účastníků s karcinomem pankreatu v rodině, kdy varianta CC se vyskytovala u 4 případů (80 %) a heterozygotní varianta CT pak v jednom případě (20 %). Od ostatních pacientů jsme bohužel nezískali vyplněný dotazník, proto jsme nemohli s jistotou určit rodinnou anamnézu, a tedy zda mají pouze maligní melanom či i karcinomem pankreatu v rodině.

Mezi léty 2014-2020 bylo v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. vyšetřeno celkem 126 pacientů na polymorfismus *NQO1* C609T, výsledné frekvence jednotlivých genotypů uvádí tabulka XXIII.

Tab. XXIII: Výsledné frekvence genotypů genu *NQO1* *1/*1 a *NQO1* *1/*2 v laboratoři GENLABS s.r.o.

Genotyp <i>NQO1</i> (rs 1800566)	Počet (%)
CC (*1/*1)	91 (72 %)
CT (*1/*2)	35 (28 %)
TT (*2/*2)	0

8.4 Vyhodnocení on-line dotazníku

Celkem bylo provedeno genetické vyšetření mutací v genech *CDKN2A* a *CDK4* a polymorfismu *NQO1* C609T u 35 dobrovolníků. Pouze 25 z nich vyplnilo on-line dotazník. Sumarizovaná data o výsledku vyšetření a odpovědích z on-line dotazníku jsou znázorněna v tabulce XXIV.

Studie se zúčastnilo 20 žen a 15 mužů a jejich průměrný věk byl 38 let (41 let u žen a 34 let u mužů). U 6 pacientů se vyskytoval maligní melanom přímo a 17 dobrovolníků pak potvrdilo výskyt maligního melanomu v rodinné anamnéze. Ve sledovaném souboru se nevyskytoval ani jeden vzorek od pacienta s karcinomem pankreatu. Vyšetřili jsme však 5 pacientů s karcinomem pankreatu v rodinné anamnéze. Dalších 20 účastníků mělo jinou malignitu v rodině (leukémie, rakovina prsu, rakovina plic, rakovina slinné žlázy, rakovina tlustého střeva, rakovina kostní dřeně a rakovina děložního čípku).

Z 28 pacientů vyšetřených pro polymorfismy *CDKN2A* c.*29C>G a *NQO1* C609T, se pouze v jednom případě nacházeli oba polymorfismy současně v heterozygotním stavu, a to u pacienta s maligním melanomem.

Tab. XXIV: Výsledky vyšetření a data z on-line dotazníku.

Vzorek	Pohlaví	Věk	<i>CDKN2A</i> A148T	<i>CDKN2A</i> c.*29C>G	<i>NQO1</i>	Potvrzená diagnóza MM	MM u jiných členů rodiny	Potvrzená diagnóza KP	KP u jiných členů rodiny	Potvrzená jiná malignita	Potvrzená jiná malignita členů rodiny
1	žena	55	AA	CC	-	0	1	0	0	1	1
2	žena	26	AA	CC	CC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	žena	52	AA	CC	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	žena	43	AA	CC	CT	1	1	0	0	0	1
5	muž	34	AA	CC	CT	0	0	0	1	0	1
6	žena	55	AA	CG	-	0	1	0	0	0	1
7	muž	39	AA	CG	CC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8	muž	14	AA	CC	CC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9	muž	53	AA	CC	CT	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	žena	30	AT	CG	CC	0	1	0	0	0	1
11	muž	65	AA	CC	CC	0	1	0	0	0	1
12	žena	27	AA	CG	CC	0	1	0	0	0	0
13	muž	14	AA	CC	CT	nd	nd	nd	nd	nd	nd
14	muž	7	AA	CC	CT	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	žena	33	AA	CG	CC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
16	muž	29	AA	CC	-	0	1	0	0	0	1
17	žena	28	AA	CC	-	0	1	0	0	0	1
18	žena	49	AA	CC	-	0	1	0	0	0	1
19	žena	59	AA	CC	CC	1	1	0	0	0	0

Vzorek	Pohlaví	Věk	CDKN2A A148T	CDKN2A c.*29C>G	NQO1	Potvrzená diagnóza MM	MM u jiných členů rodiny	Potvrzená diagnóza KP	KP u jiných členů rodiny	Potvrzená jiná malignita	Potvrzená jiná malignita členů rodiny
20	muž	28	AA	CC	CC	0	1	0	0	0	0
21	muž	33	AA	CC	CC	0	1	0	0	0	0
22	žena	45	AA	CC	CC	1	0	0	0	0	1
23	žena	49	AA	CG	CC	0	0	0	1	0	1
24	muž	25	AA	CC	CC	0	0	0	1	0	1
25	muž	26	AA	CC	CC	0	0	0	1	0	1
26	muž	52	AA	CC	CC	0	0	0	1	0	1
27	žena	45	AA	CG	CC	0	1	0	0	0	1
28	muž	43	AA	CC	CC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
29	žena	42	AA	CC	CC	0	1	0	0	0	1
30	žena	62	AA	CC	CT	0	1	0	0	0	1
31	žena	1	AA	CC	-	0	1	0	0	0	1
32	žena	37	AA	CC	CT	1	0	0	0	0	1
33	žena	36	AA	CC	CT	0	1	0	0	0	1
34	muž	43	AA	CG	CT	1	nd	nd	nd	1	nd
35	žena	46	AA	CC	CC	1	0	0	0	0	0

nd – no data, mm – maligní melanom, kp – karcinom pankreatu, mutantní genotyp

9 Diskuse

Cílem této diplomové práce bylo otestovat buď přímo pacienty anebo jejich příbuzné trpící maligním melanomem anebo karcinomem pankreatu na přítomnost mutací v genech *CDKN2A* a *CDK4* a polymorfismu C609T v genu *NQO1*. Celkem bylo geneticky vyšetřeno 35 dobrovolníků. Stěžejním doplněním informací bylo vyplnění on-line dotazníku vedoucího ke zjištění rodinné anamnézy pacientů. Z 35 dobrovolníků vyplnilo dotazník pouze 25, protože dotazník byl účastníkům studie zasílán až zpětně a tito dobrovolníci bohužel nereagovali ani na opakované pokusy o komunikaci. U 10 dobrovolníků jsme tedy nemohli zjištěné genetické varianty přiřadit k jedné či druhé skupině diagnózy, protože u nich nebyla známá celková anamnéza. Co se týče získávání informací o účastnících studie pomocí on-line dotazníku, je na místě připustit, že dotazníky měli být dobrovolníkům posílány rovnou s informovaným souhlasem a odběrovou soupravou na izolaci DNA, čímž by se docílilo vyplnění dotazníků od všech účastníků. Dotazník byl však vytvořen až v průběhu studie a toto již bohužel nebylo možné. Dále by byly zajímavé vzhledem k analyzovaným genům také informace o léčbě a případně i o přítomnosti metastáz u pacientů postižených některým z uvedených typů malignit.

Na základě získaných dat jsme vyšetřili 6 pacientů s maligním melanomem. Zajímavé bylo zjištění, že průměrný věk těchto šesti pacientů v naší kohortě byl 46 let (46 u žen a 43 u mužů), což neodpovídá průměrnému mediánu věku pacientů s maligním melanomem, který je u žen 61 let a u mužů 65 let. Tato skutečnost by mohla být způsobena obecně vyšším povědomím o diagnostice a prevenci melanomu. Dalším důvodem by mohl být také opakovaný výskyt nádorových onemocnění v rodinách těchto pacientů, což jistě vedlo ke zvýšené pozornosti jich samotných a také jejich ošetřujících lékařů z hlediska prevence a včasného zachytu nádorových onemocnění.

V genu *CDKN2A* bylo doposud popsáno 671 různých mutací, z nichž 126 bylo popsáno jako patogenních, 6 jako benigních a 328 jako mutací s nejasným významem. Zbytek se rozděluje do kategorií pravděpodobně benigní, pravděpodobně patogenní či rizikový faktor. Jedná se o mutace asociované nejen s melanomem, ale s různými jinými malignitami (ClinVar. [online]). *CDKN2A* je obrovský gen, který je složen z 27573 bází, přičemž kódující sekvence tvoří pouze 4400 bází, což je 16 % z celkového počtu bází (NCBI Nucleotide [online]; Gene: *CDKN2A* [online]). Z 9 exonů a tedy kódujících oblastí genu jsou standardně sekvenovány pouze ty exony, které tvoří izoformy p16^{INK4A} a p14^{ARF}, tedy exony 1 α , 1 β , 2 a 3. V celém genu se nachází obrovské množství zjištěných mutací

a polymorfismů (viz Příloha 5). Je pravděpodobné, že i mutace v intronových oblastech a 3' a 5' nepřekládaných oblastech mohou potenciálně ovlivňovat funkci genu *CDKN2A*. Příkladem může být intronová mutace c.*102-105A>G (IVS2-105 A/G, rs1060501266) přítomná hluboko v intronu 2, která ovlivňuje sestřih genu *CDKN2A* (Harland et al., 2001). Ve studii Goldstein et al. (2007) byla tato mutace nalezena u 9 rodin z UK a Austrálie a jednalo se o jednu z nejčastějších mutací. Studie Harland et al. (2001) pak stanovila frekvenci výskytu této mutace na 15 % u anglických rodin bez přítomnosti jiných mutací v genu *CDKN2A*. Mutace IVS2-105 A/G byla také zahrnuta do analýz v této diplomové práci. Z tohoto důvodu je důležité, aby byly více prozkoumány právě tyto oblasti, což může vést k porozumění procesu vzniku různých malignit a tím k vývoji nových metod léčby. V této diplomové práci byly v genu *CDKN2A* objeveny 2 varianty a to A148T v exonu 2 a c.*29C>G v 3'UTR oblasti, které budou dále diskutovány. V genu *CDK4* pak nebyla zjištěna žádná mutace.

V online databázi ClinVar a ve většině doposud publikovaných studií je varianta *CDKN2A* A148T pouze polymorfismem a je popisována jako benigní, a tedy nemá vliv na funkčnost transkripční varianty genu *CDKN2A* označovanou jako protein p16^{NK4A} (Lilischkis et al., 1996; Spica et al., 2006; Bertram et al., 2002; NCBI. ClinVar. [online]). Ve studii McKenzie et al. (2010) se tento polymorfismus choval jako protein divokého typu ve všech funkčních testech a byl tedy schopen zastavit buněčný cyklus. Nebylo prokázáno, že by tato mutace ohrozila funkci proteinu, ale dosud publikované studie poukazují na možnou spojitost tohoto polymorfismu s dalšími mutacemi genu *CDKN2A*. Polská analýza kolektivu Debniak et al. z roku 2005 provedena na polské populaci však poukazuje na možnou asociaci této mutace s mírně zvýšeným rizikem vzniku melanomu obzvláště u lidí mladších 50 let. Studie Harland et al. (2014) z Austrálie pak pozorovala skutečně zvýšené riziko spojené s variantou *CDKN2A* A148T, přičemž všechny australské případy měly časný nástup onemocnění, což naznačuje, že účinek této varianty je pravděpodobně silnější v mladším věku. Bakos et al. (2011), kteří se zabývali touto mutací u populace jižní Brazílie, která má největší incidenci melanomu v jižní Americe prokázala vyšší frekvenci této mutace u pacientů s více primárními melanomy či s familiárním výskytem melanomu (21,4 %) než u pacientů se sporadickým melanomem (10,1 %). Funkční testy pak prokázaly, že výsledný variantní protein má sníženou účinnost při inhibici buněčné proliferace ve srovnání s wild typem, což vede k domněnce, že tato varianta není zcela benigní, jak je běžně uváděno ve validovaných klinických databázích. Ve studii Puig et al. (2005) provedené na španělské populaci byla varianta *CDKN2A* A148T identifikována u 13,5 % pacientů s více primárními

melanomy, což je více než u zdravých kontrol (5,45 %). Tyto studie tedy poukazují na možnou asociaci varianty *CDKN2A* A148T s výskytem maligního melanomu. Další studie prokázaly, že varianta *CDKN2A* A148T je nadměrně zastoupena nejen u pacientů s melanomem, ale také u pacientů s rakovinou prsu, plic a močového měchýře a je tedy důležitým prediktorem malignity (Debniak et al., 2006; Borkowska et al., 2011). Zmíněné studie však byly provedeny pouze na polské populaci a jejich výsledky tedy nelze aplikovat na jiné populace. V této diplomové práci byla varianta *CDKN2A* A148T detekována pouze u pacientky (dcery) s výskytem maligního melanomu v rodině (postižená matka), a tedy nelze vyvodit závěry, zda je tato mutace přímo spojena s rizikem vzniku maligního melanomu či nikoliv. Genetická analýza větší skupiny pacientů postižených maligním melanomem v různých populacích by mohla ukázat skutečnou frekvenci této konkrétní mutace. Následně by mohlo být vypočítáno relativní riziko (OR) vzniku maligního melanomu u nositelů této mutace. Je potřeba dalších nezávislých populačních studií týkajících se jak familiárních, tak sporadických melanomů, aby mohlo být s určitostí řečeno, že mutace *CDKN2A* A148T má či nemá dopad na funkci proteinu p16^{INK4A}, a tedy může být považována za patogenní mutaci v případě maligního melanomu.

Druhou zjištěnou mutací v této diplomové práci je mutace *CDKN2A* c.*29C>G nacházející se ve 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) genu. Tato oblast je zodpovědná za správnou regulaci genové exprese na posttranskripční úrovni (lokalizace mRNA, stabilizace mRNA, regulace translace) a tedy jakékoliv narušení v této oblasti může vést k celé řadě onemocnění včetně malignit (López de Silanes et al., 2007; Przybyla et al., 2015). Jakým způsobem tato varianta ovlivňuje riziko melanomu však doposud není jasné. Mohlo by se jednat o změnu stability transkriptu *CDKN2A* nebo o změnu úrovně transkripce, případně by mohla být ve vazebné nerovnováze s dosud neidentifikovanou variantou, která je přímo zodpovědná za zvýšenou citlivost na melanom. Mohlo by také dojít k narušení funkce genu změnou sestřihu mRNA, což vede k přeskokování exonů či k retenci intronů (Mayer et al., 2000). Dle doposud publikovaných studií je tato mutace považována za polymorfismus. Studie Harland et al. (2014) neprokázala žádnou spojitost polymorfismu *CDKN2A* c.*29C>G s rizikem vzniku melanomu, jelikož frekvence této mutace byla 27 % u pacientů s melanomem a 26,8 % u zdravých kontrol. Dle Orlow et al. (2007) přítomnost tohoto polymorfismu vykazuje mírně zvýšené riziko pro vznik melanomu u nositelů homozygotní varianty (CC či GG). Obě uvedené studie ale naznačují, že je potřeba provést další analýzy k potvrzení této hypotézy. Aitken et al. (1999) popisují souvislost *CDKN2A* c.*29C>G s rizikem familiárního melanomu, ale zřejmě až ve spojení s dalšími genetickými faktory.

Frekvence mutované alely byla mírně zvýšená u 514 pacientů s melanomem (14,2 %) ve srovnání s 200 kontrolami (11,1 %). Pokud byly případy melanomů rozděleny na základě familiárního rizika výskytu melanomu, došlo k významnému posunu a polymorfismus *CDKN2A* c.*29C>G měl nejvyšší frekvenci u rodin s některou z mutací *CDKN2A*, a to především u rodin keltského původu (Aitken et al., 1999). Sauroja et al. (2000) publikovali zřejmě nejdůležitější studii týkající se polymorfismu *CDKN2A* c.*29C>G, ve které prokázali, že tento polymorfismus je spojen s výrazně kratší dobou progresu od primárního (diagnózy primárního melanomu) k metastatickému melanomu. U pacientů bez tohoto polymorfismu byla průměrná doba progresu 30 měsíců, zatímco u pacientů s polymorfismem to bylo pouze 6 měsíců. To znamená, že tento polymorfismus může významně ovlivňovat transkripty p16^{INK4A} a p14^{ARF}. Došli k závěru, že sice nelze považovat polymorfismus *CDKN2A* c.*29C>G za hlavní prognostický faktor onemocnění, ale jakékoliv abnormality genu působících jako kontrolní body G1/S fáze buněčného cyklu jsou jedním z nejvýznamnějších faktorů nezbytných pro rozvoj maligního melanomu. Tyto výsledky svědčí o možné úloze tohoto polymorfismu a zřejmě i dalších polymorfismů v 3'UTR při iniciaci a progresi melanomu. K objasnění potenciální asociace polymorfismů v oblasti 3'UTR je potřeba dále vyšetřovat rodiny s těmito polymorfismy.

Polymorfismus *CDKN2A* c.*29C>G byl zkoumán také v souvislosti s jiným typem malignit jako je např. karcinom hlavy a krku, adenokarcinom horní části trávicího traktu či zhoubný nádor vaječníků ale ani v jednom případě nebyla prokázána spojitost mezi tímto polymorfismem a vznikem malignity (Pinheiro et al., 2014; Gedert et al., 2005; Yan et al., 2008). Tento polymorfismus byl v dalších studiích naopak spojován s výskytem kolorektálního karcinomu, rakoviny močového měchýře a rakoviny děložního čípku (McCloud et al., 2004; Sakano et al., 2003; Vargas-Torres et al., 2014). U glioblastomu pak byla tato varianta spojena s horší prognózou a vyšším věkem (Royds et al., 2011). Další studie provedená na indické populaci poukazuje na to, že genotyp CG či GG má protektivní efekt v rozvoji rakoviny vaječníků (Thakur et al., 2012). V České republice byla v souvislosti s tímto polymorfismem publikována pouze jedna studie týkající se kolorektálního karcinomu, která ale nepotvrdila účast genu *CDKN2A* na tomto typu malignity (Polakova et al., 2009).

V této diplomové práci byla nejvíce zastoupena homozygotní varianta CC (wild type) s procentuálním zastoupením 77,1 % a heterozygotní genotyp CG s 22,9 %. Homozygotní genotyp GG nebyl zjištěn ani v jednom případě. Tyto výsledky odpovídají populačním studiím, které ovšem byly provedeny na nesrovnatelně větším vzorku populace viz Tab. XX

v kapitole 8.2.2 *Varianta c.*29C>G (C500G, nt 500)* (Orlow et al., 2007; Polakova et al., 2009). V obou studiích byl nalezen i homozygotní genotyp GG, který se v této diplomové práci nevyskytoval, což by právě mohlo být ovlivněno velikostí vyšetřovaného souboru. Studie srovnatelná jak množstvím pacientů, tak zjištěným zastoupením jednotlivých mutací je studie Veinalde et al. (2013) provedená na lotyšské populaci. Zde bylo vyšetřeno 20 pacientů s maligním melanomem v rodině. Polymorfismus *CDKN2A* A148T byl zjištěn u 2 pacientů (10 %) a polymorfismus *CDKN2A* c.*29C>G u třech pacientů (15 %). Jiná studie týkající se také lotyšské populace se 125 případy maligního melanomu zachytila mutaci *CDKN2A* A148T v 6 % a polymorfismus *CDKN2A* c.*29C>G v 18 % pacientů s maligním melanomem (Pjanova et al., 2007).

Dále byla v této diplomové práci u pacientů s maligním melanomem přítomna vždy jen varianta CC a transkripční varianty p16^{INK4A} i p14^{ARF} budou zřejmě plnit plnohodnotně své funkce v buněčném cyklu. Lze tedy předpokládat, že v patogenezi melanomu bude hrát roli jiný faktor než mutace v genu *CDKN2A*, která zde nebyla objevena. U dobrovolníků s melanomem v rodině byla však heterozygotní varianta CG přítomna u 4 pacientů ze 17 a ti by tak mohli mít nejen zvýšené riziko vzniku maligního melanomu, ale i rychlejší progresi tohoto onemocnění v případě rozvinutí melanomu.

Závěrem lze shrnout, že v genu *CDKN2A* existuje obrovské množství mutací jak v kódujících, tak nekódujících oblastech, přičemž žádná studie se ještě nezaměřila na jejich možnou koexistenci a jejich vliv na všechny transkripční varianty genu. Je tedy pravděpodobné, že i mutace v 3' a 5' nepřekládaných oblastech spolu s dalšími mutacemi mohou ovlivňovat funkci těchto variant a taková budoucí studie by mohla vnést nové poznatky do patogeneze a léčby maligního melanomu.

V této diplomové práci byl u 28 pacientů charakterizován také polymorfismus C609T v genu *NQO1*, při kterém dochází k substituci T za C v pozici 609, která vede ke změně prolinu na serin v pozici 187 (P187S). Genotyp CC je spojen s největší aktivitou enzymu *NQO1*, genotyp TT naopak s jeho nejnižší aktivitou. V tomto případě byla nejvíce zastoupena nemutovaná homozygotní varianta CC (wild type) s procentuálním zastoupením 68 % a heterozygotní genotyp CT s 32 %. Homozygotní genotyp TT nebyl zjištěn ani v jednom případě. V letech 2014-2020 bylo v genetické laboratoři GENLABS vyšetřeno celkem 126 jedinců, u nichž byl testován polymorfismus C609T v genu *NQO1* pomocí metody PCR RFLP. Nejvíce zastoupen byl homozygotní genotyp CC s procentuálním zastoupením 72 % a heterozygotní genotyp CT s 28 %. Homozygotní genotyp TT se

nevyskytoval ani v jednom případě. Zjištěné frekvence tak odpovídají datům získaným v této diplomové práci. Navíc výsledky odpovídají také hodnotám typickým pro bělošskou populaci a korelují s daty získanými studií tohoto polymorfismu u 347 zdravých obyvatel České republiky (Šusová et al., 2005). V rámci kavkazské populace byl heterozygotní genotyp CT detekován u většího procenta jedinců (39,5 %) ve srovnání s našimi výsledky. Navíc byli ve studované populaci detekováni také mutovaní homozygoti TT a to ve 4,4 % (Kelsey et al., 1997). V této diplomové práci varianta TT nebyla detekována ani v jednom případě, což může být způsobeno malým vyšetřovaným souborem či nižší prevalencí této varianty v české populaci.

Na otázku, zda hraje *NQO1* roli v patogenezi melanomu se snažili odpovědět Cheng et al. (2010). Použitím technologie tkáňových mikročipů a imunohistochemie zkoumali expresi genu *NQO1* v dysplastických névech a primárních melanomech. Zjistili, že exprese je výrazně zvýšena právě u melanomů ve srovnání s névy, a to především u žen, což ale mohlo být ovlivněno genetickými rozdíly pozorovanými u různých podtypů melanomu. Tato zjištění naznačují, že *NQO1* může hrát důležitou roli v prvotních fázích vývoje melanomu. Jeho fyziologickou funkcí je detoxikace potenciálně mutagenních sloučenin, a tedy snížená aktivita *NQO1* zřejmě predisponuje melanocyty k progresi rakoviny.

U 126 vzorků tkání od čínských pacientů s pankreatickým duktálním adenokarcinomem byl zkoumán prognostický význam nadměrné exprese *NQO1* ve srovnání s kontrolními vzorky tkání zdravého pankreatu. U maligních vzorků byla silně pozitivní míra exprese *NQO1* (65,9 %) ve srovnání s kontrolami (10,9 %), což naznačuje, že *NQO1* může hrát důležitou roli v progresi onemocnění. Vysoká exprese *NQO1* může být nezávislým prognostickým biomarkerem pro včasnou diagnostiku a prognózu a potencionálním molekulárním cílem u pacientů s pankreatickým adenokarcinomem. Další výzkumy by také mohli ověřit, zda by inhibitory *NQO1* mohly být vhodně použity při léčbě pacientů a pankreatickým adenokarcinomem (Ji et al., 2017).

Další studie zabývající se *NQO1* v souvislosti s maligním melanomem a karcinomem pankreatu by mohly v budoucnu pomoci objasnit patogenezi těchto malignit a případně navrhnout nové metody léčby se zaměřením právě na genovou expresi *NQO1*.

Heterozygotní varianta CT, která vede k enzymu *NQO1* se sníženou aktivitou byla v této diplomové práci detekována u 2 pacientů s melanomem, u kterých nebyla detekována žádná jiná mutace genu *CDKN2A* a polymorfismus v genu *NQO1* by mohl být iniciátorem kancerogeneze, protože enzym se sníženou aktivitou nebyl schopen detoxikovat potenciálně mutagenní sloučeniny a mohlo dojít k progresi rakovinného bujení. Snížená aktivita tohoto

enzymu by také mohla mít vliv na léčbu těchto pacientů. Dále byla tato varianta detekována u 3 dobrovolníků s melanomem v rodině a u 1 dobrovolníka s karcinomem pankreatu v rodině a vzhledem k tomu, že tento gen může hrát důležitou roli v progresy obou malignit, je důležité u těchto pacientů dbát na správnou prevenci.

U 28 dobrovolníků se podařilo vyšetřit gen *CDKN2A*, *CDK4* i *NQO1*. U poloviny případů byl nalezen vždy jeden heterozygotní genotyp pro sledované geny (CG pro *CDKN2A* c.*29C>G nebo CT pro *NQO1**2) a 13 případů nemělo přítomno ani jednu mutaci v analyzovaných genech. Pouze u jednoho pacienta byly nalezeny dva různé variantní genotypy CG pro *CDKN2A* c.*29C>G a CT pro *NQO1**2 v heterozygotním stavu a to u pacienta, který v minulosti onemocněl maligním melanomem. Zajímavé by bylo od tohoto pacienta zjistit další informace o jeho léčbě a progresi onemocnění, zda měl přítomny metastázy apod. Tento pacient však byl jedním z těch, kteří nevyplnili on-line dotazník ani po opakované prosbě a není tedy pravděpodobné, že by chtěl poskytovat další informace o svém zdravotním stavu.

Dalším přínosem pro tuto diplomovou práci by bylo porovnat výsledky z této studie s dostatečně velkou kontrolní skupinou bez přítomnosti maligního melanomu či karcinomem pankreatu v rodinné anamnéze. Porovnání takových skupin by bylo ve své podstatě přínosnější a výsledky by více vypovídaly o možné asociaci nalezených polymorfismů a mutací v genu *CDKN2A* a *NQO1* s maligním melanomem.

V rámci této diplomové práce byl vyšetřen poměrně malý počet participantů. Není však jednoduché přesvědčit pacienty, kteří trpí nějakou malignitou, či jejich rodinné příslušníky, ke spolupráci. Větší vzorek by patrně ukázal mnohem širší souvislosti a mohlo by se jednat o první takovou studii v České republice týkající se mutací genů predisponujících k malignímu melanomu. V případě všech analyzovaných genů by jistě bylo přínosem vyšetřit expresi těchto genů přímo v buňkách melanomu. V dnešní době však není prakticky možné vyšetřovat histologické vzorky od pacientů jinde než na patologických odděleních nemocnic či v biotických laboratořích.

Plošné genetické testování pacientů s maligním melanomem či karcinomem pankreatu a jejich rodinných příslušníků by se mohlo v budoucnu stát důležitým krokem k objasnění přesných příčin vzniku a rozvoje maligního melanomu a potenciálně by mohlo pomoci objevit nové látky k léčbě této malignity. O něco takového se snaží např. český projekt CZECANCA, který cílí u pacientů s dědičným nádorovým onemocněním na

219 genů, zahrnujícím mimo jiné i gen *CDKN2A* a *CDK4*. Jedná se o molekulárně-genetické vyšetření pomocí diagnostického NGS panelu. Výsledky tohoto projektu zatím nebyly publikovány (Soukupová et al., 2016). Vždy je však velmi důležité dbát na správnou interpretaci genetických testů v širším kontextu zjištěných poznatků. Na základě získaných poznatků v této práci může být například velmi vhodné vyšetření mutací v genech *BRAF* a *NQO1*, které zřejmě hrají významnou roli v odpovědi na léčbu u pacientů s maligním melanomem, a které dosud není v klinické praxi používáno.

Přestože jsme analyzovali omezený počet pacientů s melanomem a karcinomem pankreatu a jejich rodinných příslušníků, výsledky této studie nás vedou k závěru, že patogenní mutace genu *CDKN2A* zřejmě nebudou hlavním predisponujícím faktorem pro maligní melanom v České republice. Maligní melanom tedy bude pravděpodobně způsoben mutacemi v jiných méně rizikových melanomových genech či dalšími environmentálními faktory.

Závěr

V rámci diplomové práce byly shrnuty poznatky o maligním melanomu, což je neuroektodermový nádor, který vzniká z melanocytů a je jedním z nejzhoubnějších kožních nádorů se strmě rostoucí incidencí. V současné době je včasná diagnóza u pacientů s melanomem to nejdůležitější pro jejich stoprocentní vyléčení.

Cílem experimentální části bylo detekovat mutace nejen v běžně vyšetřovaných genech *CDKN2A*, *CDK4*, ale také polymorfismus C609T v genu *NQO1*. Četnost mutací se v této studii ve srovnání s podobnými populačními studii významně nelišila. Budoucí výzkum těchto i dalších potenciálně predisponujících genů by však mohl do této problematiky vnést nové poznatky, které by nám pomohly porozumět biologické podstatě vzniku a rozvoje melanomu a tím přispět k vývoji nových metod léčby snižujících mortalitu spojenou s maligním melanomem. Cílem genetického testování je také identifikace vysoce rizikových pacientů, u nichž by bylo možné zahájit procesy prevence a případné včasné diagnostiky. V případě melanomu je však důležitá i edukace populace a běžná dostupnost základního dermatoonkologického vyšetření s následnou odbornou péčí. V posledních letech se však diagnostika a celková kvalita lékařské péče výrazně zlepšují a vysoké procento nádorových onemocnění je diagnostikováno v terapeuticky příznivějších stádiích.

Seznam použité literatury

1. Aitken, J., Welch, J., Duffy, D., Milligan, A., Green, A., Martin, N., Hayward, N. (1999). CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 91(5), 446-452.
2. Aoude, L.G., Gartside, M., Johansson, P., Palmer, J.M. (2015). Prevalence of germline BAP1, CDKN2A, and CDK4 mutations in an Australian population-based sample of cutaneous melanoma cases. *Twin Research and Human Genetics*. 18(2), 126-133.
3. Arakawai, N., Okubo, A., Yasuhirai, S., Takahashi, K., Amano, H., Akasaka, T., Masuda, T., Shibazaki, M., Maesawa, Ch. (2018). Carnosic acid, an inducer of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, enhances the cytotoxicity of β -lapachone in melanoma cell lines. *Oncology Letters*. 15(2), 2393-2400.
4. Ardekani, G.S., Jafarnejad, S.M., Tan, L., Saeedi, A., Li, G. (2012). The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: A systemic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 7(10).
5. Arenbergerová, M. (2016). Maligní melanom kůže. *Labor Aktuell*. 4, 27-29.
6. Arif, J.M., Lehmler, H.J., Robertson, L.W., Gupta, R.C. (2003). Interaction of benzoquinone-and hydroquinone-derivatives of lower chlorinated biphenyls with DNA and nucleotides in vitro. *Chemico-Biological Interactions*. 142 (3), 307-316.
7. Asher, G., Tsvetkov, P., Kahana, C., Shaul, Y. (2005). A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes & Development*. 19(3), 316-321.
8. Auroy, S., Avril, M.F., Chompret, A., Pham, D., Goldstein, A.M., Bianchi-Scarra, G., Frebourg, T., Joly, P., Spatz, A., Rubino, C., Demenais, F., Bressac-de Paillerets, B. (2001). Sporadic multiple primary melanoma cases: CDKN2A germline mutations with a founder affect. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 32(3), 195-202.
9. Badenas, C., Aguilera, P., Puig-Butillé, J.A., Carrera, C., Malvehy, J., Puig, S. (2012). Genetic counselling in melanoma. *Dermatologic Therapy*. 25(5), 397-402.
10. Bajčiová, V. (2016a). Maligní melanom a nové možnosti jeho léčby. *Onkologie*. 10(6), 256-262.
11. Bajčiová, V. (2016b). Maligní melanom u dětí a adolescentů. *Onkológia*. 11(1), 22-28.

12. Bakos, R. M., Besch R., Zoratto, G.G., Godinho, J.M., Mazzotti, N.G., Ruzicka, T., Bakos, L., Santos, S.E., Ashton-Prolla, P., Berking, C., Giugliani, R. (2011). The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. *Experimental Dermatology*. 20(11), 890-893.
13. Bartsch, D.K., Sina-Frey, M., Lang, S., Wild, A., Gerdes, B., Barth, P., Kress, R., Grützmann, R., Colombo-Benkmann, M., Ziegler, A., Hahn, S.A., Rothmund, M., Rieder, H. (2002). CDKN2A germline mutations in familial pancreatic cancer. *Annals of Surgery*. 236(6), 730-737.
14. Begg, C.B., Orlow, I., Hummer, A.J., Armostron, B.K., Kricke, A., Marrett, L.D., Millikan, R.C., Gruber, S.B., Anton-Culver, H., Zanetti, R., Gallagher, R.P., Dwyer, T., Rebbeck, T.R., Mitra, N., Busam, K., From, L., Berwick, M., Genes, Environment and Melanoma Study Group. (2005). Lifetime risk of melanoma in CDKN2A mutation carriers in a population-based sample. *Journal of the National Cancer Institute*. 97(20), 1507-1515.
15. Bertram C.G., Gaut, R.M., Barrett, J.H., Pinney, E., Whitaker, L., Turner, F., Bataille, V., Dos Santos Silva, I., Swerdlow, J. A, Bishop, D.T., Newton Bishop, J.A. (2002). An assessment of the CDKN2A variant Ala148Thr as a nevus/melanoma susceptibility allele. *Journal of Investigative Dermatology*. 119(4), 961-965.
16. Bezić, J., Kuret, S., Vrbčić, B., Smolić, J., Borić, I., Škifić, I., Ledina, D., Božić, J. (2019). Clinicopathological characteristics of BRAF V600E mutated melanomas in the Dalmatian region of Croatia. *Acta Dermatovenerologica Croatica*. 27(4), 225-230.
17. Bhatia, P., Friedlander, P., Zakaria, E.A., Kandi, E. (2015). Impact of BRAF mutation status in the prognosis of cutaneous melanoma: an area of ongoing research. *Annals of Translational Medicine*. 3(2), 24.
18. Bian, J.-T., Zhao, H.-L., Zhang, Z.-X., Bi, X.-H., Zhang, J.-W. (2008). Association of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 Polymorphism and Alzheimer's Disease in Chinese. *Journal of Molecular Neuroscience*. 34(3), 235-240.
19. Bishop, D.T., Demenais, F., Goldstein, A.M., Bergman, W., Newton Bishop, J., Bressac-de Paillerets, B., Chompret, A., Ghiorzo, P., Gruis, N., Hansson, J., Harland, M., Hayward, N., Holland, E.A., Mann, G.J., Mantelli, M., Nancarrow, D., Platz, A., Tucker, M.A., The Melanoma Genetics Consortium. (2002). Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 94(12), 894-903.

20. Böhm, M., Schiller, M., Ständer, S., Seltmann, H., Li, Z., Brzoska, T., Metze, D., Schiöth, H.B., Skottner, A., Seiffert, K., Zouboulis, C.C., Luger, T.A. (2002). Evidence for expression of melanocortin-1 receptor in human sebocytes in vitro and in situ. *Journal of Investigative Dermatology*. 118(3), 533-539.
21. Borg, A., Sandberg, T., Nilsson, K., Johannsson, O., Klinker, M., Måsbäck, A., Westerdahl, J., Olsson, H., Ingvar, C. (2000). High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *Journal of the National Cancer Institute*. 92(15). 1260-1266.
22. Borkowska, E., Jędrzejczyk, A., Kruk, A., Pietrusiński, M., Traczyk, M., Roźniecki, M., Kałużewski, B. (2011). Significance of CDKN2A gene A148T variant in patients with bladder cancer. *Central European Journal of Urology*. 64(3), 168-174.
23. Borovanský, J., Riley, P.A. *Melanins and melanosomes: biosynthesis, biogenesis, physiological, and pathological functions*. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN 978-3-527-32892-5.
24. Box, N.F., Duffy, D.L., Chen, W., Stark, M., Martin, N.G., Sturm, R.A., Hayward, N.K. (2001). MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *American Journal of Human Genetics*. 69(4), 765-773.
25. Breitbart, E.W., Waldmann, A., Nolte, S., Capellaro, M., Greinert, R., Volkmer, B., Katalinic, A. (2012). Systematic skin cancer screening in Northern Germany. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 66(2), 201-211.
26. Calbet-Llopart, N., Potrony, M., Tell-Marti, G., Carrera, C., Barreiro, A., Aguilera, P., Podlipnik, S., Puig, S., Malveyh, J., Puig-Butillé, J.A. (2020). Detection of cell-free circulating BRAFV600E by droplet digital polymerase chain reaction in patients with and without melanoma under dermatological surveillance. *British Journal of Dermatology*. 182(2), 382-389.
27. Cannon-Albright, L.A., Goldgar, D.E., Meyer, L.J., Lewis, C.M., Anderson, D.E., Fountain, J.W., Hegi, M.E., Wiseman, R.W., Petty, E.M., Bale, A.E., Olufunmilayo, I., Olopade, M.D., Kwiatkowski, D.J., Piepkorn, M.W., Zone, J.J., Skolnick, M.H. (1992). Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science*. 258, 1148-1152.
28. Cicenias, J., Tamosaitis, L., Kvederaviciute, K., Tarvydas, R., Staniute, G., Kalyan, K., Meskinyte-Kausiliene, E., Stankevicius, V., Valius, M. (2017). KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. *Medical Oncology*. 34(2), 26.

29. Colombo, S., Berlin, I., Delmas, V., Larue, L. Classical and nonclassical melanocytes in vertebrates. In: *Melanins and melanosomes: biosynthesis, biogenesis, physiological, and pathological functions*. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2011, s. 21-61. ISBN 978-3-527-32892-5.
30. Costin, G.-E., Hearing, V.J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB Journal*. 21(4), 976-994.
31. Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W.C., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, J., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., Futreal, P.A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 417, 949-954.
32. Debniak, T., Scott, R., Masojc, B., Serrano-Fernández, P., Huzarski, T., Byrski, T., Debniak, B., Górski, B., Cybulski, C., Medrek, K., Kurzawski, G., van de Wetering, T., Maleszka, R., Kładny, J., Lubinski, J. (2006). MC1R common variants, CDKN2A and their association with melanoma and breast cancer risk. *International Journal of Cancer*. 119(11), 2597-2602.
33. Debniak, T., Scott, R.J., Huzarski, T., Byrski, T., Rozmiarek, A., Debniak, B., Górski, B., Cybulski C., Medrek, K., Mierzejewski, M., Masojc, B., Matyjasik, J., Złowocka, E., Teodorczyk, U., Lener, M., Klujszo-Grabowska, E., Nej-Wołosiak, K., Jaworowska, E., Oszutowska, D., Szymańska, A., Szymańska, J., Castaneda, J., van de Wetering, T., Suchy, J., Kurzawski, G., Oszurek, O., Narod, S., Lubinski, J. (2006). CDKN2A common variant and multi-organ cancer risk - a population-based study. *International Journal of Cancer*. 118(12), 3180-3182.
34. Debniak, T., Scott, R.J., Huzarski, T., Byrski, T., Rozmiarek, A., Dębniak, B., Załuga, E., Maleszka, R., Kładny, J., Górski, B., Cybulski, C., Gronwald, J., Kurzawski, G., Lubinski, J. (2005). CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Research*. 65(3), 835-839.
35. Demirci, H., McCormick, S.A., Finger, P.T. (2000). Topical mitomycin chemotherapy for conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia: clinical experience with histopathologic observations. *Archives of Ophthalmology*. 118(7), 885-891.

36. Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 Are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(18), 11908-11913.
37. Ditrichová, D., Tichý, M. (2006). Maligní melanom – nejzhubnější kožní nádor. *Interní Medicína*. 7 a 8, 352-354.
38. Duffy, K., Grossman, D. (2012). The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: part I. Historical, histologic, and clinical aspects. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 67(1), 17-18.
39. Edlunch-Rose, E., Egyhazi, S., Omholt, K., Mansson-Brahme, E., Platz, E., Hansson, J., Lundeberg, J. (2006). NRAS and BRAF mutations in melanoma tumors in relation to clinical characteristics: A study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Research*, 16(6), 471–478.
40. Fagerholm, R., Hofstetter, B., Tommiska, J., Aaltonen, K., Vrtel, R., Syrjakoski, K., Kallioniemi, A., Kilpivaara, O., Mannermaa, A., Kosma, V.-M., Uusitupa, M., Eskelinen, M., Kataja, V., Aittomaki, K., von Smitten, K., Heikkila, P., Lukas, J., Holli, K., Bartkova, J., Blomqvist, C., Bartek, J., Nevanlinna, H. (2008). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nature Genetics*. 40, 844-853.
41. Fargnoli, M.C., Pike, K., Pfeiffer, R.M., Tsang, S., Rozenblum, E., Munroe, D.J., Golubeva, Y., Calista, D., Seidenari, S., Massi, D., Carli, P., Bauer, J., Elder, D.E., Bastian, B.C., Peris, K., Landi, M.T. (2008). MC1R variants increase risk of melanomas harboring BRAF mutations. *Journal of Investigative Dermatology*. 182(10), 2485-2490.
42. Fitzgerald, M.G., Harkin, D.P., Silva-Arrieta, S., MacDonald, D.J., Lucchina, L.C., Unsal, H., O'Neill, E., Koh, J., Finkelstein, D.M., Isselbacher, K.J., Sober, A.J., Haber, D.A. (1996). Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(16), 8541-8545.
43. Foretová, L., Macháčková, E., Šachlová, M., Petráková, K., Palácová, M. (2009). Syndrom familiárního melanomu (s dysplastickými naevy či bez nich). *Klinická onkologie*. 22, 32-33.
44. Gaedigk, A., Tyndale, R.F., Jurima-Romet, M., Sellers, E.M., Grant, D.M., Leeder, J.S. (1998). NAD(P)H:quinone oxidoreductase: polymorphisms and allele

- frequencies in Caucasian, Chinese and Canadian Native Indian and Inuit populations. *Pharmacogenetics*. 8(4), 305–313.
45. Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Abeni, D., Boyle, P., Melchi, C.F. (2005a). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European Journal of Cancer*. 41(1), 28–44.
 46. Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Zanetti, R., Masini, C., Boyle, P., Melchi, C.F. (2005b). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European Journal of Cancer*. 41(14), 2040–2059.
 47. Garate, M., Wani, A.A., Li, G. (2010). The NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 induces cell cycle progression and proliferation of melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 48(12), 1601-1609.
 48. Geddert, H., Kiel, S., Zotz, R.B., Zhang, J., Willers, R., Gabbert, H.E., Sarbia, M. (2005). Polymorphism of p16INK4A and cyclin D1 in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 131(12), 803-808.
 49. Ghiorzo, P., Fornarini, G., Sciallero, S., Battistuzzi, L., Belli, F., Bernard, L., Bonelli, L., Borgonovo, G., Bruno, W., de Cian, F., Decensi, A., Filauro, M., Faravelli, F., Gozza, A., Gargiulo, S., Mariette, F., Nasti, S., Pastorino, L., Queirolo, P., Savarino, V., Varesco, L., Scarrá, G.B., Genoa Pancreatic Cancer Study Group. (2012). CDKN2A is the main susceptibility gene in Italian pancreatic cancer families. *Journal of Medical Genetics*. 49(3), 164-170.
 50. Gilchrest, B.A., Eller, M.S., Geller, A.C., Yaar, M. (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *The New England Journal of Medicine*. 340(17), 1341–1348.
 51. Goldstein, A.M. (2004). Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Human Mutation*. 23(6), 630.
 52. Goldstein, A.M., Fraser, M.C., Clark, W.H., Tucker, M.A. (1994). Age at diagnosis and transmission of invasive melanoma in 23 families with cutaneous malignant melanoma/dysplastic nevi. *Journal of the National Cancer Institute*. 86(18), 1385-1390.
 53. Goldstein, A.M., Chan, M., Harland, M., Gillanders, E.M., Hayward, N.K., Avril, M.-F., Azizi, E., Bianchi-Scarra, G., Bishop, T., Bressac-dePaillerets, B., Bruno, W., Calista, D., Cannon Albright, L.A., Demenias, F., Elder, D.E., Ghiorzo, P., Gruis, N.A., Hansson, J., Hogg, D., Holland, E.A., Kanetsky, P.A., Kefford, R.F., Teresa Landi, M., Lang, J., Leachman, S.A., MacKie, R.M., Magnusson, V., Mann,

- G.J., Niendorf, K., Newton Bishop, J., Palmer, J.M., Puig, S., Puig-Butille, J.A., de Snoo, F.A., Stark, M., Tsao, H., Tucker, M.A., Whitaker, L., Yakobson, E., The Lund Melanoma Study Group, The Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL). (2006). High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Research*. 66(20), 9818-9828.
54. Goldstein, A.M., Chan, M., Harland, M., Hayward, N.K., Demenais, F., Timothy Bishop, F., Azizi, E., Bergman, W., Bianchi-Scarra, G., Bruno, W., Calista, D., Cannon Albright, L.A., Chaudru, V., Chompret, A., Cuellar, F., Elder, D.E., Ghorzo, P., Gillanders, E.M., Gruis, N.A., Hansson, J., Hogg, D., Holland, E.A., Kanetsky, P.A., Kefford, R.F., Landi, M.T., Lang, J., Leachman, S.A., MacKie, R.M., Magnusson, V., Mann, G.J., Newton Bishop, J., Palmer, J.M., Puig, S., Puig-Butille, J.A., Stark, M., Tsao, H., Tucker, M.A., Whitaker, L., Yakobson, E., The Lund Melanoma Study Group, the Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL). (2007). Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *Journal of Medical Genetics*. 44, 99-106.
55. Goldstein, A.M., Struewing, J.P., Chidambaram, A., Fraser, M.C., Tucker, M.A. (2000). Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *Journal of National Cancer Institute*. 92(12), 1006–1010.
56. Goydos, J.S., Mann, B., Kim, H.J., Gabriel, E.M., Alsina, J., Germino, J., Shih, W., Gorski, D.H. (2005). Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma. *Journal of the American College of Surgeons*. 200(3), 362-370.
57. Gruis, N.A., van der Velden, P.A., Sandkuijl, L.A., Prins, D.E. Weaver-Feldhaus, J., Kamb, A., Bergman, W., Frants, R.R. (1995). Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nature Genetics*. 10(3), 351-353.
58. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5), 646-674.
59. Harinck, F., Kluijt, I., van der Stoep, N., Oldenburg, R.A., Wagner, A., Aalfs, C.M., Sijmons, R.H., Poley, J.W., Kuipers, E.J., Fockens, P., van Os, T.A., Bruno, M.J. (2012). Indication for CDKN2A-mutation analysis in familial pancreatic cancer families without melanomas. *Journal of Medical Genetics*. 49(6), 362-365.
60. Harland, M., Cust, A.E., Badenas, C., Chang, Y.M., Holland, E.A., Aquilera, P., Aitken, J.F., Armstrong, B.K., Barrett, J.H., Carrera, C., Chan, M., Gascoyne, J.,

- Giles, G.G., Agha-Hamilton, C., Hopper, J.L., Jenkins, M.A., Kanetsky, P.A., Kefford, R.F., Kolm, I., Lowery J., Malvey, J., Ogbah, Z., Puig-Butille, J.A., Orihuela-Segalés, J., Randerson-Moor, J.A., Schmid, H., Taylor, C.F., Whitaker, L., Bishop, D.T., Mann, G.J., Newton-Bishop, J.A., Puig, S. (2014). Prevalence and predictors of germline CDKN2A mutations for melanoma cases from Australia, Spain and the United Kingdom. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. 12(1).
61. Harland, M., Mistry, S., Bishop, D.T., Bishop, J.A. (2001). A deep intronic mutation in CDKN2A is associated with disease in a subset of melanoma pedigrees. *Human Molecular Genetics*. 10(23), 2679-2686.
 62. Harland, M., Taylor, C.F., Bass, S., Churchman, M., Randerson-Moor, J.A., Holland, E.A., Mann, G.J., Bishop, D.T., Newton Bishop, J.A. (2005a). Intronic sequence variants of the CDKN2A gene in melanoma pedigrees. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 43(2), 128-136.
 63. Harland, M., Taylor, C.F., Chambers, P.A., Kukulizch, K., Randerson-Moor, J.A., Gruis, N.A., de Snoo, F.A., ter Huurne, J.A.C., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Bishop, D.T., Newton Bishop, J.A. (2005b). A mutation hotspot at the p14ARF splice site. *Oncogene*. 24(28), 4604-4608.
 64. Hashemi, J., Platz, A., Ueno, T., Stierner, U., Ringborg, U., Hansson, J. (2000). CDKN2A germ-line mutations in individuals with multiple cutaneous melanomas. *Cancer Research*. 60(24), 6864-6867.
 65. Hayward, N.K. (2003). Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene*. 22, 3053-3062.
 66. Hewitt, Ch., Lee Wu, Ch., Evans, G., Howell, A., Elles, R.G., Jordan, R., Sloan, P., Read, A.P., Thakker, N. (2002). Germline mutation of ARF in a melanoma kindred. *Human Molecular Genetics*. 11(11), 1273-1279.
 67. Hocker, T., Tsao, H. (2007). Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Human Mutation*. 28(6), 578-588.
 68. Hocker, T.L., Singh, M.K., Tsao, H. (2008). Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *Journal of Investigative Dermatology*. 128, 2575-2595.
 69. Hussussian, C.J., Struwing, J.P., Goldstein, A.M., Higgins, P.A., Ally, D.S., Sheahan, M.D., Clark, W.H., Tucker, M.A., Dracopoli, N.C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genetics*. 8(1), 15-21.

70. Cheng, Y., Li, J., Martinka, M., Li, G. (2010). The expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 is increased along with NF-kappaB p105/p50 in human cutaneous melanomas. *Oncology Reports*. 23(4), 973-979.
71. Chin, L., Garraway, L.A., Fisher, D.E. (2006). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & Development*. 20, 2149-2182.
72. Choi, T.Y., Sohn, K.Ch., Kim, J.H., Kim, S.M., Kim, Ch.H., Hwang, J.S., Lee, J.H., Kim, Ch.D., Yoon, T.J. (2010). Impact of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 on pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*. 130(3), 784-792.
73. Chudnovsky, Y., Khavari, P.A., Adams, A.E. (2005). Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *Journal of Clinical Investigation*. 115(4), 813-824.
74. Iskander, K., Gaikwad, A., Paquet, M., Long, D.J., Brayton, C., Barrios, R., Jaiswal, A.K. (2005). Lower induction of p53 and decreased apoptosis in NQO1-null mice lead to increased sensitivity to chemical-induced skin carcinogenesis. *Cancer Research*. 65(6), 2054-2058.
75. Jaiswal, A.K. (1994). Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase-2: gene structure, activity, and tissue-specific expression. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 14502-14508.
76. Jaiswal, A.K., McBride, O.W., Adesnik, M., Nebert, D.W. (1988). Human dioxin-inducible cytosolic NAD(P)H:Menadione oxidoreductase: cDNA sequence and localization of gene to chromosome 16. *Journal of Biological Chemistry*. 263, 13572-13578.
77. Ji, M., Jin, A., Sun, J., Cui, X., Yang, Y., Chen, L., Lin, Z. (2017). Clinicopathological implications of NQO1 overexpression in the prognosis of pancreatic adenocarcinoma. *Oncology Letters*. 13(5), 2996-3002.
78. Joseph, P., Jaiswal, A.K. (1998). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 reduces the mutagenicity of DNA caused by NADPH:P450 reductase-activated metabolites of benzo(a)pyrene quinones. *British Journal of Cancer*. 77, 709-19.
79. Karagianni, F., Njauw, Ch.N., Kypreou, K.P., Stergiopoulou, A., Plaka, M., Polydorou, D., Chasapi, V., Pappas, L., Stratigos, I.A., Champsas, G., Panagiotou, P., Gogas, H., Evangelou, E., Tsao, H., Stratigos, A.J., Stefanaki, I. (2018). CDKN2A/CDK4 status in Greek patients with familial melanoma and association with clinico-epidemiological parameters. *Acta Dermato-Venereologica*. 98, 862-866.

80. Kasai, S., Arakawa, N., Okubo, A., Shigeeda, W., Yasuhira, S., Masuda, T., Akasaka, T., Shibasaki, M., Maesawa, Ch. (2016). NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 expression sensitizes malignant melanoma cell to the HSP90 inhibitor 17-AAG. *PLoS One*. 11(4).
81. Kelsey, K.T., Ross, D., Traver, R.D., Christiani, D.C., Zuo, Z.F., Spitz, M.R., Wang, M., Xu, X., Lee, B.K., Schwartz, B.S., Wiencke, J.K. (1997). Ethnic variation in the prevalence of a common NAD(P)H quinone oxidoreductase polymorphism and its implications for anti-cancer chemotherapy. *British Journal of Cancer*. 76, 852-854.
82. Kodet, O., Krajsová, I. (2017). Maligní melanom, incidence, rizikové faktory a jeho časná diagnostika. *Onkologie*. 11(3), 138-143.
83. Koh, J., Enders, G.H., Dynlacht, B.D., Harlow, E. (1995). Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature*. 375, 506-510.
84. Kozak, K., Kowalik, A., Gos, A., Wasag, B., Lugowska, I., Jurkowska, M., Krawczynska, N., Kosela-Paterczyk, H., Switaj, T., Teterycz, P., Klimczak, A., Siedlecki, J.A., Chlopek, M., Kalisz, J., Limon, J., Rutkowski, P. (2020). Cell-free DNA BRAF V600E measurements during BRAF inhibitor therapy of metastatic melanoma: long-term analysis. *Tumori Journal*.
85. Kumar, R., Smeds, J., Berggren, P., Straume, O., Rozell, B.L., Akslen, L.A., Hemminki, K. (2001). A single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. *International Journal of Cancer*. 95(6), 388-393.
86. Lafuente, M.J., Casterad, X., Trias, M., Ascaso, C., Molina, R., Ballesta, A., Zheng, S., Wiencke, J.K., Lafuente, A. (2000). NAD(P)H:quinone oxidoreductase-dependent risk for colorectal cancer and its association with the presence of K-ras mutations in tumors. *Carcinogenesis*. 21(10), 1813-1819.
87. Lajin, B., Alachkar, A. (2013). The NQO1 polymorphism C609T (Pro187Ser) and cancer susceptibility: a comprehensive meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 109(5), 1325-1337.
88. Lal, G., Liu, L., Hogg, D., Lassam, N.J., Redston, M.S., Gallinger, S. (2000). Patients with both pancreatic adenocarcinoma and melanoma may harbor germline CDKN2A mutations. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 27(4), 358-361.
89. Lamberti, M.J., Vasconsuelo, A.B.M., Chiaramello, M., Ferreira, V.F., Oliveira, M.M., Ferreira, S.B., Rivarola, V.A., Vittar, N.B.R. (2018). NQO1 induction

- mediated by photodynamic therapy synergizes with β -lapachone-halogenated derivative against melanoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 108, 1553-1564.
90. Landi, M.T., Bauer, J., Preiffer, R.M., Elder, D.E., Hulley, B., Minghetti, P., Calista, D., Kanetsky, P.A., Pinkel, D., Bastian, B.C. (2006). MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science*. 313(5786), 521-522.
 91. Lange, J.R., Palis, B.E., Chang, D.C., Seng-Jaw, S., Balch, Ch.M. (2007). Melanoma in children and teenagers: an analysis of patients from the National Cancer Data Base. *Journal of Clinical Oncology*. 25(11), 1363-1368.
 92. Lee, J.H., Choi, J.W., Kim, Y.S. (2010). Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *British Journal of Dermatology*. 164(4), 776-784.
 93. Lienhart, W.-D., Strandback, E., Gudipati, V., Koch, K., Binter, A., Uhl, M.K., Rantasa, D.M., Bourgeois, B., Madl, T., Zangger, K., Gruber, K., Macheroux, P. (2017). Catalytic competence, structure and stability of the cancer-associated R139W variant of the human NAD(P)H: quinonoreductase 1 (NQO1). *The FEBS Journal*. 284(8), 1233-1245.
 94. Lilischkis, R., Sarcevic, B., Kennedy, C., Warlters, A., Sutherland, R.L. (1996). Cancer-associated mis-sense and deletion mutations impair p16INK4 CDK inhibitory activity. *International Journal of Cancer*. 66(2), 249-254.
 95. Lin, P.H., Nakamura, J., Yamaguchi, S., Upton, P.B., La, D.K., Swenberg, J.A. (2001). Oxidative damage and direct adducts in calf thymus DNA induced by the pentachlorophenol metabolites, tetrachlorohydroquinone and tetrachloro-1,4-benzoquinone. *Carcinogenesis*. 22(4), 627-634.
 96. Lin, Y.-C., Diccianni, M.B., Kim, Y., Lin, H.-H., Lee, C.-H., Lin, R.-J., Joo, S.H., Li, J., Chuang, T.-J., Yang, A.-S., Kuo, H.-H., Tsai, M.-D., Yu, A.L. (2007). Human p16-gamma, a novel transcriptional variant of p16(INK4A), coexpresses with p16(INK4A) in cancer cells and inhibits cell-cycle progression. *Oncogene*. 26(49), 7017-7027.
 97. Liu, L., Dilworth, D., Gao, L., Monzon, J., Summers, A., Lassam, N., Hogg, D. (1999). Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nature Genetics*. 21(1), 128-132.
 98. Long, D.J., Waikel, R.L., Wang, X.J., Perlaky, L., Roop, D.R., Jaiswal, A.K. (2000). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Research*. 60(21), 5913-5915.

99. Long, D.J., Waikel, R.L., Wang, X.J., Roop, D.R., Jaiswal, A.K. (2001). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency and increased susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis in mouse skin. *Journal of the National Cancer Institute*. 93(15), 1166-1170.
100. López de Silanes, I., Quesada, M.P., Esteller, M. (2007). Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Cellular Oncology*. 29(1), 1-17.
101. Losina, E., Walensky, R.P., Geller, A., Beddingfield, F.C., Wolf, L.L., Gilchrist, B.A., Freedberg, K.A. (2007). Visual screening for malignant melanoma: a cost-effectiveness analysis. *Archives of Dermatology*. 143(1), 21-28.
102. Lu, Ch., Zhang, J., Nagahawatte, P., Easton, J., Lee, S., Liu, Z., Ding, L., Wyczalkowski, M.A., Valentine, M., Navid, F., Mulder, H., Tatevossian, R.G., Dalton, J., Davenport, J., Yin, Z., Edmonson, M., Rusch, M., Wu, F., Li, Y., Parker, M., Hedlund, E., Shurtleff, S., Raimondi, S., Bhavin, V., Donald, Y., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Evans, W.E., Ellison, D.W., Pounds, S., Dyer, M., Downing, J.R., Pappo, A., Bahrami, A. (2015). The genomic landscape of childhood and adolescent melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 135(3), 816-823.
103. Luger, T.A., Scholzen, T.E., Brzoska, T., Böhm, M. (2003). New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 994, 133-140.
104. Lynch, H.R., Brand, R.E., Hogg, D., Deters, C.A., Fusaro, R.M., Lynch, J.F., Liu, L., Knezetic, J., Lassam, N.J., Goggins, M., Kern, S. (2002). Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer*, 94(1), 84-96.
105. MacKie R.M., Andrew N, Lanyon W.G., Connor J.M. (1998). CDKN2A germline mutations in U.K. patients with familial melanoma and multiple primary melanomas. *The Journal of Investigative Dermatology*. 111, 269-272.
106. Maitland-van der Zee, A.H., Daly, A.K. (2012). *Pharmacogenetics and individualized therapy*. Hoboken, New York: John Wiley. ISBN 978-0470433546.
107. Maldonado, J.L., Fridlyand, J., Patel, H., Jain, A.N., Busam, K., Kageshita, T., Ono, T., Albertson, D.G., Pinkel, D., Bastian, B.C. (2003). Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 95(24), 1878-1890.

108. Mayer K, Ballhausen W, Leistner W, Rott H. (2000). Three novel types of splicing aberrations in the tuberous sclerosis TSC2 gene caused by mutations apart from splice consensus sequences. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1502(3), 495–507.
109. McCloud, J.M., Sivakumar, R., Greenhough, A., Elder, J., Jones, P.W., Deakin, M., Elder, J.B., Fryer, A.A., Hoban, P.R. (2004). p16INK4a polymorphism: associations with tumour progression in patients with sporadic colorectal cancer. *International Journal of Oncology*. 25(5), 1447-1452.
110. McKenzie, H.A., Fung, C., Becker, T.M., Irvine, M., Mann, G.J., Kefford, R.F., Rzos, H. (2010). Predicting functional significance of cancer-associated p16(INK4a) mutations in CDKN2A. *Human Mutation*. 31(6), 692-701.
111. McNeely, E., Mordukhovich, I., Staffa, S., Tideman, S., Gale, S., Coull, B. (2018). Cancer prevalence among flight attendants compared to the general population. *Environmental Health*. 17(49).
112. Menzel, H.-J., Šarmanová, J., Souček, P., Berberich R, Grünwald, K., Haun, M., Kraft, H.-G. (2004). Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *British Journal of Cancer*. 90(10), 1989-1994.
113. Menzies, A.M., Haydu, L.E., Visintin, L., Carlino, M.S., Howle, J.R., Thompson, J.F., Kafford, R.F., Scoyler, R.A., Long, G.V. (2012). Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*. 18, 3242-3249.
114. Mielczarek-Lewandowska, A., Hartman, M.L., Czyz, M. (2020). Inhibitors of HSP90 in melanoma. *Apoptosis*. 25(1-2), 12-28.
115. Mills, O., Mesina, J.L. (2009). Pediatric melanoma: review. *Cancer Control*. 16(3), 225-233.
116. Molven, A., Grimstvedt, M.B., Steine, S.J., Harland, M., Avril, M.-A., Hayward, N.K., Akslen, L.A. (2005). A large Norwegian family with inherited malignant melanoma, multiple atypical nevi, and CDK4 mutation. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 44(1), 10-18.
117. Monzon, J., Liu, L., Brill, H., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., From, L., McLaughlin, J., Hogg, D., Lassam, N.J. (1998). CDKN2A mutations in multiple primary melanomas. *The New England Journal of Medicine*. 338 (13), 879–887.
118. Monzon, J., Liu, L., Brill, H., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., From, L., McLaughlin, J., Hogg, D., Lassam, N.J. (1998). CDKN2A mutations in multiple primary melanomas. *The New England Journal of Medicine*. 338, 879-887.

119. Moran, J. L., Siegel, D., Ross, D. (1999). A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96, 8150-8155.
120. Muthusamy, V., Hobbs, C., Nogueira, C., Cordon-Cardo, C., McKee, P.H., Chin, L., Bosenberg, M.W. (2006). Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 45, 447-454.
121. Nebert, D.W., Roe, A.L., Vandale, S.E., Bingham, E., Oakley, G.G. (2002). NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: a HuGE review. *Genetics in Medicine*. 4(2), 62-70.
122. Nikolaou, V., Kang, X., Stratigos, A., Gogas, H., Latorre, M.C., Gabree, M., Plaka, M., Njauw, C.N., Kypreou, K., Mirmigi, I., Stefanaki, I., Tsao, H. (2011). Comprehensive mutational analysis of CDKN2A and CDK4 in Greek patients with cutaneous melanoma. *British Journal of Dermatology*. 165(6), 1219-1222.
123. Orlow, I., Begg, C.B., Cotignola, J., Roy, P., Hummer, A.J., Clas, B.A., Mujumdar, U., Canchola, R., Armstrong, B.K., Krickler, A., Marrett, L.D., Millikan, R.C., Gruber, S.B., Anton-Culver, H., Zanetti, R., Gallagher, R.P., Dwyer, T., Rebbeck, T.R., Kanetsky, P.A., Wilcox, H., Busam, K., From, L., Berwick, M. (2007). CDKN2A germline mutations in individuals with cutaneous malignant melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 127(5), 1234-1243.
124. Pastorino, L., Bonelli, L., Ghiorzo, P., Queirolo, P., Battistuzzi, L., Balleari, E., Nasti, S., Gargiulo, S., Gliori, S., Savoia, P., Abate Osella, S., Bernengo, M.G., Bianchi Scarrà, G. (2008). CDKN2A mutations and MC1R variants in Italian patients with single or multiple primary melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 21(6), 700-709.
125. Petronzelli, F., Sollima, D., Coppola, G., Martini-Neri, M.E., Neri, G., Genuardi, M. (2001). CDKN2A germline splicing mutation affecting both p16INK4A and p14ARF RNA processing in melanoma/neurofibroma kindred. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 31, 398-401.
126. Pinheiro, U.B., de Carvalho Fraga, C.A., Cangussu Mendes, D., Marques-Silva, L., Conceicao Farias, L., Goncalves de Souza, M., Batista Soares, M., Marie Jones, K., Souza Santos, S.H., Batista de Paula, A.M., Velásquez-Meléndez, G., Guimaraes, A.L. (2014). p16CDKN2A SNP rs11515 was not associated with head and neck carcinoma. *Tumor Biology*. 35(6), 6113-6118.
127. Pjanova, D., Engele, L., Randerson-Moor, J.A., Harland, M., Timothy Bishop, A., Newton Bishop, J.A., Taylor, C., Debniak, T., Lubinski, J., Kleina, R., Heisele, O.

- (2007). CDKN2A and CDK4 variants in Latvian melanoma patients: analysis of a clinic-based population. *Melanoma Research*. 17(3), 185-191.
128. Poi, M.J., Knobloch, T.J., Yuan, Ch., Tsai, M.-D., Weghorst, Ch.M., Li, J. (2013). Evidence that P12, a specific variant of P16INK4A, plays a suppressive role in human pancreatic carcinogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 436(2), 217–222.
129. Polakova, V., Pardini, B., Naccarati, A., Landi, S., Slyskova, J., Novotny, J., Vodickova, L., Bermejo, J.L., Hanova, M., Smerhovsky, Z., Tulupova, E., Kumar, R., Hemminki, K., Vodicka, P. (2009). Genotype and haplotype analysis of cell cycle genes in sporadic colorectal cancer in the Czech Republic. *Human Mutation*. 30(4), 661-668.
130. Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liégeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., DePinho, R.A. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 92(6), 713-723.
131. Potrony, M., Puig-Butille, J.A., Ahuilera, P., Badenas, C., Tell-Marti, G., Carrera, C., del Pozo, J.L., Conejo-Mir, J., Malvehy, J., Puig, S. (2016). Prevalence of MITF p.E318K in patients with melanoma independent of the presence of CDKN2A causative mutations. *JAMA Dermatology*. 152(4), 405-415.
132. Przybyla, A., Lamperska, K., Mackiewicz, A. (2015). Analysis of sequence variants in the 3'UTR of CDKN2A gene in melanoma patients. *Contemporary Oncology*. 19(4), 276-279.
133. Puig, S., Malvehy, J., Badenas, C., Ruiz, A., Jimenez, D., Cuellar, F., Azon, A., Gonzalez, U., Castel, T., Campoy, A., Herrero, J., Marti, R., Brunet-Vidal, J., Mila, M. (2005). Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *Journal of Clinical Oncology*. 23(13), 3043-3051.
134. Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*. 83(6), 993-1000.
135. Rafnsson, V., Hrafnkelsson, J., Tulinius, H. (2000). Incidence of cancer among commercial airline pilots. *Occupational and Environmental Medicine*. 57, 175-179.
136. Randerson-Moor, J.A., Harland, M., Williams, S., Cuthbert-Heavens, D., Sheridan, E., Aveyard, J., Sibley, K., Whitaker, L., Knowles, M., Newton Bishop, J., Bishop, D.T. (2001). A germline deletion of p14ARF but not CDKN2A in a melanoma-neural system tumour syndrome family. *Human Molecular Genetics*. 10(1), 55-62.

137. Reef, S., Shifman, O., Oren, M., Kimchi, A. (2007). The autophagic inducer smARF interacts with and is stabilized by the mitochondrial p32 protein. *Oncogene*. 26(46), 6677-6683.
138. Rees, J.L. (2004). The genetics of sun sensitivity in humans. *American Journal of Human Genetics*. 75(5), 739-751.
139. Robertson, K.D., Jones, P.A. (1999). Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus. *Oncogene*. 18, 3810-3820.
140. Ross, D., Kepa, J.K., Winski, S.L., Beall, H.D., Anwar, A., Siegel, D. (2000). NAD(P)H:guinone oxidoreductase 1 (NQO1) chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-Biological Interactions*. 129(1-2), 77-97.
141. Rothman, N., Smith, M.T., Hayes, R.B., Traver, R.D., Hoener, B.A., Campleman, S., Li, G.L., Dosemeci, M., Linet, M., Zhang, L.P., Xi, L.Q., Wacholder, S., Lu, W., Meyer, K.B., Titenko-Holland, N., Stewart, J.T., Yin, S.N., Ross, D. (1997). Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1609C→T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Research*. 57(14), 2839-2842.
142. Royds, J.A., Al Nadaf, S., Wiles, A.K., Chen, Y.-J., Ahn, A., Shaw, A., Bowie, S., Lam, F., Baguley, B.C., Braithwaite, A.W., MacFarlane, M.R., Hung, N.A., Slatter, T.L. (2011). The CDKN2A G500 allele is more frequent in GBM patients with no defined telomere maintenance mechanism tumors and is associated with poorer survival. *PLoS One*. 6(10).
143. Ruas, M., Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1378, 115-177.
144. Ryška, A., Horký, O., Berkovcová, J., Tichá, I., Kalinová, M., Matějčková, M., Bóday, A., Drábek, J., Martínek, P., Šimová, J., Siegllová, K., Vošmiková, H. (2017). Maligní melanom – od klasické histologie k molekulárně genetickému testování. *Klinická onkologie*. 30 (3), 182-189.
145. Sakano, S., Berggren, P., Kumar, R., Steineck, G., Adolfsson, J., Onelöv, E., Hemminki, K., Larsson, P. (2003). Clinical course of bladder neoplasms and single nucleotide polymorphisms in the CDKN2A gene. *International Journal of Cancer*. 104(1), 98-103.
146. Saldivar, S.J., Wang, Y., Zhao, H., Shao, L., Lin, J., Spitz, M.R., Wu, X. (2005). An association between a NQO1 genetic polymorphism and risk of lung cancer. *Mutation Research*. 582(1-2), 71-78.

147. Sanlorenzo, M., Wehner, M.R., Linos, E., Kornak, J., Kainz, W., Posch, Ch., Vujic, I., Johnston, K., Ghossein, D., Monico, G., McGrath, J.T., Osella-Abate, S., Quaglino, P., Cleaver, J.E., Ortiz-Urda, S. (2015). The risk of melanoma in airline pilots and cabin crew: A meta-analysis. *JAMA Dermatology*. 151(1), 51-58.
148. Sarbia, M., Bitzer, M., Siegel, D., Ross, D., Schulz, W.A., Zolt, R.B., Kiel, S., Gedert, H., Kandemir, Y., Walter, A., Willers, R., Gabbert, H.E. (2003). Association between NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) inactivating C609T polymorphism and adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract. *International Journal of Cancer*. 107(3), 381-386.
149. Sauroja, I., Smeds, J., Vlaykova, T., Kumar, R., Talve, L., Hahka-Kemppinen, M., Punnonen, K., Jansen, Ch.T., Hemminki, K., Pyrhönen, S. (2000). Analysis of G1/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 28(4), 404-414.
150. Sauter, E.R., Yeo, U., von Stemm, A., Zhu, W., Litwin, S., Tichansky, D.S., Pistrutto, G., Nesbit, M., Pinkel, D., Herlyn, M., Bastian, B.C. (2002). Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Research*. 62 (11), 3200-3206.
151. Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf links senescence and aging. *Experimental Gerontology*. 39, 1751–1759.
152. Sharpless, N.E., Kannan, K., Xu, K., Bosenberg, M.W., Chin, L. (2003). Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene*. 22(32), 5055-5059.
153. Siegel, D., Kepa, J.K., Ross, D. (2012). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) localizes to the mitotic spindle in human cells. *PLoS One*. 7(9).
154. Siegel, D., Ross, D. (2000). Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radical Biology and Medicine*. 29(3-4), 246-253.
155. Siegel, D., Yan, Ch., Ross, D. (2012). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochemical Pharmacology*. 83(8), 1033–1040.
156. Slater, E.P., Langer, P., Fendrich, V., Habbe, N., Chaloupka, B., Matthäi, E., Sina, M., Hahn, S.A., Bartsch, D.K. (2010). Prevalence of BRCA2 and CDKN2A mutations in German familial pancreatic cancer families. *Familial Cancer*. 9(3), 335-343.
157. Soufir, N., Avril, M.F., Chompret, A., Demenais, F., Bombled, J., Spatz, A., Stoppa-Lyonnet, D., Bénard, J., Bressac-de-Paillerets, B. (1998). Prevalence of p16

- and CDK4 germline mutations in 48 melanome-prone families in France. The French familial melanoma study group. *Human Molecular Genetics*. 7(2), 209-216.
158. Soufir, N., Lacapere, J.J., Bertrand, G., Matichard, E., Meziani, R., Mirebeau, D., Descamps, V., Gérard, B., Archimbaud, A., Ollivaud, L., Bouscarat, F., Baccard, M., Lanternier, G., Saiag, P., Lebbé, C., Basset-Seguin, N., Crickx, B., Cave, H., Grandchamp, B. (2004). Germline mutations of the INK4A-ARF gene in patients with suspected genetic predisposition to melanoma. *British Journal of Cancer*. 90(2), 503-509.
159. Soukupová, J., Zemánková, P., Kleiblová, P., Janatová, M., Kleibl, Z. (2016). CZEKANCA: CZEch CAncer paNel for Clinical Application – návrh a příprava cíleného sekvenčního panelu pro identifikaci nádorové predispozice u rizikových osob v České republice. *Klinická Onkologie*. 29(1), 46-54.
160. Spica, T., Portela, M., Gérard, B., Formicone, F., Descamps, V., Crickx, B., Ollivaud, L., Archimbaud, A., Dupin, N., Wolkenstein, P., Vitoux, D., Lebbe, C., Saiag, P., Basset-Seguin, N., Fargnoli, M.C., Grandchamp, B., Peris, K., Soufir, N. (2006). The A148T variant of the CDKN2A gene is not associated with melanoma risk in the French and Italian populations. *Journal of Investigative Dermatology*. 126(7), 1657-1660.
161. Srijiwangsa, P., Na-Bangchang, K. (2017). Roles of NAD (P) H-Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) On Cancer Progression and Chemoresistance. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*. 6(4).
162. Šarmanová, J., Šušová, S., Gut, I., Mrhalová, M., Kodet, R., Adámek, J., Roth, Z., Souček, P. (2004). Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *European Journal of Human Genetics*. 12(10), 848-854.
163. Šlampa, P., Petera, R. et al. (2007). *Radiační onkologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-469-0.
164. Šušová, S., Novotný, J., Vodička, P., Souček, P. (2005). Úloha genetických polymorfismů biotransformačních enzymů v rozvoji kolorektálního karcinomu. *Klinická Onkologie*. 18(5), 188-193.
165. Tas, F., Erturk, K. (2020). BRAF V600E mutation as a prognostic factor in cutaneous melanoma patients. *Dermatologic therapy*. 33(2).
166. Thakur, N., Hussain, S., Nasare, V., Das, B.C., Farhat Basir, S., Bharadwaj, M. (2012). Association analysis of p16 (CDKN2A) and RB1 polymorphisms with susceptibility to cervical cancer in Indian population. *Molecular Biology Reports*. 39(1), 407-414.

167. Traver, R.D., Horikoshi, T., Danenberg, K.D., Stadlbauer, T.H., Danenberg, P.V., Ross, D., Gibson, N.W. (1992). NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Research*. 52, 797-802.
168. Traver, R.D., Siegel, D., Beall, H.D., Phillips, R.M., Gibson, N.W., Franklin, W.A., Ross, D. (1997). Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *British Journal of Cancer*. 75, 69-75.
169. Tsao, H., Benoit, E., Sober, A.J., Thiele, C., Haluska, F.G. (1998). Novel mutations in the p16/CDKN2A binding region of the cyclin-dependent kinase-4 gene. *Cancer Research*. 58(1), 109-113.
170. Tsao, H., Chin, L., Garraway, L.A., Fisher, D.E. (2012). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes & Development*. 26(11), 1131-1155.
171. Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J.L., Thody, A.J. (1995). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genetics*. 11(3), 328-330.
172. van der Rhee, J.I., Krijnen, P., Gruis, N.A., de Snoo, F.A., Vasen, H.F.A., Putter, H., Kukutsch, N.A., Bergman, W. (2011). Clinical and histologic characteristics of malignant melanoma in families with a germline mutation in CDKN2A. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 65(2), 281-288.
173. van der Velden, P.A., Sandkuijl, L.A., Bergman, W., Pavel, S., van Mourik, L., Frants, R.R., Gruis, N.A. (2001). Melanocortin-1 receptor variant R151C modifies melanoma risk in Dutch families with melanoma. *American Journal of Human Genetics*. 69(4), 774-779.
174. Vargas-Torres, S.L., Portari, E.A., Klumb, E.M., Guillobel, H.C., de Camargo, M.J., Russomano, F.B, Macedo, J.M.B.M. (2014). Association of CDKN2A polymorphisms with the severity of cervical neoplasia in a Brazilian population. *Biomarkers*. 19(2), 121-127.
175. Vasen, H.F., Gruis, N.A., van der Velden, P.A., Hille, E.T., Bergman, W. (2000). Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *International Journal of Cancer*. 87(6), 809-811.
176. Vasiliou, V., Ross, D., Nebert, D.W. (2006). Update of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Human Genomics*. 2(5), 329-335.
177. Veinalde, R., Ozola, A., Azarjana, K., Molven, A., Akslen, L.A., Donina, S., Proboka, G., Cema, I., Baginskis, A., Pjanova, D. (2013). Analysis of Latvian

- familial melanoma patients shows novel variants in the noncoding regions of CDKN2A and that the CDK4 mutation R24H is a founder mutation. *Melanoma Research*. 23, 221–22.
178. Viros, A., Fridlyand, J., Bauer, J., Lasithiotakis, K., Garbe, C., Pinkel, D., Bastian, B.C. (2008). Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med*. 5(6), e120.
 179. Vorlíček, J., Abrahámová, J., Vorlíčková, H. et al. (2012). *Klinická onkologie pro sestry*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3742-3.
 180. Vuong, K., McGeechan, K., Armstrong, B.K., AMFS Investigators, GEM Investigators, Cust, A.E. (2014). Occupational sun exposure and risk of melanoma according to anatomical site. *International Journal of Cancer*. 134(11), 2735–2741.
 181. Whiteman, D.C., Milligan, A., Welch, J., Green, A.C., Hayward, N.K. (1997). Germline CDKN2A mutations in childhood melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 89(19), 1460.
 182. Yakobson, E., Shemesh, P., Azizi, E., Winkler, E., Lassam, N., Hogg, D., Brookes, S., Peters, G., Lotem, M., Zlotogorski, A., Landau, M., Safro, M., Shafir, R., Friedman, E., Peretz, H. (2000). Two p16 (CDKN2A) germline mutations in 30 Israeli melanoma families. *European Journal of Human Genetics*. 8(8), 590–596.
 183. Yan, L., Na, W., Shan, K., Xiao-Wei, M., Wei, G., Shu-Cheng, C. (2008). p16(CDKN2) gene polymorphism association with histologic subtypes of epithelial ovarian cancer in China. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 18(1), 30–35.
 184. Yang, G., Rajadurai, A., Tsao, H. (2005). Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 125(6), 1242–1251.
 185. Youl, P., Aitken, J., Hayward, N., Hogg, D., Liu, L., Lassam, N., Martin, N., Green, A. (2002). Melanoma in adolescents: a case-control study of risk factors in Queensland, Australia. *International Journal of Cancer*. 98(1), 92–98.
 186. Zhang, Y., Xiong, Y. (1999). Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Molecular Cell*. 3, 579–591.
 187. Zhao, R., Choi, B.Y., Lee, M.-H., Bode, A.M., Dong, Z. (2016). Implications of genetic and epigenetic alterations of CDKN2A (p16INK4a) in cancer. *EBioMedicine*. 8, 30–39.

188. Zheng, B., Wang, Z., Chai, R. (2014). NQO1 C609T polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis. *Archives of Medical Science*. 10(4), 651-660.
189. Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Walker, G.J., Hayward, N., Dracopoli, N.C. (1996) Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature Genetics*. 12, 97-99.

Internetové zdroje

1. Arenbergerová, M., Arenberger, P. (2005). *Maligní melanom kůže (článek pro širokou odbornou veřejnost)*. Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FNKV Praha. In: <https://melanomy.cz/>. [online]. [cit. 20. 11. 2018]. Dostupné z: <http://www.melanomy.cz/?touch=malignimelanom>.
2. *Biomarkers: CDKN2A*. In: <https://www.mycancergenome.org/>. [online]. [cit. 7. 4. 2020]. Dostupné z: <https://www.mycancergenome.org/content/gene/cdkn2a/>.
3. *CDK4 gene*. In: <https://ghr.nlm.nih.gov/>. [online]. [cit. 26. 11. 2018]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CDK4#>.
4. *CDKN2A gene*. In: <https://ghr.nlm.nih.gov/>. [online]. [cit. 26. 11. 2018]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CDKN2A#>.
5. *CDKN2A*. In: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [online]. [cit. 12. 11. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1029>.
6. *ClinVar*. In: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [online]. [cit. 9. 11. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
7. *Gene: CDKN2A – Marked-up sequence*. In: <http://grch37.ensembl.org/index.html>. [online]. [cit. 15. 2. 2020]. Dostupné z: http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000147889;r=9:21967751-21995300.
8. *Gene: CDKN2A*. In: <http://grch37.ensembl.org/index.html>. [online]. [cit. 7. 2. 2020]. Dostupné z: http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000147889;r=9:21967751-21995300.
9. *Global Cancer Observatory, 2018. Cancer today*. In: <https://gco.iarc.fr/>. [online]. [17. 2. 2019]. Dostupné z: <https://gco.iarc.fr/today/home>.
10. Macháčková, E., Lukešová, M., Házová, J., Navrátilová, M., Pavlů, H., Kosinová, V., Kuklová, J., Foretová, L. (2008). *Hereditární melanom gen CDKN2A*. XXXII. Brněnské onkologické dny a XXII. Konference pro sestry a laboranty. In: <https://www.linkos.cz/>. [online]. [cit. 6. 12. 2018]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/hereditarni-melanom-gen-cdkn2a/>
11. *MC1R gene*. In: <https://ghr.nlm.nih.gov/>. [online]. [cit. 26. 11. 2018]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MC1R#>.
12. *Melanom.cz*. In: <http://www.melanom.cz/>. [online]. [cit. 14.3.2020]. Dostupné z: <http://www.melanom.cz/Pro-m%C3%A9dia>.

13. *Melanoma*. In: <https://ghr.nlm.nih.gov/>. [online]. [cit. 26. 11. 2018]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/melanoma#>.
14. Mužík, J., Malúšková, D. (2014). *Epidemiologie zhoubných novotvarů v krajích České republiky*. In: <https://www.khspce.cz/>. [online]. [cit. 17. 11. 2018]. Dostupné z: https://www.khspce.cz/wp-content/uploads/prednasky/16-5-2017-03-epidemiologie_ZN.pdf.
15. *NCBI Nucleotide*. Homo sapiens chromosome 9, GRCh38.p13 Primary Assembly
In: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore> Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000009.12?from=21967752&to=21995324&report=genbank&strand=true
16. *NCBI ClinVar*; [VCV000041580.2]. In: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [online]. [cit. 9. 11. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/41580/>
17. *NQO1 gene*. In: <https://ghr.nlm.nih.gov/>. [online]. [cit. 6. 4. 2020]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NQO1#resources>.
18. *ÚZIS ČR*. (2016). *Novotvary 2016 ČR*. In: <https://www.uzis.cz/>. [online]. [cit. 17. 11. 2018]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/novotvary2016.pdf>.
19. *ÚZIS ČR*. (2019). *Zdravotnická ročenka České republiky 2018*. In: <https://www.uzis.cz/>. [online]. [cit. 21. 1. 2020]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008280/zdroccz-2018.pdf>.

Seznam obrázků

Obr. 1: Růst incidence zhoubného melanomu kůže (C43) a jiných zhoubných novotvarů kůže (C44) (převzato a upraveno dle ÚZIS ČR, 2019. [online]).	3
Obr. 2: Věk pacientů s maligním melanomem (převzato a upraveno dle ÚZIS ČR, 2019[online]).	4
Obr. 3: Fáze histologické progresse transformace melanocytů. A) normální kůže, B) radiální růstová fáze – melanomové buňky migrují do horní části epidermis C) vertikální růstová fáze – melanomové buňky pronikají do dermis (Chudnovsky et al., 2005).	7
Obr. 4: Izoformy genu <i>CDKN2A</i> (převzato a upraveno dle <i>CDKN2A</i> [online]).	15
Obr. 5: Mechanismus působení p16 ^{INK4A} a p14 ^{ARF} v buněčné proliferaci (Chudnovsky et al., 2005).	18
Obr. 6: Mechanismus působení p16 ^{INK4A} a p14 ^{ARF} v buněčné proliferaci (Chudnovsky et al., 2005).	20
Obr. 7: Restrikční místo enzymu Hinf I.	45
Obr. 8: Vizualizace PCR produktů genu <i>CDKN2A</i> a <i>CDK4</i> pomocí gelové elektroforézy. PCR1 (333bp), PCR2 (510bp), PCR3 (399bp), PCR4 (156bp), PCR5 (168bp), PCR6 (159bp), PCR7 (292bp), marker – FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU (Nippon Genetics) (zdroj vlastní).	47
Obr. 9: Příklad sekvenační analýzy genu <i>CDKN2A</i> , PCR 3, vzorek č. 10. Černá šipka označuje heterozygotní stav R (G i A) pro benigní mutaci v genu <i>CDKN2A</i> c.442G>A (rs3731249) (zdroj vlastní).	48
Obr. 10: Výsledek sekvenační analýzy genu <i>CDKN2A</i> , PCR5, vzorek č. 34. Černá šipka označuje S (C i G) stav pro <i>CDKN2A</i> c.*29C>G (rs11515) (zdroj vlastní).	48
Obr. 11: Výsledek sekvenační analýzy genu <i>CDKN2A</i> , PCR5, vzorek č. 35. Černá šipka označuje homozygotní stav C/C pro genovou variantu genu <i>CDKN2A</i> c.*29C>G (rs11515) (zdroj vlastní).	48
Obr. 12: Vizualizace PCR produktů genu <i>NQO1</i> po restrikčním štěpení pomocí gelové elektroforézy. Jamka 1 a 4 obsahuje vzorek s genotypem <i>NQO1</i> *1/*1 (196 bp), jamka 2 a 3 obsahuje vzorek s genotypem <i>NQO1</i> *1/*2 (fragmenty o velikosti 196 bp, 119 bp a 77 bp) jamka 5 obsahuje hmotnostní marker – FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU (Nippon Genetics) (zdroj vlastní).	50

Seznam tabulek

Tab. I: Rizikové faktory pro vznik melanomu (Badenas et al. (2012)).	10
Tab. II: Klasifikace podle Breslowa (Šlampa et al., 2007).	12
Tab. III: Nejčastější mutace genu <i>CDKN2A</i> (Goldstein et al., 2006).	17
Tab. IV: Nejčastější mutace v genu <i>CDKN2A</i> včetně jejich účinku	22
Tab. V: Reagenty izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini použité pro 1 izolační reakci z bukálního stěru.	37
Tab. VI: Reagenty izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini použité pro 1 izolační reakci z plné krve.	37
Tab. VII: Reagenty kitu Qubit™ dsDNA HS Assay (Invitrogen) použité pro měření koncentrace DNA.	38
Tab. VIII: Sekvence primerů pro PCR reakci.	39
Tab. IX: Složení 1 PCR reakce.	40
Tab. X: Průběh PCR reakce.	40
Tab. XI: Reagenty GeneAll Expin™ Combo GP kitu použité k přečištění 1 vzorku.	41
Tab. XII: Reagenty ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup použité k pro přečištění 1 vzorku.	41
Tab. XIII: Složení 1 vzorku pro sekvenaci.	42
Tab. XIV: Primery použité k sekvenační analýze.	42
Tab. XV: Sekvence primerů pro PCR reakci.	43
Tab. XVI: Složení 1 PCR reakce.	44
Tab. XVII: Průběh PCR reakce.	44
Tab. XVIII: Reagenty použité pro restriční štěpení 1 PCR produktu.	45
Tab. XIX: Zastoupení variant polymorfismu c. *29C>G v této studii.	49
Tab. XX: Zastoupení variant polymorfismu c. *29C>G.	49
Tab. XXI: Referenční hodnoty pro polymorfismus genu NQO1 C609T.	50
Tab. XXII: Zastoupení variant polymorfismu C609T genu NQO1 této studii.	51
Tab. XXIII: Výsledné frekvence genotypů genu NQO1 *1/*1 a NQO1 *1/*2 v laboratoři GENLABS s.r.o.	51
Tab. XXIV: Výsledky vyšetření a data z on-line dotazníku.	52

Seznam příloh

Příloha č. 1: Znázornění pravidel ABCDE (Arenbergerová a Arenberger, 2005).....	89
Příloha č. 2: Informovaný souhlas.	91
Příloha č. 3: Dotazník.....	93
Příloha č. 4: Koncentrace DNA.	96
Příloha č. 5: Sekvence genu <i>CDKN2A</i> s vyznačenými variantami (Gene: CDKN2A – Marked-up sequence [online]).....	97

Přílohy

Příloha č. 1: Znázornění pravidel ABCDE (Arenbergerová a Arenberger, 2005).

A – Asymetrie – ložisko je nepravidelné s nesymetrickým tvarem

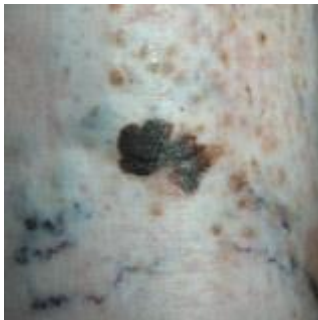


Asymetrický tvar

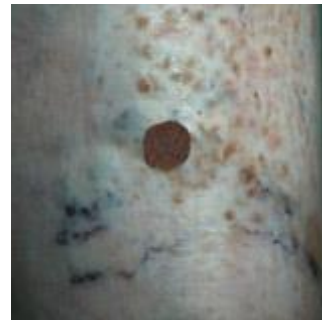


Symetrický tvar

B – Borderline – okraje ložiska jsou cípaté, nepravidelné se zářezy a výběžky



Nepravidelný okraj



Pravidelný okraj

C – Colour – barva ložiska se mění, tmavne a stává se skvrnitým



Vícebarevný projev

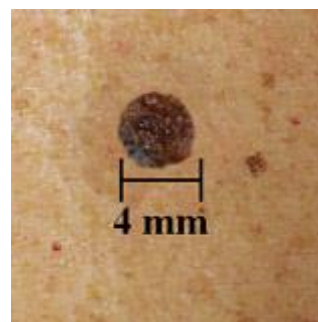


Jednobarevný projev

D – Diameter – průměr ložiska je nad 5 mm a trvale se zvětšuje



Větší než 5 mm



Menší než 5 mm

E – Elevation – růst do výšky či evolution – vývoj v čase




Vyvýšený projev



Plochý projev

Příloha č. 2: Informovaný souhlas.

	GENLABS s.r.o. Lipová 1789/9 370 05 České Budějovice 2	SOUHLAS S GENETICKÝM LABORATORNÍM VYŠETŘENÍM Číslo stránky: 1 Počet stránek: 2
	Molekulárně genetická laboratoř Odbornost S16	Vypracoval: Mgr. Dagmar Riegeřt Bystřická, Ph.D.

Souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením

Jméno a příjmení vyšetřované/ho:

Rodné číslo:

Jméno a příjmení zákonného zástupce:

Vztah k vyšetřované osobě:

A. Účel genetického laboratorního vyšetření

- Ověření/potvrzení diagnózy nemoci a/nebo vývojové vady:
- Zjištění predispozice pro nemoc a/nebo vývojovou vadu:
- Zjištění přenašečství pro nemoc a/nebo vývojovou vadu:
- K optimalizaci léčby:

Alternativy navrhovaného genetického vyšetření (jejich vhodnost, přínos a rizika):
.....

B. PROHLÁŠENÍ VYŠETŘOVANÉ OSOBY

B. 1. Za výše uvedeným účelem souhlasím s odběrem dále uvedeného vzorku z mého těla a s provedením těchto vyšetření:

Cytogenetická vyšetření:

- Karyotyp (analýza chromosomů)
- Jiné:

Molekulárně genetická vyšetření:

- Vyšetření pro chorobu:
- Jiné:

Jiná vyšetření:

-


Ze vzorku:

- žilní krev sliny tkáň: kůže, sval
- Jiné:

B. 2. Souhlas vyšetřované osoby/zákonného zástupce:

Potvrzuji, že mi bylo poskytnuto poradenství ke genetickému laboratornímu vyšetření za účelem jak uvedeno shora a že jsem poskytnuté informace porozuměl/a. Lékařem mi bylo sděleno a vysvětleno následující:

- Účel, povaha, předpokládaný přínos genetického laboratorního vyšetření
- Možný dopad výsledků genetického vyšetření na mé zdraví, na zdraví mých potomků (budoucích generací) a zdraví geneticky příbuzných osob
- Rizika neočekávaných nálezů, což jsou nálezy, které nejsou účelem genetického laboratorního vyšetření, přesto je analýza genetické informace zjistí. Neočekávané nálezy lze rozdělit na skupinu nálezů, které mohou mít pro pacienta a osoby s ním geneticky příbuzné závažný dopad (např. zvýšená náchylnost k nádorovým onemocněním nebo nepotvrzení otcovství). Druhou skupinou jsou nálezy, které se odlišují nálezů běžných, ale jejich konkrétní dopad na současný a/nebo budoucí zdravotní stav pacienta a geneticky příbuzné osoby nelze na základě současných znalostí stanovit.

	GENLABS s.r.o. Lipová 1789/9 370 05 České Budějovice 2	SOUHLAS S GENETICKÝM LABORATORNÍM VYŠETŘENÍM Číslo stránky: 2 Počet stránek: 2 Vypracoval: Mgr. Dagmar Riegeřtová Bystřická, Ph.D.
	Molekulární genetická laboratoř Odbornost 816	

Měl/a jsem možnost vše si řádně, v klidu a v dostatečně poskytnutém čase zvážit, měl/a jsem možnost se lékařem zeptat na vše, co jsem považoval/a za pro mne podstatné a potřebné vědět a probrat s ním vše, čemu jsem nerozuměl/a. Na ty to mé dotazy jsem dostal/a jasnou a srozumitelnou odpověď.

B. 3. Rozhodl/a jsem, že se vzorkem bude po ukončení testování naloženo takto:

Souhlas se skladováním

Pokud to bude možné a/nebo účelné, bude můj vzorek skladován pro další vyšetření provedená k mému prospěchu a prospěchu mých příbuzných. Před genetickým vyšetřením, které by se provádělo za jinými účely než uvedeno v části A., budu řádně poučen/a a toto vyšetření bude vždy provedeno až s novým informovaným souhlasem. Vzorek bude skladován u poskytovatele zdravotních služeb uvedeného v záhlaví nebo v laboratoři spolupracujícího poskytovatele a to nejvýše po dobu 50 let.

- Jestliže bude vzorek mého biologického materiálu dále skladován, **souhlasím/nesouhlasím** s jeho využitím ke kontrole kvality DNA diagnostiky (vzorek je použit jako kontrola pro vyšetření jiného pacienta).
- **Souhlasím/nesouhlasím** s anonymním využitím skladovaného biologického materiálu v lékařském výzkumu dědičných onemocnění.
- **Souhlasím/nesouhlasím** s tím, že mohu být znovu kontaktován/a, na adrese uvedené ve zdravotnické dokumentaci, za účelem souhlasu s využitím mého skladovaného biologického materiálu v konkrétním výzkumném projektu.

Nesouhlas se skladováním

Můj vzorek bude po provedení genetického laboratorního vyšetření zlikvidován max. po 15 měsících od data doručení do laboratoře s tím rizikem, že nebude již možné v budoucnosti výsledek vyšetření v případě potřeby znovu ověřit a že zlikvidování vzorku může vést ke zhoršení dostupnosti diagnostiky u rodinných příslušníků. Dále jsem si vědom/a, že pro další genetické testování bude nutný nový odběr materiálu.

B. 4. Dále si přeji následující:

- Abych s výsledky genetického laboratorního vyšetření : **byl(a) / nebyl(a) seznámen(a)***
- Abych s výsledky neočekávaných nálezů **byl(a)/nebyl(a) seznámen(a) ***
- Aby o **výsledcích vyšetření a/nebo neočekávaných nálezech*** byly informovány následující osoby:
.....
- **Souhlasím/ nesouhlasím** s využitím výsledků genetického laboratorního vyšetření a relevantních informací o mém zdravotním stavu, včetně fotodokumentace, k vědeckým a výukovým účelům za podmínky, že tyto údaje budou prezentovány a publikovány pouze v anonymní formě.

Na základě tohoto poučení prohlašuji, že souhlasím s odběrem příslušného vzorku z mého těla a s provedením výše popsaného genetického laboratorního vyšetření s podmínkami uvedenými výše.
 Jsem si vědom/a, že svůj souhlas mohu kdykoliv písemně odvolat.

Podpis vyšetřované osoby (zákonného zástupce).....

V Dne.....

Jméno lékaře:.....

Podpis:

* vybranou variantu označte

Příloha č. 3: Dotazník.

GENLABS s.r.o.
MEDIPONT s.r.o. – ambulantní klinika
Matice školské 1786/17
370 01 České Budějovice



DOTAZNÍK PRO VĚDECKÝ VÝZKUM

Tento vědecký projekt vznikl ve spolupráci genetické laboratoře GENLABS s.r.o. a Katedry medicínské biologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity za finanční podpory Studentské grantové agentury (SGA) PřF JU.

1) Vaše jméno a příjmení

2) Byl/a jste v minulosti na vyšetření kůže?

ano ne

3) Pokud ano, proč jste na vyšetření kůže přišel/la? (Vyberte jednu nebo více odpovědí)

- na doporučení praktického lékaře
- měl/a jsem mnoho pigmentových znamének
- měl/a jsem znaménko, které se změnilo
- měl/a jsem kožní nádor v minulosti
- kožní nádor má člen rodiny
- chtěl/a jsem si nechat vyšetřit kůži

4) Byl Vám při vyšetření kůže diagnostikován kožní nádor (melanom)?

ano ne

5) Pokud ano, v kolika letech a v jakém stádiu?

Věk v době diagnózy:

Stádium melanomu v době diagnózy:

6) Vyskytuje se ve Vaší rodině někdo jiný s diagnostikovaným melanomem?

ano ne

7) Pokud ano, jaký je Váš příbuzenský vztah?

matka otec sestra bratr dcera syn strýc teta

jiný: _____

8) Byla Vám diagnostikována rakovina slinivky?

ano ne

9) Pokud ano, v kolika letech?

10) Vyskytuje se ve Vaší rodině někdo jiný s diagnostikovanou rakovinou slinivky?

ano ne

11) Pokud ano, jaký je Váš příbuzenský vztah?

matka otec sestra bratr dcera syn strýc teta

jiný: _____

12) Byl Vám diagnostikován jiný typ rakoviny?

ano ne

13) Pokud ano, jaký typ?

14) Vyskytuje se ve Vaší rodině někdo jiný s jiným typem rakoviny?

ano ne

15) Pokud ano, s jakým typem a jaký je Váš příbuzenský vztah?

Typ rakoviny:

Příbuzenský vztah:

matka otec sestra bratr dcera syn strýc teta

jiný: _____

Příloha č. 4: Koncentrace DNA.

Vzorek (PK, BS)	Koncentrace DNA (ng/μl)	Vzorek (PK, BS)	Koncentrace DNA (ng/μl)	Vzorek (PK, BS)	Koncentrace DNA (ng/μl)
1 (BS)	20,4	16 (BS)	18,1	31 (BS)	13,2
2 (BS)	25,3	17 (BS)	5,64	32 (BS)	112
3 (PK)	25,8	18 (BS)	16,6	33 (BS)	108
4 (PK)	28,3	19 (PK)	27,2	34 (BS)	71,1
5 (PK)	42	20 (BS)	37	35 (BS)	133
6 (PK)	38,6	21 (BS)	74,4		
7 (PK)	71,7	22 (PK)	120		
8 (BS)	80,2	23 (PK)	92		
9 (BS)	107	24 (BS)	45,6		
10 (BS)	104	25 (BS)	95		
11 (BS)	467	26 (PK)	48,8		
12 (BS)	204	27 (PK)	24,5		
13 (BS)	128	28 (BS)	67		
14 (BS)	130	29 (BS)	29,9		
15 (BS)	101	30 (BS)	71,4		

Příloha č. 5: Sekvence genu *CDKN2A* s vyznačenými variantami (Gene: *CDKN2A* – Marked-up sequence. [online]).

3 prime UTR	5 prime UTR	Coding sequence	Frameshift	Inframe deletion
Inframe insertion	Intronic	Missense	Non-coding exon	Splice akceptor
Splice region	Start loss	Stop gained	Stop lost	Synonymous

Exony jsou zvýrazněny tučně

GCYCGCGMGGTWTARGRYVSATYCWGGCARWYMGACAGGCTCYKCTCSRGGMACCGSVVWYAGCGRCGGGCTSAAGG
 CSGYGTCTCTGGRCTCGACTMMSGCCDCBAGAGGCCSGCGAGCCSGCGTCVVMGYTCCTGGACKAGARSBDMGCCTC
 SCTTASASCGCGCYAGVRYCCGCTYCTCCKATTCTCHBGTGTCYTGTCYTCRACTSAYCCCTCCTTTCTKC
 YSCTCMTTCYTTTCCTTRYCYGYKTTTACTRYTCCCAAACRFBACCGCTTTTCTGTCTSCCAGCTGKAAAAGAGGA
 AGGNAGASMKTCCMGAAAGGATCVVTRATGTGSAARAAARKGRRGKAGRRRACRTGGASRSGGMGAASYGGAGAGAGR
 ACGTASRCSGARRRTRGRMGHGGGATCAMGGRRKAGTCSRBDTGTCYGGGRCBRGGCAGRMRWGBARCGGGRG
 YVGCCARYGGTCGYCAAGACAACCATKCTWCSBGASGACGCGRCGACA GGARGGGAGYRCKCAKAGRRRARVRRAGC
 RYRGGGRAAGARGAARGAGGAAGAAGSGYTMAGATGCYCCSGRHTRTMGTKAAAGTTAAACCGAAAAATAAWATRD
 GSTAGAYACWAWGSACTHGGTRCTTSTCCAGCCASKVKCCCTCGGCGACRCGKGCAGCTGGRARRRRAATGRMGYS
 YGGAMCCASMWGRGACYCYCRGRTGCGRTCCACCTACSYAGTYBRSYRS CAGGYCKGRTYNAMAGCTCMSGYAGCGC
 CRRRCYCYGYSVRGTMYAGRTGTCGRTCAGAGKCGTGRCGRGTTTMTGTTAAAYTTCGCTTKTTTTCARATCTMG
 AHRAGRWCGGAGYGGCWTTYAGTTCAAAMMTGACATTCRRCTCTCTGATTGGYGGAWAGRCARTSAKATKACCTCG
 CTTTCCYTTCTTCTTTTTCATTTTTAAATAAYSTAGTTTGAMGAATGRAAGWCKTTCGACDARS GGAGCCWGAATA
 AAAYAAGGRGRAYAGGGGRGCGGDRACGRASCRGCRCCAGAAHYHBSCKGSRGCGCGSCTRWKCYWCTAGGGYCDTR
 TSARGTGACRGMGTAGCYRRGGGGHGAGCTGYCYGGVKYTGYS TTCYAGGHGTCYGGMMC SNVGGCCVTCACCRCSG
 GGCGYCSKCGCWVGGGTRGGAAGATRGKRRTGGKGGTGGGGGCGCAYACRKRGMGGGAAAGWGGCGGTARGHGGVAG
 GGA SARGAAMGCVVGCYK GARCCGCCCGCSSGCSDCCTHCCWAYRRRYR CCTCCSGCARM CCTTYCMGMWRBGS
 GRRCTCAGAGCCGYTYCVAGATCTTRGAGGTCYGGGDGSGRGRKGGGGKGGGRKGGGKGRGGKARGGKRSVVK
 SGGSMGCRCTYHGKGAAGGYGRKWYGCSCCYCGCRRGCRGAGWKGGRYRDSGKNC SGTKYRTGGRTSSYRKYVTGMA
 RTWAADRRBD CAGGAGTGKYKYGCHMWHCWYGBTRYCAMARGGSCYDCAGCGRCTGBVRAKCTHRGYYYR GAGG
 MRGCRAGAWCAYGCTGHGCDWTCYTGGYGACCHSSGDATTCKRYGYRCRYGCRDYCCCKCDACTGAGGGTTT
 HVYGGTYCRYMTCYSYKCTYABKRDRDARBGGRCAGMGCYRKRRCGCCCRCRCYGTVGYYSIVRDTCTRAYGYT
 RCKGASRAGCCVEMGTCIACRCRRCAGCYRYTTCTTRKAVRYNAGGTAGGARASGHCHYTYRVAAASKCCD GGRHKC
 WYTM SVYRYTTSYTTTKTTTGGTRYGATKTCGTAACRGATAATTCGTCTBTARCC CAGGCKAGGAGGAGGAGSRGAT
 AACRCYRGTGGAGGYTTCSCCDTTYRVRTTACAAYGAYWHASRCRWGTGRTTCTCKCAGTACYRWTSAACSKGGACY
 TCCCTTYWCACAGCCS TCAATCS TGGGAAACTGAGGCGAAYAGAGCTTCTMAAYCCACSKCAGAAGYCARTKAGTCC
 CVAATATCCTGGGTGRGAATGAYHAA GASWSASACAMABACMMACACACACASAYACACACACACAVAYACASAGTAG
 GAAARGTGTAYTTCAAGCAYACWTCTCTTKCTCCTTGGRAKAAATATTGCAAAHCRMTAAGTTTTCTGGAGRMRGCC
 TTTTTCTCCCAGCYTCCYRGGGRKTCAYCCTCTCYCACYTTSCAGGAGAKTGGAGRAYCBGTGAGWTACGRRGCA
 YGSAGBCAKYGACTTCCGAAATGCTAASARGGATYGYRGGATCASH TACTGCTRCGAGRAGCAAGCACTTGHTTCTT
 GGRGGAGTTTTGCARCCAACAGRGAATRGGCYTTCTYTGWGWTYAGAGGYAGVGGTCYBRCRYCTGARWGATTGA
 AACTGCTYSSGAMARTGCTVVTAYGTTTAGCAARYGACRGAAGTGTAGAAGTGTCTGAGAAATCCCARCTGRYRGGY
 AYTTT AGTCATCTMAGASRACASTTAGCACAGYTTAAAAATGARCCCTAYTYCTTGAAAAAMAGAATCRRSGYASTT
 TTCTCCTCAYDYTGAMRAATGTTGACMCRGCCWGWGTRATTCTCTATARCARRGAAACTGAAAGAMYATATGTACAG
 TTAATAATATGTRMAATGCTAATYAAAAYWTSTRTARTAAKT YTWAAAGTARTTTAATGAGGYTTCACCTTTRYGACCR
 TCTSTTGTGGTAT SCTTCRYCAGGAATRTATRGCTTCAPAAARGBAAGGCSARCRRRAGSGGTMA TTA YTWTTTACTSY
 AATGTKAATTGTCTCTTTGACATGGAATRTAAACCTGTTAAAA YFAYCAGTGWTTAATKYARTGTCTCAA KTTYTAY
 TAGMAAAAAWTYAWAATCWV TAGGATAARTGACATTTTAYTTTWTAC KTTTCATATT RTRCAASTTAA YTTTKTWAA
 TTTAGKCAAAGGAGYBTATAAASRATTT CAGGGCCTGT K GCTGGATT K GATTTTAATTCATT YTGAAACATT SAYAAG
 RCYCTSKTTGTTGTTKHTKTWAA CWS TGGTTTATCYRTATCAGCAAAA R TTTAGCCASKGTGASYSRSTAACVTRTGA
 ATATASTTCYTAAYATTRYTGTMTATATAAAAA YATKTATTA YYYASKTAARTTAYTCYATATAARATCATTTTGT
 TTAATAATTATTAGTTGCCCTCTGAAAATCTGTASYAACRAAGTAGRAYAKGTC RATGYATAATAATGCMATWATTATGT
 DTTYTTYAGWTTAGGCCATAAARCVTAACRTTGTGGTGATTTTAA SYTASAGAAAMTATTTYVTYAGYRWKTAART
 AYATGCAKRAAMYRCARRAATATTTAAATGATARDBITSATTTGAAATAGATCAWTTTTTGTATTTAGGTRTAARTCAR

TTTTCRGGRYRATATGTGAARAGYRCRATCTTYAGRAABTTTTCTCAARATAGAACACAGCTKGGAYAGAATRTCTKKAA
ATATATGCARTTTTCCARTTTCAYAMGYMARATSATAYRCATAATAAAAAYMTAGYRKTGWHAATTATAATGATATG
TAATTAYATATTTCACRRTAATATATTTTATGCYCATRDCTAYAYTGATTTGGGAAAYATATAYGGRTMCTAATTATGT
TAGGRITTCAWWYAAATCCYVGRSWRGCACHAGTGCTAAAAATWCTTVTATGAATTAAYTTAAATCATTRCAWRTRAG
AYGTTATTTTARMTTTTTTWAGTTTCTGCAARTRTGTTTATTATGACTTTTTTATTTWTATRTGATTRGAAATAYATA
TAYTAAATYYCAYRTTACCAGTTSTTAAACMARARACCTRAAAAATTSCCAYAGTTGATTGTTAYTTCTRCYTB
GSTGCATTTACAAAATARTMATATTTWRRTATGAARTTAAATATWSRITTTTATATAGCTASITTCAGAAGGCTCAGR
TWATTTTTTTCTTAAATAGCACMGAGTCTCTCAAGGTAMGCACTGKGCRRTTAGTATAAACBATTATCCBCATGTG
TACATGAKTCAYARITTTGTATGTRTTCCAAGTGAAYCRTAGCCMTTCARAAATCMAGACTTAYATTMATTMTM
CTTTGAGTACTCTTSAATTTTAGAAAGTCCATTAYRRITCCYMASRTAGCAAAYACRTAGCYTATTACBRTCBMYGWTG
GTTTRCAGATCTRTATATCCMYRTTAGTTYATYACTRTWCACTAYCATGRTRGAGTTAARCTAARCMATTTTCCCAAY
AWATGAAAACTCCTRTTACTRARKTSATACAARTKGTATCAAAAAATACTTYTTAHAGCAAGDTTCAACAGTGGCC
YARTGCTTYTMCASITTYTTCWRAAGNCCTTGAGARACAGAGAATACTCAAYKYGCCTTCTGTRCTAAAACATTCTAG
GCYDRACTAARACTGAACTTCRTRTGTAGAACACTGTAGGCYAGGGGTRTTCAATSKTTTACCTTCCTGSGCCACAY
AGSAARAAGAAGAAATRTCTTGGACACACATTAATACACTAACACTAACAYAGSTGATGAGCTWAAAAWAAAAAA
MMAAATCATGWTACTTTAAGRAGTRTATGRMTTGGKGTGGGCAACATTCRAAACCATCCTGSRCTGCATGTGACY
TBRGDCCCACAGGYTGGACAAGSTTGGCCYRGCTCCYCMWYCTGCTGCAMAGCSYAGCCTGATACAAAAACCAACGTG
ATAAAAAGYTTYTVTKGTGTTTTATTTGGCARITTTWAGTTATRTAAACAATSGGTACAGTTTCAVTTTSTMAATATM
AAATKWTTMCATTGAATATGWRTYTTTRAGRCAAATTAHTGAATYTRATTCTCRTATACSIACTACTAAVYRTCTT
YTYRITTTGTTGYCCARTRGAGATTMATCMACCTCTTAAAYACTTYAYCATCAASRARARCARITTTGTATTTAAAT
GAACCCATCCRTTYCATTGAGTATTTKATATTCAGGCAYCATCTRARGAAAGRAAGDTTCTGAYARAGATTAATA
CAGATGGAWAAGTAGTRRCAAFAAATCAAAAAYTGCATRMAAKTSKRGCAARTRAMSTGTTMAATTAAYGGTACARTTAC
ATTCTGGRTCATCASGTATCTGAAGMTATTYSATAGASGTTRAAATGATTGCATTATRAAGTYAGTKTTTTWAAAG
CWAGATTCRAACARTWAAHYVTTTCYCYBTCYCBCTYCTMTCTCTYWCTSTCTVTCBCYCWCAVCAAATTAGTTAT
AATGKTTTTYGCAGGATGARAGRGGTTGSGRAAAHKTTTTSGTKMWAYTTAYTTTCTTCGTTCACCTTYGAGTYYTCC
AAAGTGCTRTGACCRIMATSAGYAAAAVRYACATKKCCAAAGOSTTTGACVBACRGTAASARTCTTACWCARYGGATG
AACTRAGAGCTTMCCTACCTTAGATGGGTAGSGAGGRAGGAAAKACARGGARACTGAGTWRITTTARGTGTCWTAYDC
GAGAAVYRTGGCWTYAAGGTCTREGAARACCTGCGAGGGCBKTFGADTCAGASTGTGAAATGCMGYAYAKGTCCAKTCA
CCAMGAYGTTCCATTTTAAARYCCATARTACCGTAGVIRFACCTGTTTMCAGGTGMCTBTGTGTAGRCWWSWGGYCA
YWGCACTTGGNGCCCTTCTBGRATSTCTTCTYNYGCCCOYAYAYCCMYCCYACAAGCACACYCTAGKMCCCTCC
AATCAATTTAGGCAKGTCTYRCSRYMTCYGGAGSCACGCTSKKGYGCAAGGGCCCTGRACCCDAAAGAGBGCCYGC
CBERNGACARGAGWTSAGAKCASGSTGYYCYCYSWSTYCTCAGCCYMYCATCCTHCYCCWRSATCYTRACTTCCC
CWCTMTCYCAATTCCTAGAGRMGYTGCGGATCCAGAGGYTTAAATGGCARCTGKAAMRAGGTMCTCCAACAAGAATT
YRGAYGYTAGRTCAATTAYCACTCCMSCGGRYCACITTSBCAGGARCGATGTGRTSSSTTATCTAACTGYGGAC
CTGSGGTWCCAYGTSGAAGACMYTGGGATTTACAYRCCGCRGTDGRRRTGGGARCARACASAGTYTGAGTGGGBTT
AGTGGAAYCSAGACRAAARACAGRACMYRACRGAAGKCAACTYGGGTACCTCTCRSSTTGKAACDGTAGSHCT
TGTTTTGMRGRGATGGGTAGATSAAAAGTGASTCAGRGTTASCCSAGGARCCAMGRGRMAAKTRCSYCTCKGAGAS
TCTTGACRGCSATTTGTTMSYTTCCAARMYAGAYGGANWCCMARGAGTRTTGAAARVSCASGACTTCCCTYAGTTTC
TCCAAMTGGSGRTGCAVATGDTATAGRVAGTGRCCSGTMTGATTTTTYAGTRAYRATRTCTSTCCATGTTTTCTT
CWTRYRTTGACRTTYCCCCAERTTWGAAAATTYCTTTTCAATGAAATCATTGAHWRRANWAAAAAWAGTAAGTA
GYTADWAARMCARCATARTTTCATGACRGTAARGYCAAYGATGRAGAAAMMCMKGGGWATTAATAAATGAAGDATT
KGTITGTAARATGATAAARRGYCCYTTAAAGGGTSTRACTOYTYCTRGA AAAACSCAYYAACTGGSAACCGAACAG
ATTTACVYRTATYMTAATTCATKCTRTTTTAAATGTGATTYRGSAAACCCACATGYGTTTACWRITKTCGAADCTASCV
AAVGTCAARTAGSRTTWTYTTCTDITTBTTGAAVGTGAATCTCTGTACRMAGCCMTATAAACASAAKAAARTTACARD
AATGATTTTAAARTCACATRCAAAACCAAYRRTAKTGCYAGAGGAGRGTAGTCAAGGAYGGCRTTATGAAASAAAGYGA
SRRAGAATTTCCAAARARACAGMAHGATAGGGCTHGSTGGAYSAAAGAASSWTTCYRTCTAAARGRWATGGCARATACT
TAGASTCTCTGAACCCACTGAAVYCBYGGACTATTTAACTAATATYTGAGTTCCAGATAYAGCACRGTROYTTGTACR
YARYGGTATTWTWAAAAAWAYRTGTCYCYKAGATTTTTTTTCAACTTTWTTTTRRGAGRAGAGGGORCATGTGCAGG
TTAATTAACAAAGGYATAYTGCASORYGCTGAGGTTTCGAVWYKACTGAATBTGKCMCTCRASYAVTGAGCACAGTAC
CCACARTRGGYAGTRKTTTCARMCCTYGCTBATKCCCTTTCTCCTCORTSTAGTAGTCCCCARTGCTRYTGTKMTCAT
ATTTATGTSAAATTAGCATTTBTTTTYTA AAAAGSGTGGTTGAAGAAATCTCASTGCTTGTCTGTCTCCTCBAGWGC
ATTCRTTTAATMRITGAGSCTGGARTGRTRGYTTTCATYTGGRSAACTCYAYARTCAA WAAGAAGTAAWAAAAARRR
AAAAAAAARTRAAGCCRTCRASTRCRGGAYTGAATTTCCAAAGYATYAGAGGWCTTTTCAAAAAATRGYATGTTKA
TTTTTMRITTTTTATKACTTRTKDCTTTGTTTCATSAAAARTTAAASATGTTMTCACAAAGVAVYTTTTAATCAACTA
TTTCTCAGTTTTCTCTYTCACCTCAAAATAARAYATCWTAARTYRTYTA AAWRRTTGTAARGCAVTAGGATTTTTW
TAAAGAGARRAARTTTTAYAGAGGTTYAGAAWTACAKGAACMAARMYATGTA RTCTCWTAAGCAAAYKGAACATAAY

AAATCR^TAYM^ATCAA^KGT^RAV^VTAA^RTAAAAA^BYY^TCTGCTT^TC^TTAA^WTGAATTATGT^SAGTAACTAGAAAT^KTT^W
AAAGTAT^RGC^AA^RGS^TTAA^ACA^RCAGCATTATTA^YC^YGGGCT^KC^TT^TAAAAA^TAM^RTATTTCTGGG^RW^TC^RCD^TTCAG
AA^RATTTGAY^TCAGATTTGCT^STG^KGT^YCCAGAAATC^WGCATTTTAAATAAACACTTGAAG^KAK^AACTA^WTACAR^GGT
GGCCCA^HTG^RGAM^ACAATTTGACAAA^TRY^RACCA^RY^TTTA^MTTTTTAAACCT^YATTTCC^YY^CY^KCTTTATCTTTGAATT
^RAR^GTCCA^RGATTTTAGGTAAGATT^WTAR^GTTTTAGAS^TCAGT^KTACTGGATCCCA^SGGARRARAG^WHT^SAGTAATCAG
TGGAGG^AGTTAY^TTTCC^MRR^RTGAAGGAGACCCTTTATTATT^MTG^YGAM^CCT^TTR^TRY^GAAY^TGGAA^WRSAA^KGT^CTT
^STAGAT^ACCACA^WTTTTACAGTCAGAA^MR^TAGTTT^GRGAGRAAAAA^ATRY^AAC^MAGATATATT^TTR^TGT^TTAA^MGY^TT
ACAGAAC^BMG^MCAGARA^AATTT^YCACATAAGCT^RRTAAGAT^WHR^TY^RMT^TTTTT^WAAAAACAC^YATATAC^MW^TMT^TTTCT
^KTY^RKGCAGGA^WGWATGGA^TCTCYSTSTSTSTSTSTV^WSTCTSTSTGYGTGYGTGTGYGYGTGTGTGTGTGTG
^TGT^TKY^AYAAG^RGGTTTCTTT^CATT^TTATGATCC^RGACCAGGCT^BGTAAATAAC^RTG^WCA^MCM^TAAAR^TTATGT^AAR
^AAA^GAAAAATCAAAGC^WCM^RG^KGTTTACAGGY^TTAACTTA^YRS^TYAT^STAAG^WTCAGGGCAAGAT^KGC^RGG^MAR^AT^K
TAGCCA^TARMAGART^AAA^RYAY^TTR^TGGACAAAATGAT^KK^RTCT^TYAT^RTCTC^YGTAAAAG^YA^YR^GTGAT^KGGRSV^SD
^AWA^TRY^AGRY^GAA^WAAT^RTAAAGCT^WAAAAG^TAH^AV^TTAT^DAG^RAAAACT^WAAAT^ATY^WTD^MC^KTCAAAT^KW^IM^RTY
^TTTCTG^YTTTTAAG^YTAAM^AK^TTGTCTAATATTACAC^BAGT^GRCT^YT^RCT^RR^TGTATTAGG^RAAAAG^YK^TR^TTTTTGC^Y
TTCTTTT^CK^RAGTGCC^MS^CATTTTCTTGCTCTCATTCTCTTT^YAGG^STGCCAGATCATCT^KA^YK^SR^GCAR^TK^GW^TA
^ACTCTCTCACC^SAATTTAAAG^RAA^BR^GCAG^YTGTCTAGAGAACAATG^VM^TY^CCS^ARY^TGAA^YATS^TAA^YTR^TTAAAT
GTCC^RW^CAT^YR^GACACTTT^SM^ATTTTAC^YCCR^WGCA^RTTTACATGCT^RART^AAGTTKAAGWTGAA^TRY^ATAT^MTTTTMA
^CRTTTAM^TTTTTT^RAAAGC^KTD^TTGR^AA^CTTTTY^TTCTTAAATCAC^RTR^RAA^AARTTA^YTGTTTTCT^TY^AAAAAACAATTA
GGAGGAGCTTAACAA^YRATAGC^WCA^YTTCAA^STTC^CM^TTATCTAATT^YAATTATCA^YAA^YATCCTT^WY^GTTTT^YAD^YR
TTTT^RTTTTTTT^CATTTTGTAGAK^STGGAGASTGAG^RCT^YAK^AYAS^GTTCAT^RGCCTACCAAAGT^CATT^RACK^ASTA
^RTTCA^YATATAGTTGAAGT^GRT^TG^YCCAY^GGGARY^SSTATAAAT^RY^RTAT^WTGGTTTCA^GTTCCAT^MSY^TTTAGT^KA
AC^YATTA^TTY^TGAAAGT^YD^YTAA^VCC^MTTTGG^RY^CT^SACT^RTACTCAAGC^RT^YAGC^YR^TR^TRAGT^CCAGT^RRA^TA
TTTATT^VRTTGAAG^KW^GGW^TARY^RTCTTTCAA^RAATTTA^TK^TTTTT^GACCAAM^RTAAAC^YAGTGA^AAAAT^TC^KY^AT^R
TGACT^RTAY^AT^RTAAATTA^YT^TATTCCT^RYY^TTAA^YW^TAAAA^RY^RRTAA^STGGGATA^SV^YR^TCACCAGCAC^RGGAA^S
^YACTT^SARG^HV^TGC^AK^TK^GAAAGATTACTTTCT^KTAS^CATTCA^RTGACCT^RTGAR^CCAGATT^YTATTT^YY^TTGCTTA
TT^MR^CTGT^CATGGT^RCC^DGAR^TGAA^SYATGAG^RAA^CTCY^YAG^WGW^TTC^RTGTT^CY^YATCTG^TAAACCTGAGACC^STA
TGGTAGTCC^YRT^MATAAGAGGTAGAT^RAAA^YAGTATGTGTGAAGAGT^CACTGTAAAC^WTTTACACAGTGTA^YRT^YTGT
CAGTTATTA^YR^GT^RH^CTARTTAA^ACT^RY^GCM^ST^TARGAAAGCA^HRT^TR^GTTT^YTT^DCAGTAAATACCTACTT^CAT^KAT
AATTT^KT^CART^RTAS^CYAGAWAY^TTCTAAACT^MCACTTAA^AAA^KATAC^RYAT^YATAAT^AAAAR^TAY^ATTT^WTR^TATT
CAGACT^MCT^RGTAT^KTT^YCAAG^STGTTAGGTA^AAAATCA^SY^GTAA^WTTTGCATAC^KY^TTAAATTCACA^YCK^GTR^CAGAA
GATCT^RTATG^RTGR^CTTTAV^GGTATAY^CTCTAAG^STAK^TCY^AS^TATT^CATAATCATT^RAAGAG^WTATTAAG^YAGT^RT
TT^RTGAR^CCCCCTGTT^YTY^TTAAGACAG^RAAATCAAG^DTAGCTT^TGAAAACT^RGAAAAA^WRTTAY^YART^CTATCT^VTC
TAATAA^YCCR^GAATAATAATTT^SCA^RAKKART^CACTGAAGATAA^STR^KAT^KTY^ATAATCCTT^CR^GAA^YGGTGTG^YASM
^DY^CTGR^ATATCT^KAATCAM^YAST^TY^TGACC^RAAAMAATTY^WCTAAAAAT^MTTTAGT^RTAAAAA^TTATGTGTGTR^TG
^TGT^STGTGTGA^YGAAAGGAR^TGATAR^GCAGAAAC^RTTACT^TGTCA^TCY^WTAC^RAC^AATTCAAATGCCTACCT^TR^GAGGG
TGAM^CTT^CAG^TTA^TTTTTTATGCA^RATGT^RAA^KAA^KTTAT^YTAGAAGTAS^GRTATC^RAAGAGTAACA^MAAAAACACTA
AATA^STATGCT^YTCTTAAAG^RCT^WAATTGACTT^KGGGGTTTTAAATC^RGTACAGAR^TAAACA^WACAG^KR^TATTCTGTTA
TCA^WTGCCTTTTTGARAAR^WTAAATTA^TGGAW^GTTAT^MATC^TTAA^MY^RTAR^CAA^YAMAAAAGA^YAAAA^CTSTAC^YCTCA
ACCCAGAR^ACY^CAAAR^GAAAAACAY^GAGTGGAAA^YGTTAAATCTGTAY^GY^GAA^RAG^TGCTAAAACAT^KAATAGGAAGCA
GTTACT^YATTTAATCAR^AG^TTGATTATAT^WTCAT^CAAGAAGTTGATCCCT^TTGAR^KGGAR^TTGAAT^YCR^TATCAG^RT
GAA^KAA^WGTGAY^TTGGGAR^RGAATGGTCTAACACAA^RAAAAATTTCTTGAATCTTT^RATAATATCAGAG^RGVAGAY^T
GGCTTCAGAA^YTCTC^YTAAGTTCAGGAAA^SGACACAGAMA^ATTGAAC^RY^AAC^ASTARRAM^KR^TAGAR^TCC^MR^GAAAG
CAAG^SWAC^YTTTTAMAGGR^TAGT^TTY^TARAGGG^RYAAAA^GGGRRAY^AAM^CATTC^WCC^WTTT^SR^TGASRAAM^GCTTCCA
^YG^TAGATG^KT^KCCCC^TGMAATTA^SAGT^RY^MCTAAACC^MGT^RT^TAAAC^SYATCAGTGAACATGAATAT^TAAAC^YTY^CR
CT^SCCAG^DAGTGA^AAC^YRAAT^MSAKTAT^YR^TTTATCTGTGAY^TTTTCAR^CWK^TAT^YTCAGA^ACT^TAA^MRS^CAYAT^GY
^RTAC^MTCAGCAG^RTAM^GCAGAAAT^KAGATAY^TRTATAT^RH^TTR^TGT^TRS^CAATTA^AAAAGGACAGC^WTATTTGAS^AG
^RGGAA^RATCY^GT^STAY^CRA^KAATGAAAAA^RAGGGAG^KT^WAGGAAAA^GTAGTTTAGA^KAAAGT^RAATTTT^KCAR^TTCC
TCM^GTTTTTAA^STR^TAGTTTCT^YCR^TTGTAC^YTT^CYACTTGAATG^YACTCCAAGCAGT^RGAGGTGGGTAGC^WR^TGAAT
GCAGAGG^RAA^CY^TGAAACACAGTGA^YAY^YC^WSCAGTGTAC^YW^TCT^RTGATT^TRAT^RAGR^GTTK^TTY^TT^GRRAY^YTY
^TTCTK^TCAT^MACAY^GGGAACTT^YGTTACAAA^KAAR^CTGTTTTTTCA^RARG^KTTAGAATTCAGAGGTAGCAT^CR^TACC
TTTTA^RAAG^RGAA^TTTT^GCTTGT^TGAAACCACAG^WY^AC^YTGCTAGAA^WTACAGGAA^BTAA^RAAAAAT^TACTCAR^AAG
^KACATTTATT^YTGATGACCTAAATGAATAACTTCAT^VG^TAAATGTCAT^RTAY^RTTCT^YAAAA^MATTA^AAAARR^CACS^RT
TT^WTTGAGAG^YCTA^CY^RTR^CAY^MBDRA^KTTTT^KAY^RT^DICTGACATCTTTATT^SCTCAM^RGTA^AMY^TTAT^SGR^TAAA
TTTTATTTTCCCA^YTTTGT^RM^KGTGAGGAA^RTAAAGGCTC^MGAAA^RTTT^RM^RTAA^MTT^MY^TCAAGCCCA^YAGAGCT^R
^GYAAA^KRAGAG^RTCAR^TTY^AHS^TGAR^TTT^KAAAGACTAGGCTTGT^OY^CAY^TTR^CRTAY^GTGTCATT^YCCAAAATTA^WG
ATTAAGG^WTR^TV^GY^TGGCATTTCC^YR^CCC^RMM^CACATTAAGTCC^RATTA^AR^WAGCTGTGGCCATAGAA^RGARTGRAGRR

TGGAGA GAGGA AACTGAS TTCAACAGCTAC RGC AAR CATT TA TAGCTGAR TAACCA YAGCTACATAGTTC YTCAR TAK
GTACCA YTCCKC CATT TTTGTT WT YTA YAAATCA RAATGR TRRS TTT YYAAAAAG CAGTTTT RCAR TATAT TCAA VAGC
CTTYTAC YCTTT SAAAACT RCRRT RCTATTTTTA RWRG CAR TTAGAA RCACCTTAAAT RICTRAYAACA GGGACATC
ATTWAGT MAATTATAAC TTTTCCAGTG RGATKTSTTACASCTSKRAA RR TARMR TTTATGAAK GTTTTT S GAGAM
GTT YGGAAAA YGCTGTAATA RGT TA KRAAA MGCT YATTTCAAAT TGC VTA RTRTT CACAR TR TAAAGAY KAAGC AAA
GAAARA GGAAGAAGTATTTCAAATGTT MR TAAYTA TTR CTTTGTGY GRVR TAGTTTTT CATT TTT SYRY GTGCAS STA
ATTC STTARKTRY TTK TAA V TATGTG RGCT BTAATCAGGAR AGCAAATCATT MAMAAM TGAS GGSACTGAATTAAR YG
ACTTT YAGGGGA YWTTGCR FGKCTTTGAGT YSCR AATTT STAY CACTAY GTATTACT RHTGAAGAAT RAYCA YAGAAG
CACAGTAGTT YCTGAR AATGR RGAGTCAGT RATCTGGCC YAGGTTTTG YAA STT DCT SYAAAGCARA STCCTCAAAG
AAA RGG RAGCA YTGATGAGTTGTCCACAATG WACT VGATAAATTATCATTAR GAAAACATATTGTASTAR GGAGAS TG
AGGAC Y TCTCAAACA SAOCY GRGAA MS TTA MGT WTGAAC TTTTCTTTCT YATT DMY TAAGCRY TCTGARY TTTTYT
TTTTD YTKYWTT M TGA R GAAA RAR TAATACT Y TCT R TSCD TGGGAVAG YTG YGGA ATTAYAWATYA CD CRTATAAAA
ACTGCTTGATGCTTGTOW CATAGCTGGGG RT KGAAAAAAT KR TRR CCATTATTTTCTTG SCAACTTTTAAAT RWWTTTK
TYR TTAT YTC TAT TTSY T TCTGCCT R TCTCCTCT RATT MGT TTTATT WCTTATTTT VTT YYTCAGGMW GAGGTCAATT
M TCAATA WCTGT RSTGTAC MTAAT AWACATA TATA YMM AATATGTGY ATATA STATGTAC R TRYR TRCA YACT STGYT
AAT YTTTTAG YGTT C WYAGM TRATCAAA YAGCTACAA YAGATRY AAGTAATTC R CAC WAGTAATTA TCMACATAR
AAAWWAW TTR CRAAR MR TTAASK AATAATTGTCTCCR TRAGCTGCAA SA YMCCTCATTTC RCAA VAGTACACCC TR
GAGATRY TTT MR TAGTAAAT TCTCACATAGATTTAAATCACAT WTGTTTTGCACATAATTTAGAAAAG WTAYCTGC
TATAT RRTAMGT MAT R TACTT YTAAGTTTCTTCA RAATATTT TGGGAA RATGATAATAG K TACT KCTAR TTC YATA
MCCAGTT MACA TTTTGGAMACTAA B GTTG RMAAY TGKSACT WAA YTR TAATTAY GCATTAATCT M MACAC WTCAAA
KAA YTTTGCATT YTG TACTCTTACTAAGATC SAGTTT RWR TAGGAR GDT RAATTTTACAGTAAT WYTGAAK GAGRGA
R GTTGGCAC MGAGTTT S TAAAAGAS TAC STTCC KTA YRGCMAAT M TAAATAATTGTGCTATA WTKWATTTAA YTA RA
TAGAGAAT WGTARA AR GSM GAAA KAAA YATCCAATGTTTGAACCT STAGAG M T TACTCCCAGRAC MCVW TGYKT
TTTC YTAGCA WATC WGT YGGAS GTCTGCT YHRCTTCT VAGAR GTCT MYCTTTCAYGYTGAAK CTAT MTTT YTCCT
TGTGGAAC RYAAD IWR T TAAAACCTTGCAATTATTT RCCTAAGAAA VTG YTTCTT HCCMD T TAAAATRY TCT YACY
ACCC WCR TTTGACT HWV T TATCAGAATTTTAT MYRKRGYAGCTTCAGGAR CACTTTG RCAHI WCRGGGCTAAACCR
AR TCKGT KTT KAC MY GTTTGTGAT YATACC YRT YTTGTARAT SAARM CRHT SAAGCT AKWAAAAAAAAAAAAAVYCA
TTT YTT CAGGGTAACAAAGTAGGTGGTAGAW ST RGGAYAGGRAY TCTAATTTCTT WACATTAT TGCCT K TCTAHATTA
AA RGRATRCATGGAATTR TTY TCCATTG MCTTTGCM TKSAD TAATTAT ST RTKGCWCCCAAC R TCCWR TTYTAGAW
CTCATCT RTGAAGGC YTAACA YWRS TGTACC YGGGAGC KYATTACAGRR CATRKATCT YR TCTCTATAAGCTACTTC
CKAAG KAA YWCTCTTTAATTATGGRARYW TTT YCAGAC WST DAWAT MB TTTTTC SYGV TAAACACAAGTGTGAGR TGT
CATTT RT SAGAATGCAYCRY CCCAGYCTT YCCT YCTCARAT RATTAY TGTAG SCYCCACTRAGARY TCAATCHCAGTT
CAAGACCACCTTCTCTCCAGAGAAGC RWRTATATATAYAYRYRTATATATATATAYACAYRYRTATRTAYATATAY
RYDRTATAYAYATRYAYRYRWATATATAYAYACAYDRTAYRTATAYAYAYRCGTRTATATRYAYRYDTRTAT
ATAYAYRYRTRTATATATAYAYRCGYDTRTATATATAYAYRYRTATAYATATATAYRHRTATRTADTRYRYACAY
RTRTAYAYRTRYACRYRTRTATATATAYAYAYATTTTTTTTTTTTGAGAY GRWRYCTC NCT SGT HRCCVAGGCTGGM
RTGCAGTGG HG YKATCKOR GCT YAYRYAASCTC RCCCCBRGK TFCAGYCMYTCTCYTKCTCA GCYTCCB GAGT
AG YTGGAAMTACAR GYGCYRYCAC STC SCCTGGCTAA TTTTTKGTATCTTT RKYAGAG RKR GGT TTTACCGTGTTA
CCTAGGATG K TCT VSAWBTSYT GAYMYBGTGAKCYNOCYGCCT YRGMCT YCMWRARTGCTGGGATTRORGGCVTGAGS
CACC RCGCCTGG YAGAGAAGCAAATATA YTGAT RST YGKTACCAATAC RTGCT STTG DCTAAGAARSCTM TTTCTTA
ATTAATA YTGAYAACTTTAA GCSRAGTRCCT KAMATATAT TRGT RCTCAGTTACTCTTTTCT MACT AAA GTTAT RAR
TGATGATTCTAATAAAAGTAR CT T V T T T S TCTACTAD TTTTAT YR TGT TTRYTTAAWT CATTAGAA RGGCCATGGRCA
TAGTACAAAATTC AAACAATABAAA TCR T GKAAT RTGAAAAGTAAGTACATGCCATCCCA B T TCTTCA T TCT YTTA
CCT YAC MGGTAA SAGCTTTTCCYGTAYSTC MCCAGARRI RTTO YR TGTATATTTGTTTTTAAACAYMAAGS TATATTT
AAAA CAATTATCTTTAAT ARTRY GTTAATATTGAACTGGT WRAGAAATATGTGTGT RTYAT MFCACCT SAADYVYA
AACAATA SAACAARAGAGAGCCCA TTTT GAAAATTATGGACAATGAATCTAGAAAT WVTCTCAA AKATTT YRCAGTC
AAAAAAT WGTTCATTAS ATAC AYRASAACTGTCSR TTTGGTCTCAS YGTAGMGCTATTRY YTCARMYCCCT Y TATTTTC
CTAACAAAA YCHTCTTG YTR TCCCAK GAAA YAYRTS CATAW TGYCAR TCT RCAATGC CRYR T CAGAACCAGAA YSC
ARCTCTGKAACACT RCCTT Y TCAAGTATCTTTCT K TCTCTTTATGGTAATATGTTGAA YTWATATCA YATCT RKTAY
GACTA STCYYSATTT D TAG SGTG STGAAGYAS TARCACCCT SCAGGKCTTTC YTTAGTTTAAAG RRRGTAAT YRG
GT RKCCCTACTGTGTCATGATCTCYAMYTCW GCTGGS TTTWCCAGTCTGGTTTTAARRARYAAA CAAAAGGCTTCY
CTGTCTGAGT YTYAM TCAACCR TCTCTCTA YYYATAAGAR GTATTCCAAACCT TTBGAT TCTCRRAY YTCCTARS
HNAMCR TCTTATTTTCAST YTGCAAR CRAKCTAA CCTMYTYATTOW TDSAWGGAAGTRYCTCAMCTTCTCYCYRYTC
TGABMTTTTCTCCCTCCCAMATCT RTGT RTYTCTT STGAVAAAATCTATAAH CACHDCTRIACT YTGAGTTCYATTTTC
TTC RKTAY TTTT GAGGGRMCTCA VGT CCTCARAAATATCTTRCTTGY YTG TGTACTTAACTTTCTTT YATT VTTT
CTAACT TKHYTTCTCTT YACT TGGCACTTGCCTT YCAGGTAT MGTGT KCTCAGGT CTCCTCCACCTT BCR TCTGC

CTCAVYTYRTGGCAVAGGVCCTSAACYATCAVYASCAAGCTRKGAAMGAGTRGTCAA YRCAGTGTCCCACTTYCTT
GCCVTYCYATTATCCTAGTWTTCTTTTGGYTCTCTGAGGAGTOMTTCACAGRSTGGTKTTSRGGAAATAARTCTAAAT
GAATYRMTTWCARTTTTCCCTAAACKTCYRTGYSSTTGYACATCHTYTTACCTCTGCVTAGAATATCTTTCTCCTTCBT
TYCCRTCTTTVARCTCTCAORTRCTTTCTCAAGACTRGGDBMAGCYCTCAGCABCHDGAAGCCTTTGCCTACTASARA
CWAATGRRAAKRARTYTRKTCWCCTTTTCATTTTCTTKYAWMRYTCTGTGYTTTMTTTTGCYCTTCTAAGAGYRTTAY
RTTCTTCMTTTAAWCCYRAACAACYGTTTGAGGCAAGTACMRTTATTATCSTAADCAMWGCAATGAGAAAACAGAGG
CSAGACAWGTT SAGTAACTKYGATAAAAGTTAAAGAACCARTAA RTGGAACA SYTGAR GTTTGAA YYCTGGCAGTST
GACTGYAGAVATACTATRTTWGACCYACWYCCCTCTGCCCCACCCRTGTCTGYCCTTAKTTTCTGRGWGTGTGAA
TRAATGAACAGSTRRTIAGTCTTTTTTTGTTDTAAGACTGATCAGAATTAAGRCWGVTTTAAATTYCA YRTGKWGAATT
TTCRARACKGCAAADGCGAGTGCAAASTAA RAAAGARYGGCATTCTCAGGARAGASGRRAAGTAMRTGTAKAATAA
TAATRM YARTAAYS AACAACTTYAGTAAAWTTAGTAWRWR YAGTAAATKTT YACATTAAWAGCTTTTGACRYACAT
TRTYRTATTTTATGMCACATGAAA WR TATTATWATMCM TTTTGYACMYASGAAATCTGAGASTGGYR TAAGGAGCA
CAGMGATCCAGKAYTTTTATATTT YCWTTCTTCTAGGATTT YRCACCTCAGGT YRR TAYGT RTGAGTAAACWGRAGTA
YAATGGRCTYTYTAACAGRAARCWAGGRAAGTTTTCCACTRTTATTARTTATTACRYAATWTTYTWTWAAKTTYA
TTATTATTTMTAYTTTAAGTTTASASWACRTKYGCA CAAYRTK CAGGYTWGTTACATAKRTATM CATGTGCCAYGTT
VGTGTGCTGCAYCCR TYAASTCATCATTTARCATYAGRTATA YCTCCKAWTGCTMTCCCTYYCCCTCCSCSCTH CRT
AAGATTTATAATGRR TAATGGACTTMAAT YWYTAGAGYAAAATGGCYCYACCCAAGKATGCCAYARCTCTCCAGAGC
TYTRYTRCAARATA YGAGATMTACATRTS TAAAAC TTGTT Y TYS STATTTCCAAAGC R GKCAASTYTTA SACSTGTTT
ATRATGCATCCAAA TRTTGTTTYTAHATGKTTG CATCKYS CATCTCWTCA YCAATAGCTATATATRTTKTTCA YARG
AGCTGAAAGAGTT YTT SATGTAGGAR TCCATRGTA KAGTTT YASRGRAATCYSTGAATTCACYGMAARTWYYATSTAG
AARTACATGTGYMARTGRAYVCATMTKTTTWWAAAAA WWK CATYACOWACTTTMTTTTTT GAR AAGAA SKTRTTTAYT
TMAACAGAYTCTTGAAGGRGCCTACYCTTYCCA YCTCTCCACCCOYATTAAGAACYRYTRTARGCYDGGCAGATGGC
TYAYGCCTGTAAT YCCAGYRCTTTGGGAGGYTAAGR TGGGTGGRTYASCTGHGGTCAGGAGTTBRASRSMAGSYTAGC
CMMWYARTGAA RCCYNTCTCTACTARWAATACAAAAATWAGCTGGGTATRGCRGCAYKTRCCTGTAATMCCASCTA
CTCRGRHRCTGAR RGCAGRAGAMTTGCT BKAACCNRR RAGG CDGAGGTGCA GTGARC YRAGAGAGATSGTGNRGTGC
YATTTCACTCCAGCY TGGGCAACA SAGYBAACTBMATCTCAAMAWMA CW CACA AAACAACAACAARAA RAAAGAA
CCRTTRTATTA RTTRTGAAATRTFGTTCCCTCCYTCCORTYCTGGCAAC CACTTBC TTCTCTCCATCATAAADTAT
CTTAAAC YAWACTAAAMTAATTTTRTT YATYSATAGTKTGAATTTCCCTATCA YTGCTACACAGCTARTK GAGAGRT
ASYCSDAGGAAAATRYAAATGKYACAGTARTGCRYTG YAGATTTTAAKAAACATACYTGRCATCCO WAA YTGKTTT MAT
TSGCTYCRTTTTAAAAACTA YATRTTTTAAAAATCAAGVASACAMTAMAA RTWCAAGATAYRCTRGVITMTRCAAGGKTT
AAGTCRACCAGGRRTTGAATDTAACTTKYAAACAGAGCTGGATTATCYAGYAGGCMGATTAAGYMTGTRYTWAAAGGC
AT SAGCAAA RTCTGAGCAATCCA TKTTYTAAAAHGTAGTACATGTTTYTBATAAGCTTARRAAGTRGTAGTCACAGGA
AMAAKKRGAAC TTYRCCCTCTGCSCTTRTTAYACTCTTTAGTGCTGTTTAASTTTTSTTYGYAAGTGAGRKTGRKG
RAGGGTGCCATAATCTTTTCAKRGA KTAAGTTHTYCTTGGCTTTTCKTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTYTYCTTTGAGAC
CAMSTTTTCGCTCTTG YCTCCYAGGCTR SAGYGCARTGGCKYKATMTCCGGCYSACTGHANCSTSYGCCTCTCCTGGGT
TCAAGCGRTTCTYCTAYAKCAGCCTCBGAGTASCYKGGATTACAGGCDYRMCMAACCAARCCYCGMTAATTTGTAYK
TTTTAGTAGAGRCAGGR TTB YGMCATDTTGKTCASGCTTGTGYCGAACTYSYGGCCTCAGDTKATCCG MCTSTYTBVK
CCTCCCAGAA TGCTGGRATTATAGACRTGASCCAC YGCATCORGMCTTTMYTTTTYATRTAATAGTKATAATBTWTY
AAAGCWTTWTTTTTTTTTTTTTTKTTGAKTHGKARTYTYATCTKTC HCCAGGYTRGWRRGTGGTGCCY GATCTSGKYT
TACTGCRRCCKYTGCCYYCCGRRFTCAAGY GATT SWCYGCOYYAGCOYCTGAGTAGMTRGAATTA YACABGTGCGC
CACCATGRCCAGSTAATTYTBTATTTTTAGTAGASAYGSVKTGTCACCA YTTTGGMCAAGCTGGYCTYRAACTCYTG
AYSKCAGRTGATCTSCCCGCTFCGGCTTCCMMRAGTRCTGGGATTRCAGRTGTGAGCCACYGSRCTCTGCOYMCARAGY
AKTTTCTTTCTATRCCTCARAACAAGAYTGCAAGCCAGYCTCAAAGCVGRTWATTCAAGARCTAACAGKTATTAGBT
TAGGATGYRTGRCACTGYCTTAAGGCKTAYAYGTATTAATAMAWHATTYAAACTCWCAACAACCCCTDTTRAAGYRGR
RGRMASTCATATTYCCTTCCSYCTTTATAATTA CGAAAAATKCAAGGRTTTKCRGTAGGARAGAGAAATCTGAGAAG
KVKGAAGGAGACAGGACRKTATTTK AAGCTGGTSTTTGGATCAMTSTKCMACTCTGCTTCTAKAACA YK GAGCACWTT
TTCTGSTCTRGRVMTKATGRYTTTGAGAAKGGAGTYCGTCTTSORATRACTCCYWYCCCATTTTCCYDVTVTSCTRY
RRRYAGAATTVTCCYNTGCSGTAYTAAATAAWYCTRCTTTTCAGRGTSTGYTCTTWTACCASGCAMTGTACACVT
CTRAGAAA HMMTTGCCSAGACAGCYGTTTTACACKBAGGARRSRARRGVRAGRGAARRAGAGAGRGT YMRAYK CW
MCAARAARGAADCTTTGAWCTARGSTTTCTRACKTAGTGAA MCCYGNMTCCTGAAAATCAAGGRRTGARS GKTAVG
RGGACACTTYCTAGYYGYACAGGTGATTTCRATTCTCGS TGGGCTSTCACAAACYRGGAAAGAATARTTTTGCTTTTT
CTWATGATWAAAA RRA DAAGCCATRTCTTYCBTAYGACACCR AACACYHCGATTCA RTWTGG BAGTKWGGAR GSYYG
ATCKD GAGGAAGGAAAORSVCCGRKGRYGGATTTCTTTTAAACRSAGTGAA SVCAKCAAACRYRCCTTTGMTSGCM
GGCSGRGGARS CGCGCTGRKRSARGGASGYGGAGRRYKGTGTBGGGGG CAGRKDG V GAGGAGCCCRGTCTCTCTTY
CTTRCCAAMGCW GKTCTCTGCMGAGGGCTGCTYCYGCTGTGCOYCSGSRKAGWYCCAAMYTSGGGCGACTTCTWGV
GWGCCACWKTYVY TAAGTGCTSGGAGTTAATAGSACYTCY TCCGAGCACWCGCTCA YNGBGTBS CCTTR CCTGAAAG

ATACCGCRSTMCCCTCCAGAGGATTTGAGGGAYRGGDTCCGAGGSGGCYTTTCMGCAGCASCRCGAGGRASAAAAGAGRA
RGGGCTRGCGRKACAYAGAGGRKGGRCGGRCCGCGTGMSTYTCVRCRDRCTGMSGRGAGSVVRVVGAGCRGGCAGMGGG
CGGYNRGAGCAGCAHGSARH RGSRRRCGRNGAGCRGCANGGAGCYTTHRGCRACTRDCTGGSNVNDCCCGGGGCC
GVDRTSNDGTSARSKVVKCCGRCHRCTGCGYGGAGCCGRNCDEGCTRCYCMACKCACMRARTRGTTACGGTYVGMGGH
SRABVHNKGTGRKYARASCRWCTGCRGBRDGAKCMGSGRDRTRGSCVYVRCHEMGGWGRACSAAGTTYGYRGGGARH
TKGAATCARCTRCGCTTYVATYCKCYGMAAMVCGRGASSCYTCSTSGGRAVTTTTMRRRAVGGRTTYSWTWATCACW
RACYWCYTCHHGMGACRCCCTGSRRTYTSRGAAGCCRAGGARRRSGAWTGARGAGYCAYSNCKGDRCRGATMTCTY
NAAWGCTGAGADDWYSTSAAGRGSRRRRCRTATTTGTATYRSATGFAAGKAKGYTCWTYATCRKATAYAAARTTKRCG
AACDTTTGGRAYARAAAVRGAKTCTTAAAGARRTGTAARATRTROYGGGACTRCTTAGCCBSYAATTCAAGAYACCY
GGAWGGAGYTTATCTTTCTTACYAGGAGGGATTMTAGCTGGAATMTGTGSTGTATGTTGGAAYAAATAATMGAATAYA
AATTYYGATMGAAATTATTYAGAAGCGGCYGGMGVKGCSCTMCGCYTTGTAATCCCTTCAAYTYTSGGARATCAAG
GCVKGRKRDATACCCYGAGKTYRGGAGTTCGAGAYCAGCCTGGCCAACAGRTGAAACSTCRCTCTACTAAAAATACA
AAAASTAGCSGGGDRTGGTGGCAGGCVMCTRTAATYCCAICTRCTCRGRMKSITGAGGCAGGAGAATYGYKTGRAYYY
GGRAGGCTGAKGTTSTAGTGRACAGMGAGATGGAGCCACTTCACTCCAGCCTGRGTGAYAGAGTGAGACTTTGYSDDA
AGAAAGRAAGAGAGAAAGAGASAGARARAAAWTRTTCAGAAAMDTRCRATTGTGTTTTTTTTTTAACYGARTAGGK
CAAATAAAYRWAYGTTYGCTRTRGAACKTARGAAATAATKARMRCATYCATGTGAYCRITCCASAGKTAATATKTA
GTTACCATTYTGGGAATACTRTCTAAAYATTKTTSTSKTTTTACTAYCTTTAGCTTACYKATRYARTTATTTGTGAT
RAGAGTTTTYSWRITCSTCRTTTTGAACAGASRTGYTTCTCYCTBCTAYTSMGTGTTTTYGTGAGGBAGWYRGGGRAG
GAKTTAAAAGTAATTAATACATGGGTAACTTARCMCTCTAAAATTTKCCMACAGCTTGAAVCCRGGWTTTTSGSTT
TGTAKTCCYACARTRCTTARAAGAKASSTTATTTGTTTTAAAAAAAAGGAARADGAAAAGTGGATSTTYTSACA
RTTTTTAATRGAGAHRRGGAGAAKACATGTAKRAAMRRGGAAAWKAWGKTGGCTTAGARTSCTAASTACATTGGTGTT
TAATRTAGGAMCAVTTATTTATATAACATTTTAAASTAMTAAATTCDTATTAGTVTATTWTCAAATGGATATATTAYC
AAAKGRGTKTAAGCRCTSTACACMTTTAATTCAITYGATTORTTTTCTTTTTGYTYTRGMITYSRRCATSAWTTAA
ATATTTACATRWRRGTAYTTTTTAGAWTYTTCWTACTATGAAATWTAAGAAAAMCCYTAAAGRCTRGTYYTATGACC
RAGAYRARGGAMTTCAWTGAATWCAMAAARACAATAATACTGCRRYATTTTKTCTTTCTTYGTAKCTGCAADKTT
GGTTKGCKTAYAYTTTCTYTYTSTSTCYTTSAAAAHYGAGTBAGTTTCASTTYTCAGRACASKATTTAAAYAYCATA
ATATAATTTRVTRTAATTCMTYGATTTAGGCAAATTATGCHRTTTWRHTYAGTATKAAATGTACYTAMAAAATARGTA
AYTCCTCTYTAACAYCRCCATYMTCAASTRATAYAAARTRACARKTATCCTAAAATAAATTYCTWCTYCCACCR
WGCAGCRCTCAAATTYTAAKTTSTRTGACTROMGAYAGTATTTAAAAATCCTYTCTGSAAATGBCTTTGTTCSSA
AGATGRITTAGRARSCAAAGABTGAMCRCTCTTGTTAATGAACTCTCAWATCAYMAAYCTSGKAAAGTYTTTWS
TWCTACTGCTRYTGTTRCARATTATCACAWAYGTRTTASCYRAACAAACACAAAATTATWATTTTACAGTTCTAGA
KATSAGAAGTCAAAAWYGGGTCCMAAKDTTTTATTCCYTTTSGAAACTCTAAGRDGCARTCTRTTCCCTTCTCTTT
CCAGSTTCTASTGACCATCAAATTCCTTGRCTCAYGRCTSTKTATTTTCTCYGTRGMSGTGCTTSCATTYTTKAT
CYTCTMTCTGACTGTGAMYSTCYAAWAAAAACACYTGGKRTYATKTTGGGCCYACCCTGARAAATCTKGATAATCTCS
YYCRAGACCRITAAWTAATCAAYATCTGCAWAGCCTSTTTTGCCACMTAAGTTRATGTAAYTAAAAGTTTTGAKGATT
ASRACRTAGRCATYKGGRTRGGGGGCATTAYTSAGCCTACCACARRAAGGAATTTAGGKTTAATYAACTAGCCT
TCTTATTKTATACTTGAARAAAAYGAAGTTYTRRAATGGARARCATTRTGCTAAATGAAATAAGCCARACACAGAAA
GASAAATAWCACAKGTTSTYACTTAWCTGTGAAATAYRAAAYAAATTAAYATTSWTRGCAGTRDAKWGYASAAAYRGTKGY
WACTRGAGCTGRGRRCTRSAGGAWTGSAGGAGATGGTAATCAASATATRAAGSSTMARITTAARATGGGAGGAATAAGT
TYKRYTGYTTTTTTTTSAKAYVTGYTTCATAGCATRATGMATAYARCTAAATAATAAATCCAMATKCKCTCMTYTGAC
AARAWTGYYCAAATATTTGAGATRRWGGATMSGTTDCTKAGCTTGAMTTAATAATTHCSYAWTGTRTYCAAAKATCMTA
ACKTCAAYATYDKACYACATMAATRITRTAYARCWRTACYATCSAATAATATMTTTTTAAAATAATAKAAATGAAAAAGA
AATTGAMGTTCAACATTYCCRGAAGCTAAGTGTRACTTAAAAGTTTTGTGADAAKYGTTKYWACAAACRAWSAMGTT
BTCTCTTTTTAAAVTTRCYACATTCTGYCTTKGATATAMAGMAGKRAHCAAAMAAAAAAWAMAAAWTCYSKAGCC
TRACWAAATTCAGGAAGAAATTCAGTAGTTGTAWCTCMRGRGRAATACAGSRMRRTAGSHYKDRTAWRAGWMAKT
CWSYCCYTKCCSSTTTGCTRTTTGCCYRGCCTCAYAGKGCCTCTGYCTGTGASRACARCTCMGCMRAMGTTCRGA
GSATATAAYGGAATTCATWTKTAYTGARSAAATKRATRGARAACTSAAGAAGRAAYTGGAACKGGARRCAAATKTA
GVGKTTWTTAGACACCTGGGGCTYSYTGTVGKKTMTGCTWEGMGYKRRSGRYTCRMAACAAGCTTCYTTTSCDTYW
YVYCDGCHCMYACSYTREMITYGACYMYTSTGYTCTSTBTBKCACTCATGATGATRSDCAGCGCCCGAGDGGCRDAS
CTVCTGCTBCTCCACVRCGGGAGCCCAVCWCGCCNACYYNRCCACTCYCAHCBVACCNTVCACDMYDCTGCHCGR
BAGRVTYKYYTGGACASGCTRTGGTYCTGYAYBNNGCCGRKRHGVGCTGDAHKTGCGCATBMSKRRGGYVDCTG
HHCGTGKAHYTVGCTRAGCDBECVDCCATCRCGAWSWCBYACGGTACCTGYRYGYBRCTNCGRRRRVCACCRAGGR
ARTRACCRKRSMBNCAYARATCYHNYRGAAKRYCYCTYAGGTRADGACWSRYRAKCKSAKAAATTTGTACHCTGASAGY
TTCSRAAGCTSARARYRTRMATTYWCYAGCACMGRARGTTCAKCYGGGAGACCMTSWCVKGTCTYRSYTCAGCTCA
YGMRC CARTYGD TGGGAYGRYCTRAGTYTBYCTRCTCGCSYTGCECYGAYAGRGCCKCAAATGGGAAATAATCCBGA
HGGACTTGCGCAKGTGAAKCCMATTTGTRCVTTATAYTTCCRAAGCAYRMCACVACCCAAACRCC TACCCTCYK

TAGTTSAAGGBCYAGASTGMRAGCAA YGWAGACYCAAGRRKCTAKAGBKCTAGTRCCC YCKMT YCCTCCAA RCTAVG
KCSAGTTGCR TCCACTTACMRGGTSTR TTTTCMYCATTTRYATAMCAAGCYGGCTGGACCARCYTCAGGATTTCYAWAY
MCADTTGTGYGTGGCAYCATCTGGARATCTCTBGR TCTCGGCYSTYYR CACARCTCAACWAATBTGACCCCTCBTCAG
CTAWTCYGAYCCTCCGTTTAWGCDGTW GARTTTTT CCRGAGCKCCY CASKBKRTYCTGRGGWCANCAR GACCAAGAC
TTCGCTGAC SCTGGCMTCTGTFCRCCSGMGTTG DCTCCTTTSCTSTTAAACTTGTGCAAGAGTTCGCTGAGCRRTG
AAGYAGAR RTTATGGYCYTYCTTGCCCTTGC BTTTMCYTTYKR TGATCTCARAGCATMCTCCCTYCR CCCCATWCCA
TGGCCSYADTTCCSTRCTCYCACR GCTGTCT RCTGAACTGBCRACATTACTCAWT KKT TTTCTGRRGGGAGGAACWYT
TTTTTTKKA AACRAAATRGATATATGAAACRGTACAMGGGAA YTRAYASGAATATTTAARRTAAAA VR TGACCTTRAA
GAYTAYGAAATMMATCTTATTTTSGCCMAGAAYGKGGCAYTGRGCT SCTYGGGCCAYAGGGGAGCTGGGGAGGRYAG
GGTGAAGAGTTRGCTCTAAGCYCYGCTTGAGVTRCTGTAAAHA YAGAACRCARAAT SAYCKTCGAAGTKAAAGAC
GCGAAGTTCTTCTTACYCVRYSCCTMCTCMYSTYHCBSVBGCCAA YTCYTCYAGTWA SAKCYWGYATCYRSGTCYY
KGGARCTGAAGAAGGAGACTTYGGCTY CAGTTACAGCYASCATCCDRGTCCY GATTTARAAK GAGCTGCCAATTACAG
CGCGGTTCCAGGKCTGAGCAMAANGCCTGAGRARCMAGTGGRRARAGGGASTAAA ACTACWSMA YWGRSYACARGSR
AAWGAATAA ACTGAACRAYKCTTAACYARRCCTAA YRTATTTAATSS AAAACACAMAARTCTTTTCA TTTCTTYCCY CCT
CCCTKYBTTCTCTTRCTMCCYARY ACCCCCTCTTCAAGCACATTAATTA YATSGTTAGATTY TACTGCGTSTRTCAGY
CCYR TTS TAGGYGGTGGGCACGCM AAGGTGAATGAGACCRDACAAGARTYTTGCCCTCAKGGGSTTTACRTYTG SAGA
CAGAGTCKATCTRK TGC CCAR CCTGRARKGCAGTGGCGCSATCACAGB TCACTGCAGSYTYAAACTCCCTG SCTMARR
GRGTTCTCCYACCTGAGCCTCCSGACYAGYTGGGAYYACAGT KMAMGYMCGACGCC KGGTTRKRTTGTGTTGTTTA
ATA SASABGAAGKTCTCACCATGTT RYHTSSSCTCAR GCGATCATSCCC SCTCYYYCTCSTAAAGTRY TGGGAYTRCA
GTYYCARRCYAYCTTKCCCKASTGRGR AACAGACRTTAAGGAAGATAACAATSTATTTT CAGAGAGGAR TTTATAA
ARCBAAATGCAATGVGTAAATRTGAR GTGTGAWTAVSAGGAGAMGYTAMARAGTGGTYRRAKARTCTMATGSAAGCTRM
KGGAGAA RGAARCTCAAGTGCAAATRCTSCCTMMGRAAYADACKTAAAA AGASAYTTT SADGTS CARAWRCTSCCTCA
RGWATAARAYAACTCKGARACTCTCAARTGTAAARTCTGCGCTYBCKAGAACC GAABGGCKARS TGGAGYCCATACGCM
WCGMGATTASARAGCAAGGCMGAMGMCAVAGYACRKGAR TAAAT SAGYAWHC DTTTT RTTTCAGAAATCTCRRRAAM
SRTYTGTRGTT YRYAGAAGSMSSYMRMR TASSGGAAGCKRCSGKATTCYVCCGMGGARNKY CAGAGM CYGAGGMGCC
SYTTRKTTRY YBCARGCTKSCTGRCTCACTMYGCAYYAKGTGCAAAAGATGCCYGGGRAYRSRGR AAGRGAAGGCCA
CRTCYTCASGCCTTCGYR CCTGKCAHTGTGAGCA ACCACTGAGACTCA TTAYRTAA YASTC DTTTCTCTCYTRCAA CC
CTGYGKCCR CGCGGTCCYRCTT WCTCTGCCSTCHRCBVGGTGGACYKGRAGSR YTTGAGCGGTMSGCCRCYTGAGG
CAGCCRGGMGGGCAGTGGRCWV GCTGCB SGACCRGGRAGGTGTSGAGAGYKGTBGRGCGRGTACAYGHAYGTVAAG
SCATTGCRAGA ACTTTAYSCAKAARYATTTCAVTG CYGGTMGRRACR GCAAGAGAGGAGRGYGRGH TGTKCCAYAYMY
YTTTGACCKBAGGTTTCTWACSCCTSTTTTTYTDTCYGSYCTCTSCAGWYAWMSSYDAYTKAAARRANCD DAGASGCYC
TKAGAAW CCTCGRRAAACTTASMHMHKMAV TBA CYGAARRY CCTACRGGNMCACAMMTGCC CCCC GCCACAA YCCACCC
CGCTTTBG YAGTTTTCA YKTARAAAAYAGAGSTTTTAMAAATGTCTGCCTTTTAAHGTAGAYAYRTGMCTTCYCCCA
YTACYRYAAATGWYCATTTATATCATTTTTTATATATMTTAAHAAAMATKTAAAWMAGRAAAACAMCGYKTCTGCCTT
TTCACTGTGYTGGAGTTTTCTGGAS YGAGCACTCAYKYCCTAAGCRYACWTT SRWRTSGGYAYTTCTTGS GAGCCTCG
MAGMCTCCDGAAGCTGT SKACTTCATGACAAGCRTTTTTGKGAAS YAGGGAAGCTMAGRGGBGKYWCTGGCTTYTCTKV
AGK CACRCTKCTAGCAAATGCCAGAAM CRAAGCTCAAATAAAAM TAAAATAATTTTCWTTTCATTYAMTCA TTTATTST
YRACATY TATT RAGCACCTATT ASAACAA TTTYWTKCAKGS AAGACAGYATCGTT TCTGAYACTGYTRTTTCMTKYA
TCTCTTAGAAAAAYSGTGCTATTMGACATCTAMCASKATTYATCTTGAGGTGAYAAAARTMAAAARCYGTGTCTCAA
KATCGATGAMATGCR GTTAAAAATGATKAA YAGAAACTCYAGGGGGAYCTCATATCRATAGACTCGAGAMTSGCACATC
YGGAGATCYGTATKYATCMGGYTBCCCTKCCRSATCAYGCVAGGTTTGG RATATTTTCTC VYCARGM YCVR CYMG
GTAAYTRAAATCCADCCAWMBY YGGYCHR TMGTCTCRSAATCMGACTYNGYTCYAGTCYCYR CCTYGGMDTTCTKHGM
MYCCAGRCRKRDR YYYAGADGGCTDTGRGRTTGBRAATRACTGCTGVSAA RCYGGAAGGMAYTMTSMRGTMTCTG
CCACAGWSRRATTGTTGCADGYMYVMGGCTCAGAS TTTCASTGMCKTTGGARAYKCTMCTGYCCACGYGCTCAKCC
BSTGCTGGWYACYS MYCTCTATTTTTTTTTTTWAGGKYRYAYRYC