



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Sekvenování genů u pacientů s karcinomem v rodinné  
anamnéze

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ ZDRAVOTNÍ  
LABORANT**

**Autor:** Iveta Marková

**Vedoucí práce:** Ing. Tomáš Nix, Ph. D.

České Budějovice 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Sekvenování genů u pacientů s karcinomem v rodinné anamnéze* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské 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 bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 19.5.2020 .....

*podpis*

## **Poděkování**

Mé poděkování patří Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady, čas i trpělivost, kterou mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat všem dobrovolníkům, kteří mi poskytli vzorky pro zpracování. Děkuji také celé své rodině, za jejich podporu a pevné nervy, bez které bych se neobešla.

# Sekvenování genů u pacientů s karcinomem v rodinné anamnéze

## Abstrakt

Nádorové onemocnění je druhá nejčastější příčina smrti v České republice, z čehož 5-10 % zaujímají hereditární nádorové syndromy. Jsou způsobeny vrozenou – hereditární mutací v jedné z alel genů, kdy po druhém náhodném zásahu do druhé alely se rozvine hereditární karcinom. Důležité je rozlišení hereditárních a sporadických karcinomů z důvodu vysokého rizika dědičnosti mutovaných alel v rodině. Upozornit na to může například propuknutí nemoci v mladém věku nebo opakovaný výskyt nádoru v rodině (Kleibl & Novotný, 2003; Vorlíček, et al., 2006).

Ve své práci jsem se zaměřila na analýzu a hodnocení dat získaných metodou Sangerova sekvenování. Cílem bylo nalezení mutací v níže zmíněných genech a zhodnocení jejich patogenity pomocí srovnání s databázemi.

V teoretické části bakalářské práce se zabývám nádorovým onemocněním obecně, jakožto i dědičným nádorovým onemocněním. Blíže specifikuji hereditární syndrom nádoru prsu a ovarií, včetně možných genů způsobujících tento syndrom – *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *PALB2*, dále se zabývám Lynchovým syndromem a systémem genů MMR. V neposlední řadě popisuji familiární adenomatózní polypózu asociovanou s genem *APC*.

V praktické části jsem se zaměřila na vyšetření vybraných oblastí 18 anonymizovaných vzorků v genu *PALB2* – exon 13 a v genu *BRCA2* – exon 10/4 a exon 11/12. Pomocí PCR metody jsem vzorky připravila na Sangerovo sekvenování, které poté probíhalo ve firmě GenSeq s.r.o.

V poslední části mé práce se zabývám analýzou a samotným zhodnocením výsledků pomocí programu BioEdit a databáze NCBI. U 5 vzorků jsem našla mutaci – ve 4 případech se jednalo o delecii jednoho nukleotidu s konfliktní interpretací patogenity, poslední mutace byla patogenní – způsobuje hereditární syndrom nádoru prsu a ovarií, jednalo se o duplikaci nukleotidu.

**Klíčová slova**

*BRCA1; BRCA2; TP53; PTEN; ATM; PALB2; MMR systém; APC; hereditární syndrom nádoru prsu a ovarií; Lynchův syndrom; familiární adenomatózní polypóza; PCR; Sangerovo sekvenování; NCBI*

## **Gene sequencing in patients with cancer anamnesis**

### **Abstract**

Cancer is the second most common cause of death in the Czech Republic, of which 5-10% are occupied by hereditary cancer syndromes. They are caused by a congenital - hereditary mutation in one of the alleles of the genes, when after the second random intervention in the other allele hereditary cancer develops. It is important to distinguish between hereditary and sporadic carcinomas due to the high risk of inheritance of mutated alleles in the family. The indication may be, for example, the onset of the disease at a young age or the recurrence of the cancer in the family

In my work I focused on the analysis and evaluation of data obtained by Sanger sequencing. The aim was to find mutations in the genes mentioned below and to evaluate their pathogenicity by comparison with databases.

In the theoretical part of the bachelor thesis I deal with cancer in general and hereditary cancer. I specify the hereditary breast and ovarian cancer syndrome, including genes, that may cause this syndrome – BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, ATM, PALB2, I also deal with Lynch syndrome and the MMR gene system. Last but not least, I describe a familial adenomatous polyposis associated with the APC gene.

In the research part I focused on the examination of selected areas of 18 anonymized samples in the gene PALB2 – exon 13 and in the gene BRCA2 – exon 10/4 and exon 11/12. Using the PCR method, I prepared the samples for Sanger sequencing, which then took place in GenSeq s.r.o.

In the last part of my work I deal with the analysis and evaluation of the results using the BioEdit program and the NCBI database. I found a mutation in 5 samples – in 4 it was a deletion of one nucleotide with a conflicting interpretation of pathogenicity, the last mutation was pathogenic – causes hereditary breast and ovarian cancer syndrome, it was a nucleotide duplication.

**Key words**

*BRCA1; BRCA2; TP53; PTEN; ATM; PALB2;* MMR system; *APC*; hereditary breast and ovarian cancer syndrome; Lynch syndrome; familial adenomatous polyposis; PCR; Sanger sequencing; NCBI

## Obsah

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Úvod .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2</b> | <b>Nádorové onemocnění .....</b>                                | <b>11</b> |
| 2.1      | Dědičné nádorové onemocnění .....                               | 11        |
| 2.2      | Vznik hereditárních nádorových syndromů .....                   | 12        |
| <b>3</b> | <b>Hereditární syndrom nádoru prsu a ovarií.....</b>            | <b>13</b> |
| 3.1      | <i>BRCA1, BRCA2</i> .....                                       | 14        |
| 3.1.1    | Testování mutace genů <i>BRCA</i> .....                         | 15        |
| 3.2      | <i>TP53</i> .....   | 17        |
| 3.3      | <i>PTEN</i> .....   | 18        |
| 3.4      | <i>ATM</i> .....  | 19        |
| 3.5      | <i>PALB2</i> .....  | 19        |
| <b>4</b> | <b>Nepolypózní kolorektální karcinom – Lynchův syndrom.....</b> | <b>21</b> |
| 4.1      | MMR systém.....   | 21        |
| 4.2      | Testování mutace MMR genů.....                                  | 24        |
| <b>5</b> | <b>Familiární adenomatózní polypóza .....</b>                   | <b>26</b> |
| 5.1      | Formy FAP .....   | 26        |
| 5.2      | <i>APC</i> .....  | 26        |
| <b>6</b> | <b>Rodinná anamnéza .....</b>                                   | <b>28</b> |
| <b>7</b> | <b>Cíle práce .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>8</b> | <b>Metodika .....</b>   | <b>31</b> |
| 8.1      | Izolace DNA.....  | 31        |
| 8.2      | Měření koncentrace .....  | 32        |
| 8.3      | PCR .....   | 33        |
| 8.4      | Elektroforéza na gelu .....                                     | 35        |



|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 8.5       | Enzymatické přečištění PCR produktů ..... | 37        |
| 8.6       | Příprava na sekvenování .....             | 38        |
| 8.7       | Sekvenování .....                         | 40        |
| <b>9</b>  | <b>Výsledky.....</b>                      | <b>41</b> |
| 9.1       | Koncentrace DNA.....                      | 41        |
| 9.2       | Elektroforéza .....                       | 42        |
| 9.3       | Sekvenování .....                         | 43        |
| 9.3.1     | <i>PALB2</i> – exon 13 .....              | 44        |
| 9.3.2     | <i>BRCA2</i> – exon 10/4.....             | 45        |
| 9.3.3     | <i>BRCA2</i> – exon 11/12.....            | 46        |
| <b>10</b> | <b>Diskuse .....</b>                      | <b>49</b> |
| <b>11</b> | <b>Závěr .....</b>                        | <b>53</b> |
| <b>12</b> | <b>Seznam literatury.....</b>             | <b>54</b> |
| <b>13</b> | <b>Seznam obrázků a tabulek .....</b>     | <b>64</b> |
| <b>14</b> | <b>Seznam příloh.....</b>                 | <b>66</b> |
| <b>15</b> | <b>Seznam zkratk .....</b>                | <b>76</b> |

# 1 Úvod

Nádorové onemocnění představuje závažný společenský i medicínský problém, podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (2016) počet nových případů s nádorovým onemocněním s každým rokem stoupá, ročně zemře na rakovinu téměř 20 000 lidí. Hereditární nádorové syndromy sice představují okolo 5-10 % všech nádorových onemocnění, nicméně je důležité včasný záchyt pacienta trpící tímto vrozeným syndromem, jelikož se nejedná pouze o něj, ale i o jeho příbuzné, kteří mohou mít vyšší riziko vzniku rakoviny (Kleibl & Novotný, 2003).

Rakovina je nemocí genomu, pokaždé je postižena sekvence DNA, avšak přináší s sebou různé příznaky a následky. V těle vznikají mutace několikrát za den, které ale mohou být opraveny nebo nemusejí být významné z hlediska kliniky. Změny v sekvenci DNA se ale postupným procesem mohou kumulovat a predisponovat k rozvoji nádorového onemocnění. Do vzniku rakoviny jsou zapojeny tři skupiny genů – tumor-supresorové geny (zpomalující buněčné dělení), protoonkogeny (řídící buněčné dělení), dále mutátorové geny (opravující chyby vzniklé v DNA). Mutace v jedné alele z těchto genů může být podmíněna geneticky, druhá mutace většinou vzniká tzv. druhým zásahem. V případě zděděné mutace v těchto genech jsou postiženy všechny buňky těla, což zvyšuje riziko vzniku rakoviny. Pozitivní pacienti jsou sledováni a v případném vzniku onemocnění je včas zahájena léčba (Kleibl & Novotný, 2003; Vorlíček, et al., 2006).

V teoretické části své práce se zabývám problematikou hereditárních nádorových systémů jakožto hereditárním syndromem nádoru prsu a ovarií, nepolypózním kolorektálním karcinomem – Lynchův syndrom a familiární adenomatózní polypózou. S každým hereditárním syndromem se pojí geny, jejichž mutace má největší zapříčinění vzniku těchto syndromů. Zabývám se geny *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *PALB2*, *ATM*, MMR systémem a genem *APC*.

Cílem této práce je seznámení se s problematikou v odborné literatuře a vypracování teoretické části na dané téma. V praktické části je mým cílem osvojení si molekulárně biologické metody, a to PCR a sekvenování, zahrnující postupy a obsluhu strojů. Z výsledků těchto metod se naučit pracovat s databázemi a hodnotit získaná data.

## 2 Nádorové onemocnění

Nádorové onemocnění můžeme definovat jako chorobu, která je způsobená neomezeným růstem nádorových buněk tkání, které ztratily nebo mají poškozený mechanismus kontrolující růst buněk. Nádorové onemocnění můžeme rozdělit na maligní a benigní nádory. Maligní nádorové onemocnění je charakterizováno ztrátou kontaktní inhibice (schopnost pronikat do okolních tkání), šířením se exponenciální rychlostí a tvorbou metastáz (vzdálená ložiska). Růst benigních nádorů je pomalejší, jejich růst je ohraničený a nemají schopnost metastázovat (Vorlíček, et al., 2006; Altaner, 2008).

Každé nádorové onemocnění je způsobeno změnou genetické informace na buněčné úrovni. Tato změna může být vyvolána mnoha faktory – zevní, vnitřní, genetické. Mezi nejčastější zevní faktory podmiňující vznik nádorů patří tabák, výživové faktory a energetická bilance, pohybová aktivita nebo například alkohol. Mezi významné vnitřní faktory řadíme infekce způsobené jak viry (HPV – lidský papilomavirus, virus hepatitidy B), tak i bakteriemi (*Helicobacter pylori*). Prokázanou schopnost vyvolávat maligní onemocnění má ionizující záření, mnohé chemické látky zahrnující například azbest, chlorované uhlovodíky a mnoho dalších. Nádory vzniklé z výše zmíněných příčin můžeme označit jako vzniklé sporadicky. Menší část nádorových syndromů způsobují vrozené mutace vytvářející vysokou predispozici vzniku nádorového onemocnění, tzv. familiární výskyt nádoru. Vzniklé onemocnění lze označit jako hereditární – dědičné (Vorlíček, et al., 2006).

### 2.1 Dědičné nádorové onemocnění

Genetická predispozice může proces vzniku nádorového onemocnění urychlit, nebo se naopak nemusí vůbec projevit. Pro hereditární nádorové syndromy je typický opakovaný výskyt v rodině, nízký věk vzniku onemocnění či vícenásobný nebo opětovný výskyt u postižené osoby. Z hlediska genetické patogeneze jsou tyto syndromy nejčastěji způsobené mutacemi tumor-supresorových genů, protoonkogenů, dále mutacemi mutátorových genů nebo některými geneticky podmíněnými chorobami a komplexními syndromy (Kleibl & Novotný, 2003). Podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR bylo za rok 2016 diagnostikováno více jak 96 tisíc lidí s nádorovým onemocněním, z čehož je 5-10 % nádorů hereditárního původu.

## 2.2 *Vznik hereditárních nádorových syndromů*

Téměř všechny syndromy s nádorovou predispozicí vykazují autozomálně dominantní způsob dědičnosti s vysokou penetrancí a nízkou frekvencí patologických alel v populacích. Geny související se vznikem familiárních nádorových systémů s mendelovskou dědičností můžeme rozdělit na aktivované onkogeny a geny, které ztratily svou tumor-supresorovou funkci (Nussbaum, et al., 2004).

Onkogen vzniká změnou protoonkogenu, které jsou zodpovědné za proliferaci. Jejich mutace tudíž vede ke zvýšené stimulaci proliferace, zvýšenému krevnímu zásobení nádoru nebo inhibici apoptózy (Nussbaum, et al., 2004).

Tumor-supresorové geny jsou na rozdíl od onkogenů zodpovědné za antiproliferační účinek, podporují diferenciaci a apoptózu. V případě zděděné mutace alely tumor-supresorových genů vystupuje tento gen jako recesivní – jedna funkční alela tohoto genu je dostačující pro správnou supresorovou funkci – alela vystupuje jako dominantní (Sršeň & Sršňová, 1995). Rozvinutí nádorové progresse vysvětluje Knudsonova teorie „*dvou zásahů*“. Mechanismus vzniku nádorového syndromu spočívá v inaktivaci obou alel tumor-supresorového genu. V případě hereditárních nádorových syndromů je za první zásah považována zděděná nefunkční alela tumor-supresorového genu. Druhý zásah zahrnuje vyřazení z funkce druhou alelu nezávislou mutací, ztrátou chromozomu nesoucí funkční alelu nondisjunkcí (chyba v rozdělení homologních chromozomů v I. meiotickém dělení) a následnou duplikací chromozomu nesoucí mutovanou alelu nebo somatickou rekombinací (nahrazení funkční alely mutovanou) (Tomášek, 2015).

Mezi nejčastěji vyskytující se hereditární nádorové systémy patří – syndrom nádoru prsu a ovarií, nepolypózní kolorektální karcinom, polypózní syndromy trávicího traktu s vysokým rizikem malignizace, GAPPs syndrom, syndrom difúzního karcinomu žaludku, syndrom Li-Fraumeni, syndrom maligního melanomu, familiární retinoblastom, aj. (Kleibl & Novotný, 2003).

### 3 Hereditární syndrom nádoru prsu a ovarií

Syndrom nádoru prsu a ovarií je autozomálně dominantní syndrom s neúplnou penetrancí. Za nejčastější příčinu vzniku tohoto syndromu stojí mutace genu *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN* – tyto geny označujeme jako geny s vysokou penetrancí, méně časté pak (označené jako geny s nízkou a střední penetrancí) mutace genu *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *NBN* aj. – tabulka 1 (Plevová, et al., 2009a).

Tabulka 1 Geny zvyšující riziko nádorů prsu (RR – relativní riziko)

| GEN          | SYNDROM                                | NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ   |
|--------------|--|---|
| <i>BRCA1</i> | hereditární forma nádorů prsu a ovaria | karcinom prsu RR 10, ovaria, kolorekta, prostaty  |
| <i>BRCA2</i> | hereditární forma nádorů prsu a ovaria | karcinom prsu RR 10, ovaria, kolorekta, prostaty, žlučníku a žlučových cest                 |
| <i>TP53</i>  | Li-Fraumeni syndrom                    | karcinom prsu RR 18 pod 45 let, sarkomy, hematologické malignity, nádory ledvin, tumory CNS |
| <i>PTEN</i>  | Cowdenův syndrom                       | karcinom štítné žlázy, karcinom prsu RR 3-6   |
| <i>ATM</i>   | ataxia telangiectasia                  | hematologické malignity, heterozygoti: karcinom prsu RR 2-5                                 |
| <i>CHEK2</i> |  | karcinom prsu RR 2, štítnice, ovaria, prostaty, CNS, osteosarkomy                           |
| <i>PALB2</i> |  | karcinom prsu RR 2  |

Zdroj: Foretová, 2008

Karcinom prsu je nejběžnější zhoubný nádor u žen. Ze 70-75 % je příčina vzniku onemocnění sporadická, u 5-10 % případů je za příčinu považována dědičná nádorová predispozice, a to především patogenní varianta genů *BRCA1* a *BRCA2*. Ženy s mutací genu *BRCA1* mají o 40-87 % zvýšené celoživotní riziko vzniku malignit než ženy bez mutace těchto genů, u nosiček mutací *BRCA2* je toto riziko 10-35 %. Nosičky mutace genu *BRCA1* onemocní karcinomem prsu do 40 let na 19 %, nosičky mutace genu *BRCA2* na 12 % (Palácová, 2019) (Puchmajerová, et al., 2018). Je-li postižena karcinomem prsu příbuzná prvního stupně, je riziko ženy, že onemocní, zvýšeno třikrát. Pokud jsou postiženy dvě a více příbuzných, riziko je zvýšeno desetkrát (Nussbaum, et al., 2004). V případě propuknutí onemocnění u žen se snižujícím věkem roste riziko vzniku nádoru u pacientky s touto rodinnou anamnézou (Macháčková, et al., 2013).

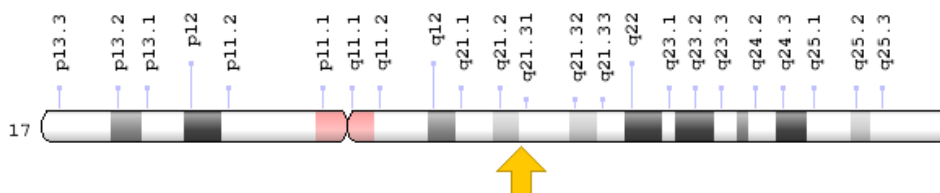
### 3.1 *BRCA1, BRCA2*

V roce 1994 začal být gen, který je umístěn na chromozomu 17 v oblasti 17q21, spojován s nádorem prsu a ovarií. Testováno bylo 23 rozšířených kavkazských rodin zahrnujících 146 jedinců s rakovinou prsu včetně případů časného nástupu, bilaterálního onemocnění a rakoviny vyskytující se u mužů. Právě 40 % vyšetřovaných prokazovalo silnou vazbu na marker na chromozomu 17q21. O rok později byl podobným způsobem identifikován na chromozomu 13 lokace 13q12-13 druhý velký gen způsobující karcinom prsu a ovarií – *BRCA2* (Ellsworth, et al., 2010).

*BRCA1* (lokace na chromozomu 17q21 – obrázek 1) kóduje jaderný fosfoprotein, který pomáhá při udržování genomické stability a zároveň působí jako tumor-supresorový gen. Tento protein se kombinuje s dalšími nádorovými supresory a senzory poškození DNA za vzniku komplexu *BRCA1* asociovaný genomový sledovací komplex neboli *BRCA1*-associated genome surveillance complex (BASC). Vzniklý protein hraje svou roli v transkripci, opravě DNA a rekombinaci (Zhang & Li, 2018).

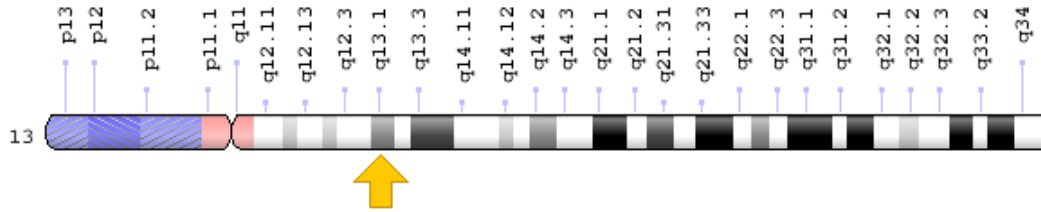
Gen *BRCA2* (chromozom 13, lokace 13q12-13 – obrázek 2) se ve spolupráci s genem *BRCA1* podílí na udržování stálosti genomu (oprava DNA). Protein vznikající z genetického kódu *BRCA2* zprostředkovává vazbu na rekombinázu *RAD51*, která má svou účast při opravě DNA (Goroderska, et al., 2019).

Ztráta funkce genů *BRCA* predisponuje převážně ke vzniku karcinomu prsu a ovarií, ale taktéž gen *BRCA1* zvyšuje riziko vzniku malignit v oblasti prostaty a tlustého střeva a gen *BRCA2* mimo jiné zvyšuje riziko karcinomu prsu u mužů, karcinomu slinivky, žlučodů, žlučníku a prostaty. Ztráta funkcí těchto dvou genů pravděpodobně dovoluje mutace dalších tumor-supresorových genech, které jsou odpovědné za maligní vývoj (Nussbaum, et al., 2004).



Obrázek 1 Lokace genu *BRCA1*

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA1>)



Obrázek 2 Lokace genu *BRCA2*

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA2>)

### 3.1.1 Testování mutace genu *BRCA*

Kompletní testování genu *BRCA* je možné pouze v případě po genetické konzultaci, indikaci genetikem a podepsání informovaného souhlasu. Základní kritéria pro testování hereditárního výskytu nádorů jsou – alespoň 3 příbuzní s nádorem prsu nebo ovarií bez věkového omezení a dále dva příbuzní, kterým bylo diagnostikováno nádorové onemocnění prua nebo ovarií pod 50 let. Testování začíná u nejrizikovější pacientky, tj. první hledání rodinné mutace. V případě prokázání mutace alespoň jednoho z genu *BRCA* je možné doporučit zdravým osobám v riziku tzv. prediktivní testování. Smyslem je odhalit familiární mutace genu *BRCA* (Foretová, 2010). V případě negativního výsledku je žena sledována jako osoba se středním rizikem nádoru prsu dle rodinné anamnézy z důvodu možných společných modifikujících genu. K stanovení rizika možnosti vzniku onemocnění se využívají tzv. Clausovy tabulky, které pracují s počtem příbuzných s karcinomem prsu, jejich věkem a koeficientem příbuznosti s posuzovanou. Ženy s vysokým rizikem mohou podstoupit preventivní operace – profylaktická mastektomie nebo salpingo-ooforektomie. *BRCA*-pozitivní ženy podstupují screeningový program zahrnující magnetickou rezonanci, mamografické vyšetření, gynekologický ultrazvuk, vyšetření biomarkeru CA125 a jiné. Jako součást preventivních opatření je důležité měsíční samovyšetření prsů od 18 věku života (Puchmajerová, et al., 2018). Zvýšené riziko vzniku nádoru mají i pacienti s výskytem již jediného nádoru prsu v rodině. V případě, že matka měla nádor prsu ve 45 letech, její potomci mají zvýšené riziko až dvojnásobně. V tomto případě je potřeba podstupovat ultrazvuk každý rok od 35 let (Foretová, 2010).

Tabulka 2 Doporučené sledování žen s mutací v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*

| OD VĚKU | VYŠETŘENÍ  | INTERVALY MEZI VYŠETŘENÍMI |
|---------|--|----------------------------|
| 18      | Samovyšetření prsů   | 1 měsíc                    |
| 25      | Klinické vyšetření prsů  | 6 měsíců                   |
| 20      | Ultrazvuk prsů   | 6 měsíců                   |
| 30      | Mamografie   | 1x rok                     |
| 20      | Magnetická rezonance prsů  | 1x rok                     |
| 20      | Transvaginální ultrazvukové vyšetření vaječníků a transkutánní vyšetření celého břicha | 1x za 6-12 měsíců          |
| 20      | Nádorové markery CA 125, CEA, CA 15,3  | 1x rok                     |
| 45      | Hemokult test  | 1x rok                     |
| 45      | Kolonoskopie   | 1x za 3 roky               |
| 20      | Kožní vyšetření (nosičky mutace <i>BRCA2</i> )   | 1x rok                     |

Zdroj: Foretová, 2010

Tabulka 3 Doporučené sledování mužů s mutací v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*

| OD VĚKU | VYŠETŘENÍ                                | FREKVENCE |
|---------|--|-----------|
| 35      | Samovyšetření prsů                       | 1x měsíc  |
| 35      | Klinické vyšetření prsou                 | 1x ročně  |
| 45      | Hemokult test                            | 1 x ročně |
| 45      | Nádorové markery CEA, CA 19,9, PSA, vPSA | 1x ročně  |
| 45      | Kolonoskopie                             | 1x 3 roky |
| 45      | Vyšetření per rektum                     | 1x ročně  |
| 45      | Ultrazvuk břicha                         | 1x ročně  |
| 21      | Kožní vyšetření                          | 1x ročně  |

Zdroj: Foretová, 2010

Tabulky 2 a 3 ukazují pouze doporučené sledování pacientů s mutací *BRCA1* nebo *BRCA2* bez ohledu na možné riziko vzniku nádoru prsu nebo ovarií. Je potřeba ke každému pacientovi přistupovat individuálně podle rodinné anamnézy, eventuálně podle zařazení do



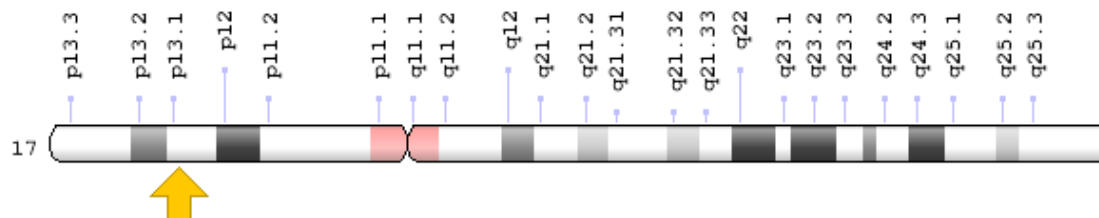
skupin z Clausovy tabulky (ženy s nízkým rizikem do 10 %, se středním rizikem 10-20 % a ženy s vysokým rizikem 20-30 %). Nicméně ženy s neprokázanou mutací genů *BRCA* mohou mít zvýšené riziko vzniku nádoru na základě jiných vysoce rizikových genů (Foretová, 2010).

V důsledku rostoucích zkušeností s testováním a péčí o jedince s tímto syndromem se v roce 2016 upřesnily doporučení pro screening a možnosti snížení rizika vzniku malignit. Půlroční interval sledování žen pomocí zobrazovacích metod se ukázal optimální. Nově se doporučuje „startovní“ magnetická rezonance na začátku sledování k vyloučení mikrokalciifikací. Důležité je sledovat taktéž ženy, které jsou po léčbě časného karcinomu prsu – jsou nosičky mutací genů *BRCA* stejně jako zdravé. U žen po profylaktické bilaterální mastektomii se doporučuje klinické sledování v intervalu jednoho roku i přes výrazné snížení rizika vzniku karcinomu prsu. V případě klinického vyšetření je stále doporučeno sledovat ženy jednou za půl roku od 25 let nebo, jak je nově doporučeno, o 10 let dříve, než byl věk nejmladší nemocné příbuzné. Od věku 25-29 by pacientky měly docházet na magnetickou rezonanci jednou za rok, a to v půl ročním odstupu od ultrazvuku. V případě výskytu velmi časného karcinomu prsu v rodině podstupovat ultrazvuk a magnetickou rezonanci o 10 let dříve, než byl věk nejmladší nemocné příbuzné. Magnetická rezonance a mamografie by se měly střídát po 6 měsících od věku 30-65 let, zároveň by měly probíhat mezi 7. a 17. dnem menstruačního cyklu. Nově je kladen větší důraz na edukaci nosiček mutací *BRCA1/2* o přínosu profylaktické mastektomie a bilaterální adnexektomie. (Petráková, et al., 2016)

### 3.2 *TP53*

Tumor supresorový gen *TP53* je lokalizován na chromozomu 17, lokus 17p13.1 (obrázek 3). Kóduje protein p53, který reguluje buněčný cyklus a apoptózu. Kontroluje přechod z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu, je to transkripční protein. Jeho zárodečná mutace způsobuje autozomálně dominantně dědičný syndrom Li-Fraumeni. Onemocnění je charakterizováno vysokou predispozicí k časným mnohočetným nádorům – nádory prsu, sarkomy měkkých tkání a kostí, karcinomy nadledvin, nádory mozku, leukemie a lymfomy (Foretová, et al., 2012). Celoživotní riziko vzniku rakoviny u postižených je asi 75 % u mužů a téměř 100 % u žen (Teplick, et al., 2011). Pro nosičky mutace genu *TP53* je riziko vzniku

karcinomu prsu ve věku 60 let 49 % (Masciari, et al., 2012). Mutace genu *TP53* se nachází u 20-40 % případů karcinomu prsu (Børresen-Dale , 2003). V 80 % nádorů gen vykazuje účinek ztráty funkce (LOF) (Silwal-Pandit, et al., 2017).

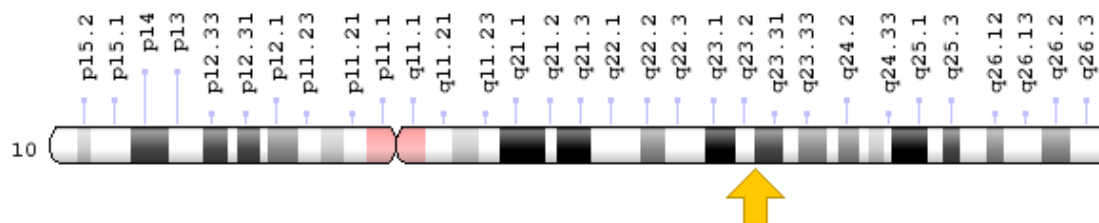


Obrázek 3 Lokace genu *TP53*

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>)

### 3.3 *PTEN*

Gen *PTEN* se nachází na 10 chromozomu na lokusu 10q23.31 (obrázek 4). *PTEN* neboli fosfatáza a homolog tensinu je duální fosfatáza s aktivitami jak proteinu, tak i lipidové fosfatázy. Má tumor-supresorovou funkci s regulací růstu a přežití. Funguje taktéž jako metabolický regulátor – ve formě lipidové fosfatázy snižuje hladinu PIP3 (posel zprostředkující signál růstových faktorů a inzulinu) (Chen, et al., 2018). Záradečná mutace v genu *PTEN* způsobuje Cowdenův syndrom (85 % postižených má mutaci ve svém genu *PTEN*). Cowdenův syndrom vzniká autozomálně dominantním způsobem dědičnosti. Vyznačuje se množstvím hamartomů kůže, sliznice, mozku, prsu, štítné žlázy a gastrointestinálního traktu. Jeho nejdůležitějším klinickým rysem je zvýšené riziko rozvoje rakoviny prsu. Toto riziko je uváděno jako 20-50 % u pacientů s Cowdenovou chorobou ve srovnání s 12 % v obecné populaci žen (Seo, et al., 2014).

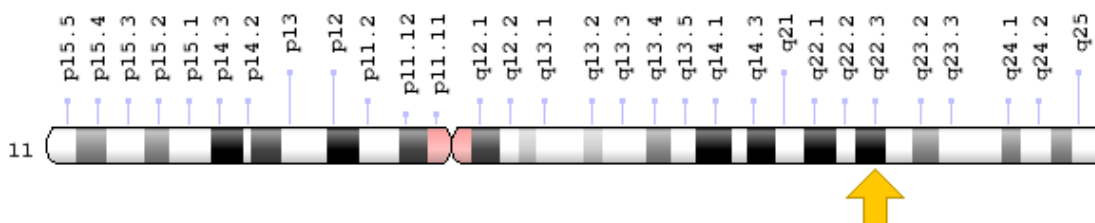


Obrázek 4 Lokace genu *PTEN*

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTEN>)

### 3.4 ATM

Cytogenetická lokace genu *ATM* je na chromozomu 11, v oblasti 11q22.3 (obrázek 5). Produkt genu je protein ATM. Zajišťuje rozpoznání dvouřetězcových zlomů DNA a zprostředkovává jejich opravu, popřípadě aktivuje apoptózu. Reaguje na poškození DNA fosforylací klíčových substrátů zapojených do oprav DNA a kontroly buněčného dělení (Rotman & Shiloh, 1997). Hereditární mutace obou alel genu *ATM* způsobuje vznik autozomálně recesivního onemocnění ataxia telangiectasia (AT). Onemocnění způsobuje mozečkovou ataxii, okulokutánní telangiektázii, defekty imunitního systému, zvýšenou citlivost na účinky ionizujícího záření a velký sklon ke vzniku nádorů. Epidemiologická studie z roku 1991 prokázala zvýšený výskyt karcinomu prsu u heterozygotních jedinců s AT. Pro tyto ženy bylo stanoveno 5x vyšší riziko karcinomu prsu oproti kontrolní populaci (Swift, et al., 1991). V další studii byla nalezena zárodečná mutace vedoucí k předčasnému zkrácení proteinu u 8,5 % holandských pacientek s časným výskytem karcinomu prsu. Riziko vzniku karcinomu prsu bylo stanoveno jako 9x vyšší než u běžné populace (Broeks, et al., 2000). Z mnoha dalších studií vyplývá, že heterozygotní nosiči mutace genu *ATM* mají prokazatelně zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu (Kniffin & Hartz, 2016).



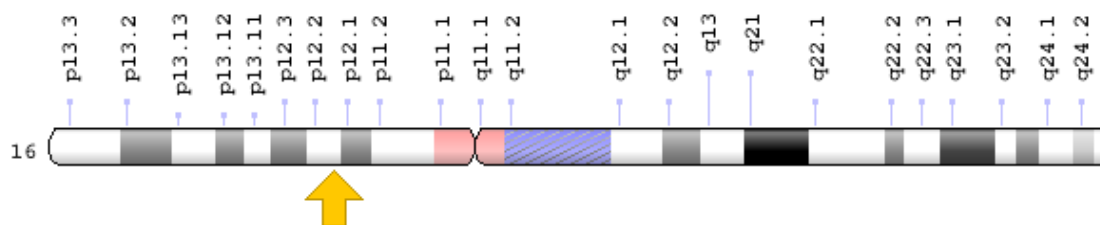
Obrázek 5 Lokace genu *ATM*

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATM>)

### 3.5 PALB2

Gen *PALB2* je umístěn na krátkém raménku 16 chromozomu na pozici 16p12.2 (obrázek 6). Oficiální název tohoto genu je partner and localizer of *BRCA2*. Zprostředkovává fyzické a funkční spojení obou *BRCA* proteinů – je tedy součástí multiproteinového komplexu *BRCA1* – *PALB2* – *BRCA2*, který je nezbytný pro homologní rekombinaci. Z toho vyplývá jeho funkce – oprava dvouřetězcových zlomů DNA. Jak je zřejmé z jeho názvu, podporuje lokalizaci a stabilitu *BRCA2*, umožňuje také jeho rekombinační opravy a kontrolní funkce.

Spolupracuje i s genem *RAD51* – stimuluje jeho aktivitu a navádí gen do míst zlomů DNA (Xia, et al., 2006; Tischkowitz, et al., 2007; Janatová, et al., 2016). Homozygotní vrozená mutace genu *PALB2* způsobuje vzácné onemocnění zvané Fanconiho anémie. Zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu a pankreatu je spojené s vrozenou heterozygotní mutací (Janatová, et al., 2016). Rahman, et al. (2007) prokázali riziko rakoviny prsu při mutaci v genu *PALB2* až 2,3krát vyšší. Stanovili tento gen jako gen náchylnosti k rakovině prsu a demonstrovali vztah opravné dráhy anémie Fanconi-DNA a predispozice k rakovině prsu. Příslušně mutovaná forma genu *PALB2* může taktéž přispívat k rozvoji rakoviny prostaty (Erkko, et al., 2007). Studie testující 175 rodin vyčíslilo riziko vzniku karcinomu prsu u nositelek bez přítomnosti karcinomu prsu v rodině na 33 %, u nositelek mutace se dvěma či více karcinomy v rodinné anamnéze až na 58 % (Janatová, et al., 2016).



Obrázek 6 Lokace genu *PALB2*,

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PALB2>)

## 4 Nepolypózní kolorektální karcinom – Lynchův syndrom

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) nazvaný Lynchův syndrom (LS) podle amerického profesora Henry T. Lynche se dědí autozomálně dominantním způsobem s vysokou penetrancí (Lynch, et al., 2009; Vogelsang, 2013). Za nejčastější příčinu vzniku stojí zárodečné mutace v genech mismatch repair (MMR) – *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. Pacienti s touto diagnózou mají zvýšené celoživotní riziko vzniku různých druhů rakoviny, zejména rakoviny tlustého střeva a konečníku, dále rakoviny endometria, vaječníků, žaludku, tenkého střeva a urotelu (Kim & Byeon, 2019).

LS je považován za nejčastější vrožený syndrom predisponující ke vzniku karcinomu tlustého střeva v brzkém věku. Průměrný věk diagnózy kolorektálního karcinomu v případě LS je 44 let. Při sporadickém výskytu 64 let. Zaujímá 2-5 % všech případů nádorů tlustého střeva (Házová, et al., 2010; Mishra & Hall, 2012). Jedinci s Lynchovým syndromem mají zvýšené celoživotní riziko vzniku karcinomu konečníku na 22-77 %, rakoviny endometria na 15-71 %, rakoviny vaječníků na 4-20 %, rakoviny žaludku na 0,2-13 %, rakoviny tenkého střeva na 0,4-12 % a rakoviny urotelu na 0,2-25 % (Kim & Byeon, 2019).

### 4.1 MMR systém

Za Lynchův syndrom jsou zodpovědné především mutace 4 hlavních genů – *MLH1* (Mult homolog 1), *MSH2* (Muts homolog 2), *MSH6* (Muts homolog 6), a *PMS2* (gen postmeotické segregace) patřící do systému MMR. Z tabulky 4 je patrné, že geny *MLH1* a *MSH2* způsobují typický syndrom HNPCC, kdežto zbývající dva geny vedou k lehčí formě syndromu s pozdějším nástupem (Vyzula & Žaloudík, 2007).

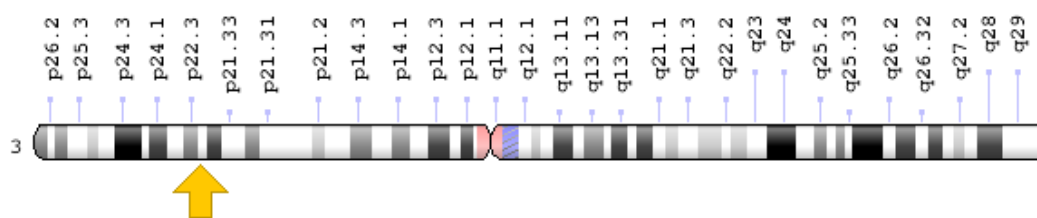
Tabulka 4 Mutace MMR genů

| MMR GEN     | ONEMOCNĚNÍ   |
|-------------|--|
| <i>MLH1</i> | Typický syndrom HNPCC  |
| <i>MSH2</i> | Typický syndrom HNPCC, Muir-Torretův syndrom                                   |
| <i>MSH6</i> | Typický a atypický syndrom HNPCC (pozdější nástup, distální lokalizace, MSI-L) |
| <i>PMS2</i> | Typický a atypický HNPCC, Turcottův syndrom                                    |

Zdroj: Vyzula & Žaloudík, 2007

*MMR* systém (DNA mismatch repair) je jedním z mechanismů, který opravuje chyby vznikající při replikaci DNA v důsledku prokluzu DNA-polymerázy. DNA-polymeráza prokluzuje převážně v místech tandemového opakování (mikrosatelitní sekvence). *MMR* systém opravuje tedy převážně chyby, které vzniknou v těchto místech. Mikrosatelity jsou opakující se krátké sekvence jednoho až čtyř nukleotidů po celém genomu, které jsou náchylné k chybám při replikaci DNA a v důsledku toho dochází ke vzniku delších nebo kratších úseků. Tyto chyby jsou zachyceny *MMR* systémem a následně opraveny. Podmínka zdraví jedinců zahrnuje stejnou délku mikrosatelitů ve všech buňkách. Stav, kdy délka mikrosatelitů není konstantní, se označuje jako nestabilita mikrosatelitů (MSI). MSI není však jednoznačně stavem, který by přímo způsoboval nádory, je to pouze projev ztráty funkce *MMR* systému. Rozlišujeme stavy se stabilními mikrosatelity (microsatellite stable – MSS), s nízkým stupněm nestability (microsatellite instability, low – MSI-L) a s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (microsatellite instability, high – MSI-H) (Dušek, et al., 2016; Král, et al., 2016). *MMR* proteiny se spojují do funkčních heterodimerů MLH1/PMS2 a MSH2/MSH6 – protein hlavní/vedlejší. V případě, že hlavní protein chybí, je vedlejší protein degradován ubiquitinovou cestou. Pokud je tomu naopak, hlavní protein zůstává zachován. Inaktivace obou alel některého z *MMR* genů vede k dysfunkci celého komplexu a ke vzniku tzv. MSI-H tumorů (Hadravský & Baum, 2015).

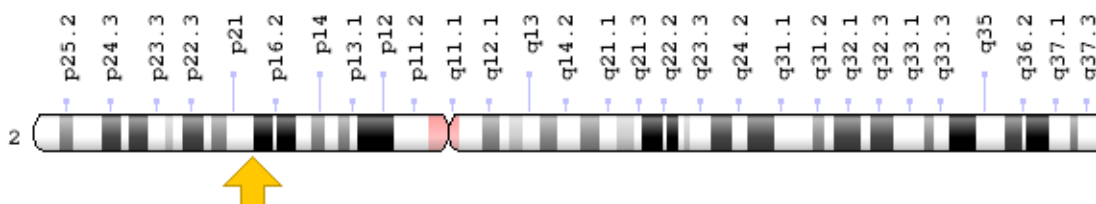
**Gen *MLH1*** má lokaci na chromozomu 3 v oblasti 3p23-21 (obrázek 7). Jeho mutace je nejčastější příčina vzniku hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu, asi polovina všech případů. Identifikováno bylo přes 200 různých patogenních zárodečných mutací v tomto genu (Křepelková, et al., 2006). Gen se páruje a vzniká komplex *MLH1-PMS2*, vytvoří se tak katalyticky funkční a správně lokalizovaný heterodimer nezvaný MutLa. Komplex zajišťuje reparační funkce jdoucí proti směru řetězce DNA (Kosinsky, et al., 2010). Je nezbytný pro interakci s proteiny (např. s DNA-polymerázou), tak i pro *MMR* systém (Vyzula & Žaloudík, 2007).



Obrázek 7 Lokace genu *MLH1*

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MLH1>)

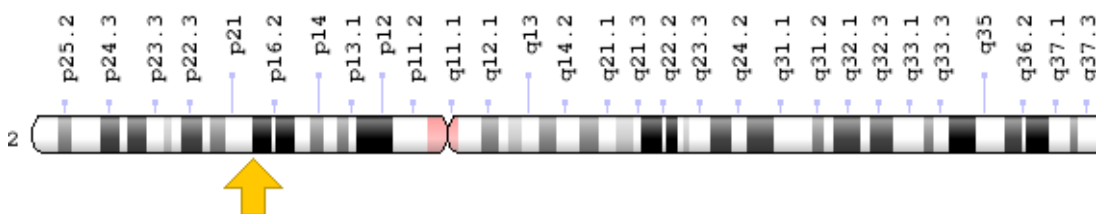
**Gen *MSH2*** se nachází na chromozomu 2, lokace 2p21 (obrázek 8). Mutace tohoto genu je druhá nejčastější příčina vzniku Lynchova syndromu. Zárodečné mutace genu *MLH1* a *MSH2* dohromady tvoří až 80 % diagnóz Lynchova syndromu (Dušek, et al., 2016). Má podobně jako gen *MLH1* více než 250 různých patogenních zárodečných mutací (Křepelková, et al., 2006). Vytváří komplex s *MSH6* – *MSH2/MSH6*. Při úbytku proteinu *MSH2* ubývá i protein *MSH6*, patrně kvůli nestabilitě proteinu. Komplex *MSH2/MSH6* rozlišuje chybně zařazené báze během replikace DNA a inzerční-deleční smyčky a zajišťuje zapojení MMR proteinů *PMS2* a *MLH1* (Lauridsen, et al., 2015).



Obrázek 8 Lokace genu *MSH2*

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH2>)

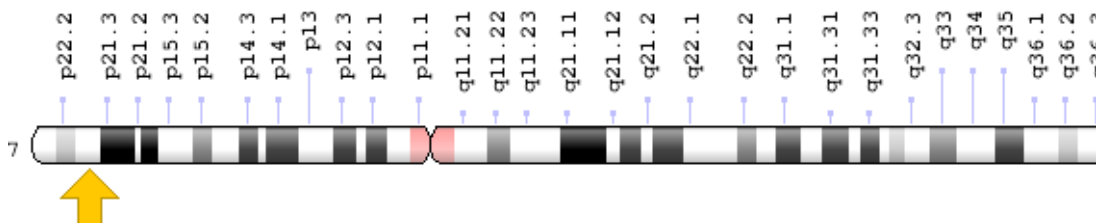
**Gen *MSH6*** nalezneme na chromozomu 2 v oblasti 2p21 (od genu *MSH2* je vzdálen 1Mb) (obrázek 9) (Křepelková, et al., 2006). Byl objeven jako součást heterodimeru *MSH2/MSH6*. V 10 % případů stojí za diagnózou Lynchova syndromu (Dušek, et al., 2016).



Obrázek 9 Lokace genu *MSH6*

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH6>)

**Gen *PMS2*** byl lokalizován v oblasti dlouhého raménka chromozomu 7, lokace 7q11.23 (obrázek 10) (Křepelková, et al., 2006). *PMS2* společně s několika dalšími geny (*PMS1*, *MSH3*, *MLH3*) představují vzácné zárodečné mutace vedoucí k HNPCC (Dušek, et al., 2016).



Obrázek 10 Lokace genu *PMS2*

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PMS2>)

#### 4.2 Testování mutace MMR genů

Základní kritéria pro indikaci vyšetření genů *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, popřípadě *PMS2* jsou podle Amsterdamských kritérií II – v rodině jsou alespoň tři pacienti s karcinomem sdruženým s HNPCC (jeden z nich je příbuzný prvního stupně ostatních dvou), postiženy jsou alespoň dvě generace, jeden z nemocných byl diagnostikován pod 50 let, nádor byl ověřen patologem a dále musí být vyloučena familiární adenomatózní polypóza. Vyšetření může být indikováno i na základě jiných kritérií, například Amsterdamská kritéria I. nebo revidovaná kritéria z Bethesdy pro testování nestability mikrosatelitů nebo imunohistochemické vyšetření exprese proteinů *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, event. *PMS2* v nádorech. Prediktivní testování je prováděno od 18 let s výjimkou rizika homozygotní mutace u dítěte (Plevová, et al., 2009b).

Pacienti s mutací v jednom z *MMR* genů podstupují kolonoskopické vyšetření (od svých 20 let 1x za 1-2 roky, od 40 let 1x za rok) včetně provedení testu na okultní krvácení, gynekologické vyšetření (1x ročně od 18 let věku) včetně transvaginálního ultrazvuku, dále je doporučeno provádět aspirační biopsii endometria včetně cytologického stěru děložní sliznice (1x ročně od 30 let), dále ultrazvuk břicha (1x ročně od 30 let). Provádí se taktéž každoroční vyšetření moče (od 30 let), dále gastroscopie (1x za 3-4 roky od 35 let věku). Doporučuje se každoroční prohlídka lékařem za účelem celkového fyzikálního vyšetření včetně kožní kontroly, orientačního neurologického vyšetření a kontroly štítnice. Mutace v jednom z *MMR* genu zvyšuje i riziko vzniku nádoru prsu, proto je doporučeno ultrazvukové vyšetření prsou (1x ročně od 35 let), mamografie (1x ročně od 45 let věku) a domácí samovyšetření prsou. Pacient by měl být poučen o důležitosti zdravé životosprávy a životního stylu (Šachlová, 2004; Plevová, et al., 2009b).

U pacientů s nepotvrzenou dědičnou formou onemocnění doporučí genetik úpravu preventivní péče dle možného rizika rodinné anamnézy. V České republice je kumulativní riziko kolorektálního karcinomu pro muže do 74 let 7,32 % a pro ženy 3,6 % (Masarykův onkologický ústav, 2019). Tabulka číslo 5 uvádí odhadovaná rizika vzniku kolorektálního karcinomu podle rodinné anamnézy.



Tabulka 5 Odhadovaná rizika dle rodinné anamnézy (CRC – kolorektální karcinom)

| <b>POPULAČNÍ RIZIKO</b>                   | <b>2 %</b> |
|---|------------|
| Příbuzný 1. stupně s dg. CRC pod 45 let   | 10 %       |
| Příbuzný 1. stupně s dg. CRC nad 45 let   | 6 %        |
| Příbuzný 1. a 2. stupně v linii s dg. CRC | 8 %        |
| Oba rodiče s CRC                          | 11 %       |
| Dva příbuzní 1. stupně v linii s CRC      | 17 %       |
| Tři příbuzní 1. stupně v linii s CRC      | 50 %       |

Zdroj: Plevová, et al., 2009b

## 5 Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) se dědí autozomálně dominantním způsobem s vysokou predispozicí ke vzniku kolorektálního karcinomu. Okolo 15 % kolorektálních karcinomů je dědičných, z čehož jen 1 % je způsobeno adenomatózní polypózou (Half, et al., 2009). Příčinou jsou zárodečné mutace v genu *APC* (Galiatsatos & Foulkes, 2006).

### 5.1 *Formy FAP*

FAP se vyskytuje ve dvou formách – klasická a atenuovaná forma. Klasická forma je charakterizována výskytem více než stovek až tisíců adenomatózních polypů v tlustém střevě a konečniku, které se začínají tvořit již okolo 15. roku života. Postupně se z těchto polypů vyvíjejí adenokarcinomy. Ve věku 35 let má polypy již 95 % osob s touto diagnózou. Mezi další projevy klasické formy patří například vrozená hypertrofie pigmentového epitelu retiny (nezhoubné mnohočetné projevy sítnice očí), nadpočetné zuby, výskyt polypů v duodenu, výskyt desmoidních tumorů (benigní nádor ze svalů a šlach), epidermoidních cyst (patologická dutina), osteomů (benigní nádor kostí vedoucí ke změně chrupu), nádorů centrálního nervového systému nebo například výskyt hepatoblastomu (nádory jater) a další (Goss & Groden, 2000; Plevová, et al., 2009c). Klasická forma se objevuje u pacientů se zárodečnou mutací v *APC* genu lokalizovanou mezi kodony 486-499, 1249-1464 a v kodonu 233 (Plevová, et al., 2009c). Atenuovaná forma je charakterizovaná menším počtem polypů (většinou méně než sto) a pozdějším nástupem. Riziko rozvoje karcinomu je však rovněž vysoké. Při atenuované formě pozorujeme mutace v genu *APC* lokalizovanou na extrémním 5' konci (mezi kodony 1-163), na 3' konci (mezi 1860-1987) nebo v exonu 9, který podléhá alternativnímu sestříhu (Plevová, et al., 2009c).

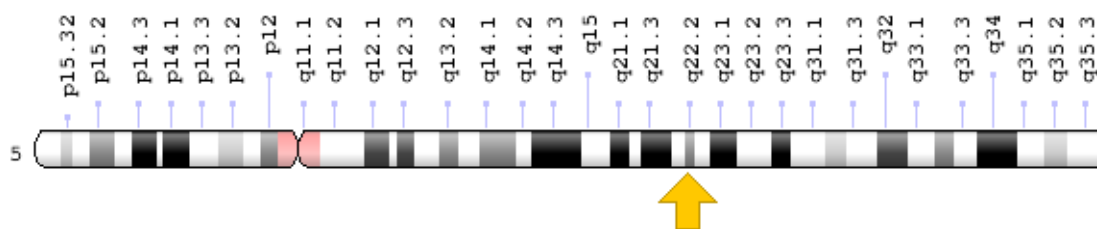
### 5.2 *APC*

Gen je umístěn na dlouhém raménku na chromozomu 5, lokace 5q22.2 (obrázek 11). Oficiální název zní adenomatous polyposis coli. Poskytuje pokyny pro výrobu proteinu APC, který hraje rozhodující roli v několika buněčných procesech. Je to tumor supresorový gen – brání tedy příliš rychlému nebo nekontrolovatelnému růstu buněk. Kontroluje taktéž rychlost buněčného dělení nebo vazbu buněk v tkáních. Protein APC zajišťuje správný počet chromozomů v buňkách po jejich dělení. Podílí se vazbě s beta-kateninem (řídí expresi genů,

podporuje růst a proliferaci buněk, dále jejich diferenciaci). Vazba se uvolňuje v případě, kdy již není potřeba beta-katenin (Goss & Groden, 2000; Fearnhead, et al., 2001; Senda, et al., 2005).

Identifikováno bylo více než 700 mutací v tomto genu vedoucí ke vzniku familiární adenomatózní polypózy. Následek většiny z nich je abnormálně krátký a nefunkční protein, který nepotlačuje buněčný růst, což vede k tvorbě polypů v tlustém střevě, které se mohou stát rakovinnými. Nejběžnější mutací v FAP je delece pěti nukleotidů v genu *APC*, což má za následek změnu sekvence aminokyselin ve výsledném proteinu. Počet polypů a jejich následná změna na rakovinné závisí na umístění mutace (Fodde, 2002).

Mutace v genu může také způsobit vznik desmoidních nádorů (agresivní benigní růst) nejčastěji v břiše. Mutace je získána sporadicky během života a vyskytuje se pouze v nádorových buňkách. Mutace vedoucí ke vzniku desmoidních nádorů způsobuje abnormálně krátký protein APC, který není schopen interagovat s beta-kateninovým proteinem. Přebytek beta-kateninu podporuje nekontrolovatelný růst a dělení buněk, což umožňuje vznik desmoidních nádorů. Jiné změny v genu *APC* mohou způsobit například Turcotův syndrom (predisponující ke vzniku medulloblastomu – mozkový nádor), aj. (Escobar, et al., 2012).



Obrázek 11 Lokace genu *APC*

(zdroj: Genetics Home Reference, dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/APC>)

## 6 Rodinná anamnéza

Rodinná anamnéza slouží k posouzení rizika vzniku určité choroby, je to komplexní pohled na morbiditu a mortalitu v rodině posuzovaného. Odebírá se buď přímo – forma rozhovoru lékaře s pacientem, nebo nepřímo – odběr anamnézy od příbuzných nebo od doprovodu. Zaznamenává se rodinný vztah k nemocnému, typ a věk nástupu onemocnění, věk a příčina úmrtí postižených osob, další dotazy směřují na rodiče a sourozence, ale i širší rodinu. Výsledkem správného odběru je zvážení doporučení genetického testování, informace o dědičnosti nádorů, případně stanovení rizika vzniku nádorového onemocnění pro jednotlivé členy posuzované rodiny, dále pak informace o prevenci a možnosti pravidelného sledování (Foretová, 2010; Halámková, 2013).

Získání kvalitních informací ovlivňuje mnoho faktorů – dostatek času, přiměřená míra empatie a projevení zájmu o pacienta, dostatečná informovanost o konkrétním závěru, vhodné prostředí, aj. Je důležité správné zhodnocení příbuzenského vztahu (např. formou rodokmenu), a to nejčastěji v podobě stupňů příbuznosti:

- příbuzný 0. stupně – 100 % společné genetické informace (dvojčata),
- příbuzný 1. stupně – 50 % společné genetické informace (rodiče, sourozenci, děti),
- příbuzný 2. stupně – 25 % společné genetické informace (prarodiče, tety, strýcové),
- příbuzný 3. stupně – 12,5 % společné genetické informace (bratranec, sestřenice) (Foretová, 2010; Halámková, 2013).

Při odběru dat je důležité se soustředit na informace o:

- vícečetném výskytu zhoubných novotvarů v rodině,
- vícečetném výskytu zhoubných novotvarů u jedince,
- zhoubných novotvarech u mladých jedinců (pod 50 let),
- vzácných zhoubných novotvarech,
- specifických histologických typů nádorů,
- neobvyklých zhoubných novotvarech,
- geneticky vázaných malignitách v rodině,
- dědičných nádorových syndromech v rodině (Foretová, 2010; Halámková, 2013).

V případě posouzení možného rizika dědičné příčiny, lékař napíše doporučení na genetickou konzultaci a pacienta odešle na genetické pracoviště. Lékařský genetik poté posoudí riziko a indikuje genetické testování v případě, že jsou splněna následující kritéria:

- opakovaný výskyt nádorů prsu a/nebo vaječníků v rodině (dva a více případů v linii),
- ženy s ojedinělým výskytem nádoru prsu do 45 let věku,
- ženy s nádorem vaječníků v jakémkoliv věku,
- výskyt nádoru prsu u muže,
- opakovaný výskyt nádorů tlustého střeva nebo dělohy v rodině (dva a více případů v linii),
- nádor tlustého střeva nebo nádor dělohy před 40 rokem věku,
- duplicita nádoru kolorekta a dělohy u pacienta v kterémkoliv věku,
- vícečetný výskyt maligních melanomů v linii, alespoň jednou pod 50 let nebo sporadický výskyt pod 40 let,
- opakovaný výskyt jiných typů nádorů, kombinace různých nádorových onemocnění, obzvláště pokud se vyskytly v mladém věku (Masarykův onkologický ústav & Dvořáčková, 2019)

V příloze 1 je pro ilustraci uveden vzorový anamnestický dotazník ze zdravotnického zařízení Mediray s.r.o, které poskytuje péči v oboru radiodiagnostiky a sonografie, zabývající se především screeningem rakoviny prsu.

## **7 Cíle práce**

Cílem mé bakalářské práce bylo:

1. Seznámení se s odbornou literaturou na téma hereditární karcinomy a vytvoření rešerše.
2. Osvojení si molekulárně biologické metody: izolace DNA, PCR a sekvenování včetně přípravy vzorků.
3. Provedení analýzy sekvencí a hodnocení získaných dat pomocí databází.

## 8 Metodika

Praktická část bakalářské práce probíhala v laboratoři na Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity pod vedením Ing. Tomáše Nixe, Ph.D. Vyšetřovaný soubor se skládal celkem z 18 vzorků, které jsem získala bukalním stěrem. Z každého vzorku jsem nejprve vyizolovala DNA, následně provedla PCR, pomocí elektroforézy zjistila úspěšnost amplifikace, a nakonec připravila a odeslala na sekvenování.

### 8.1 Izolace DNA

Izolace DNA je potřebná před každou molekulárně biologickou metodou, pomocí níž lze získat čistou genomovou DNA z různých typů tkání. Lýze buněk je dosaženo přítomností Proteinasy K a roztoku s vyšší koncentrací chaotropních iontů. Samotná izolace probíhá na koloně se silikagelovou membránou, kde se váže DNA za pomoci ethanolu. Promýváním dvěma různými pufrů jsou nejprve odstraněny nečistoty a následně je pomocí elučního pufru získána čistá genomová DNA (Generi biotech, 2015).

Pro izolaci jsem použila komerční set od firmy Generi biotech.

Reagencie

- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Buffer BL1
- Proteinasa K
- 96 % Ethanol
- Wash Buffer BL2
- Wash Buffer BL3
- Elution Buffer BL4

Spotřební materiál

- 1,5 ml zkumavky
- 2 ml sběrné zkumavky
- Kolonka
- Špičky

## Postup

Nejprve jsem si nechala termostat vyhřát na 70 °C, do kterého jsem vložila Elution Buffer BL4. Následně jsem si označila 1,5 ml zkumavku a vložila do ní tamponek ze stěrového materiálu.

V první fázi dochází k lýze vzorku. Do předem připravené zkumavky jsem napipetovala 200 µl PBS a 25 µl Proteinasy K. Obsah jsem následně zvortexovala a zkumavku nechala inkubovat 15 min v termostatu vyhřátém na 70 °C. Po inkubaci jsem zkumavku krátce stočila a přidala 210 µl ethanolu. Následovalo opět promíchání na vortexu, krátké stočení a odstranění stěrového materiálu. Do popsané 2 ml zkumavky jsem vložila kolonku, napipetovala 600 µl vzorku a nechala centrifugovat na minispinu 1 min při 11 000 x g. Sběrnou zkumavku s filtrátem jsem odstranila a kolonku vložila do nové sběrné zkumavky.

Další fáze zahrnuje promývání. Na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce jsem napipetovala 500 µl Buffer BL2 a nechala centrifugovat 1 min při 11 000 x g. Tekutinu, uvolněnou do sběrné zkumavky, jsem vylila a kolonku vložila nazpět. Následovalo pipetování 600 µl Wash Buffer BL3 a centrifugace 2 min. Kolonku jsem poté vložila do nové označené 1,5 ml zkumavky.

Poslední fáze se nazývá eluce. Na střed kolonky jsem napipetovala 20 µl předem přehřátého Buffer BL4 a nechala inkubovat při pokojové teplotě 1 minutu. Následovala opět centrifugace po dobu 1 minuty. Tento krok jsem zopakovala dvakrát. Po vyjmutí kolonky byl ve sběrné zkumavce připraven izolát DNA pro další použití.

### **8.2 Měření koncentrace**

Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na spektrofotometru Colibri Microvolume od výrobce Titertek Berthold (příloha 2), který je určený pro měření koncentrace DNA, RNA a proteinů v malých objemech.

Do kapiláry na vzorek jsem nejprve nakapala destilovanou vodu z důvodu vyčištění kapiláry. Před samotným měřením jsem na přístroji nastavila nucleid acid, sample type – DNA 50 a pathlength – normal. Jako blank jsme použily 1,5 µl Buffer BL4, jehož koncentrace je nulová a pak jsem měřila koncentrace jednotlivých vzorků po 1,5 µl.

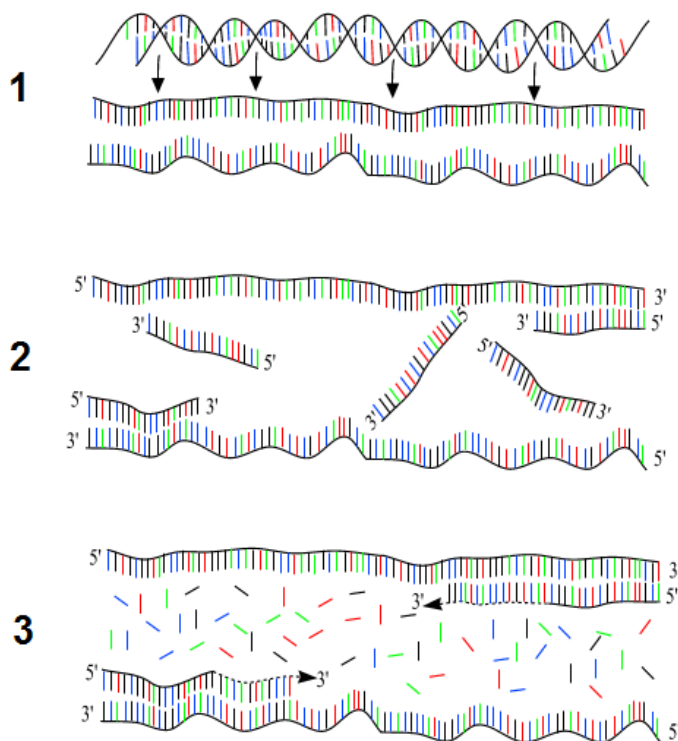


### 8.3 PCR

Metoda probíhající v termocycleru slouží k amplifikaci úseků DNA v případě malého vstupního množství s využitím dvou oligonukleotidových primerů ohraničujících množný úsek. Tyto primery se na základě komplementarity vážou ke 3' koncovým sekvencím množného úseku, každý na jeden DNA řetězec – jsou tedy nezbytné pro zahájení syntézy DNA (viz obrázek 12). Jako další nezbytnou součástí je DNA (Taq) polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus Aquaticus*, která odolává vysokým teplotám. A v neposlední řadě nukleotidy. Samotné PCR neboli polymerázová řetězová reakce se skládá z 30-50 cyklů, kdy každý cyklus zahrnuje tři reakce při různých teplotách:

1. Denaturace – Při 95 °C dochází k denaturaci dvouvláknové DNA.
2. Annealing – Teplota 50-70 °C zapříčiní nasednutí primerů (renaturace).
3. Syntéza – DNA polymeráza začne syntetizovat DNA při 70-75 °C.

V každém následném cyklu se jak templát, tak nově syntetizovaná DNA chovají jako templát. Na konci PCR je ve směsi minimálně  $10^5$  kopií cílové sekvence (Passarge, 2016).



Obrázek 12 PCR - 1. denaturace, 2. Annealing, 3. Syntéza  
(zdroj: Bártová, 2011;  
dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz))

## Reagencie

- DNA
- Mastermix Combi PPP obsahující Taq DNA polymerázu a nukleotidy (firma Top-Bio)
- Primer reverse
- Primer forward
- PCR voda

## Spotřební materiál

- Špičky
- 0,2 ml mikrozkušavky
- Rukavice

## Postup

Všechny potřebné reagencie jsem si vyndala z mrazícího boxu a nechala je rozmraznout. Mezitím jsem si připravila mikrozkušavky o objemu 0,2 ml a označila je. Reagencie jsem zvortexovala a zcentrifugovala. Vždy do jedné mikrozkušavky jsem následně napipetovala příslušné množství DNA podle její koncentrace a k tomu 7,5  $\mu$ l Mastermixu Combi PPP. Přidáním 1,5  $\mu$ l primeru forward o koncentraci 10 pmol/ $\mu$ l, 1,5  $\mu$ l primeru reverse o koncentraci 10 pmol/ $\mu$ l a příslušného množství PCR vody jsem doplnila zkumavky do 15  $\mu$ l (tabulka 6).

*Tabulka 6 Objemy reaglií*

| <b>DNA</b>                                 | <b>MM</b>   | <b>PRIMER R+F</b> | <b>PCR H<sub>2</sub>O (<math>\mu</math>l)</b> | <b>CELKEM (<math>\mu</math>l)</b> |
|--|-------------|-------------------|---|-----------------------------------|
| 5-10 ng/ $\mu$ l $\rightarrow$ 3 $\mu$ l   | 7,5 $\mu$ l | 1,5 + 1,5 $\mu$ l | 1,5 $\mu$ l                                   | 15 $\mu$ l                        |
| 11-80 ng/ $\mu$ l $\rightarrow$ 2 $\mu$ l  | 7,5 $\mu$ l | 1,5 + 1,5 $\mu$ l | 2,5 $\mu$ l                                   | 15 $\mu$ l                        |
| 81-200 ng/ $\mu$ l $\rightarrow$ 1 $\mu$ l | 7,5 $\mu$ l | 1,5 + 1,5 $\mu$ l | 3,5 $\mu$ l                                   | 15 $\mu$ l                        |

Zdroj: vlastní

Zvortexované a stočené zkumavky jsem vložila do termocycleru MJ Mini od výrobce Bio-Rad (příloha 3) a nastavila příslušný program a nechala proběhnout reakci – tabulka číslo 7.

Tabulka 7 Průběh PCR

|    | FÁZE                 | TEPLOTA | ČAS    | POČET CYKLŮ |
|----|----------------------|---------|--------|-------------|
| 1. | Počáteční denaturace | 95 °C   | 10 min | 1           |
| 2. | Denaturace           | 95 °C   | 30 s   | 35          |
| 3. | Annealing            | 60 °C   | 30 s   | 35          |
| 4. | Syntéza              | 72 °C   | 1 min  | 35          |
| 5. | Konečná syntéza      | 72 °C   | 10 min | 1           |
| 6. | Chlazení             | 12 °C   | 10 hod | 1           |

Zdroj: vlastní

Primery byly syntetizovány na zakázku firmou Generi Biotech. V tabulce 8 jsou uvedeny sekvence jednotlivých reverse a forward primerů. Jejich koncentrace byla na začátku 100 pm, pro moje potřeby byla ale potřeba koncentrace zásobních roztoků primerů 10 pm, proto musely být naředěny – smícháním 90  $\mu$ l vody a 10  $\mu$ l zásobního roztoku primeru.

Tabulka 8 Sekvence primerů

| GEN                               | SEKVENCE FORWARD PRIMERU (5' → 3') | SEKVENCE REVERSE PRIMERU (3' → 5')                  |
|-----------------------------------|------------------------------------|---|
| <b>PALB2</b><br><b>EXON 13</b>    | TGGGACTTACTTCTCGGTC<br>AG          | TGGCATGTTATTGTTTCCCATTTCG<br>AATGGGAAACAATAACATGCCA |
| <b>BRCA2</b><br><b>EXON 10/4</b>  | CAATGCAAGTTTTTCAGG<br>TCA          | TCTTAGGCATCATCTGTATACA                              |
| <b>BRCA2</b><br><b>EXON 11/12</b> | GTCCTGCAACTTGTTACA<br>CA           | GCGTTGAGGAACTTGTGA                                  |

Zdroj: vlastní

#### 8.4 Elektroforéza na gelu

Kontrola PCR produktů probíhala pomocí gelové elektroforézy, pomocí které jsem zjistila přítomnost či nepřítomnost amplifikovaného úseku a jeho délky. Je to metoda, která umožňuje separaci a identifikaci elektronegativně nabitých nukleových kyselin (NK) na základě rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném proudu. Elektronegativita NK je dána zbytky kyseliny fosforečné, díky které putují NK ve stejnosměrném proudu ke kladné elektrodě (anodě). Jejich rychlost pohybu je úměrná velikosti a prostorovému uspořádání.

Jako separační média se využívají polyakrylamidové a agarózové gely. Pro vizualizaci se používá barevný indikátor schopný se vmezeřit mezi dva nukleotidy aktivující UV záření a následně dochází k emisi fotonu (Beránek, 2016).

V mém případě jsem používala agarózový gel a jako indikátor ethidiumbromid (mutagen měnící strukturu DNA – při práci v laboratorních podmínkách se proto vyžaduje zvýšená bezpečnost práce, vyhrazení místa pro práci a jeho likvidaci jako nebezpečného odpadu). Samotná elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně od výrobce MajorSciences (příloha 4) a pro vizualizaci byl použit UVIsave HD5 od firmy Uvitec Cambridge (příloha 5).

#### Reagencie

- 10x TBE-puffer
- 1x TBE-puffer
- Agaróza
- Ethidium bromid
- 100bp DNA-ladder
- Destilovaná voda

#### Spotřební materiál

- Špičky
- Rukavice

#### Postup

Nejprve jsem si připravila 1% pufr TBE. Do skleněného válce o objemu 1 l jsem odměřila 100 ml 10x TBE pufru a válec doplnila po rysku 900 ml destilované vody. Poměr ředění je tedy 9:1. Nespotřebovaný 1% pufr jsem uchovala pro příští přípravu gelů.

Následně jsem přešla na přípravu 3 % agarózového gelu. Na předvážkách jsem navážila 3 g agarózy a kvantitativně převedla do Erlenmeyerovy baňky spolu se 100 ml předem připraveného 1 % TBE pufru. Za občasného míchání jsem roztok zahřívala na maximální ohřev v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza plně nerozpustila a nevznikl homogenizovaný roztok bez bublin. Zahřátý gel jsem schladila pod studenou tekoucí vodou. S velkou pečlivostí a v rukavicích jsem do gelu napipetovala 5  $\mu$ l ethidium bromidu (je to vysoce

karcinogenní látka). Vzniklý tekutý roztok jsem nalila do formy a vložila hřebínek pro vytvoření pozic na vzorky.

Po ztuhnutí gelu jsem vyndala hřebínek, gel vložila do elektroforetické vany a zalila 1x TBE pufrem, aby byl gel plně ponořený. Do první jamky jsem napipetovala 5 µl 100 bp Ladder a do dalších jamek po 5 µl vzorku. Vanu jsem zavřela víkem, napojila elektrody a elektroforézu zapnula na 35 min na 110 V.

Po ukončení procesu jsem v rukavicích vyndala gel a vložila ho na UV transiluminátor, přikryla kamerou (detekční systém), která přenášela obraz na LCD displej a pomocí USB disku jsem vyfocený elektroforegram přenesla do počítače. Tento systém je od firmy Uvitec Cambridge a nazývá se UVIsave HD5.

### **8.5 Enzymatické přečištění PCR produktů**

Čištění PCR produktů je nutné před každým sekvenováním jinak může dojít k nečitelnosti sekvenačních grafů. Jedna z nejčastějších příčin je přítomnost různých inhibitorů v templátech sekvenační reakce. Inhibitory mohou být jak z původního biologického materiálu (tkáň, krev, aj.), tak i inhibitory znečišťující DNA při izolaci nebo jiných činnostech (soli, detergenty, alkoholy aj.). PCR produkty lze čistit enzymaticky, vyřezávat z gelu nebo přečistit na kolonkách, aj (Kujanová, 2019).

Přečištění DNA jsem zvolila enzymatické pomocí komerčního setu EXOSAP od firmy New England Biolabs. Set obsahuje dva enzymy:

- EXO I (exonuklease I) - katalyzuje odstranění nukleotidů z lineární jednořetězcové DNA ve směru 3' až 5'
- rSAP (shrimp alkaline phosphatase) – nespecificky katalyzuje defosforylaci 5' a 3' konců DNA

Reagencie

- EXO I
- rSAP
- PCR produkt

## Spotřební materiál

- Špičky
- 1,5 ml zkumavky
- Rukavice

## Postup

PCR produkt jsem nejprve zvortexovala a krátce stočila, poté jsem do 1,5 ml zkumavky napipetovala 5  $\mu$ l tohoto produktu. Následně jsem enzymy vyndala z mrazáku a ponechala je v mrazící destičce. Z enzymu EXO I jsem do zkumavky přidala 0,5  $\mu$ l a enzymu rSAP dvakrát více – 1  $\mu$ l. Celý obsah zkumavky jsem zvortexovala a stočila.

Zkumavku jsem následně vložila do cycleru MJ Mini od firmy BioRad a nastavila příslušný program (tabulka 9).

Tabulka 9 Program na přečištění PCR produktů

|    |                 | TEPLOTA | ČAS           |
|----|-----------------|---------|---------------|
| 1. | Inkubace        | 37 °C   | 15 min        |
| 2  | Aktivace enzymů | 80 °C   | 15 min        |
| 3. | Chlazení        | 4 °C    | 10 hod 40 min |

Zdroj: vlastní

## 8.6 Příprava na sekvenování

Následovala příprava sekvenčních reakcí, zvláště pro primer forward a zvláště pro primer reverse. Vzorky byly poslány na sekvenaci do firmy GenSeq s.r.o. Požadavky pro sekvenaci byly následující – přečištěný PCR produkt o koncentraci 20-80 ng/ $\mu$ l smíchaný s 5  $\mu$ l primeru o koncentraci 10 pmol/ $\mu$ l v 1,5 ml zkumavce doplněné do objemu 10  $\mu$ l.

## Reagencie

- Přečištěný PCR produkt
- PCR voda
- Primer forward
- Primer reverse

## Spotřební materiál

- 1,5 ml zkumavky
- Špičky
- Rukavice

## Postup

Nejprve jsem si připravila 1,5 ml zkumavky a označila je větší částí barcodu, menší část jsem si ponechala pro svou evidenci použitých čísel barcodů. Do takto označených zkumavek jsem napipetovala 1,5 nebo 1  $\mu$ l přečištěného PCR produktu podle bandů z elektroforézy (tabulka 10) a zvláště 5  $\mu$ l primeru forward a 5  $\mu$ l primeru reverse. Podle napipetovaného množství přečištěného PCR produktu jsem přidala PCR vodu a doplnila tak celkový objem zkumavky na 10  $\mu$ l.

Takto připravené zkumavky na sekvenaci jsem vložila do schránky firmy na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity. Zpravidla do dvou dnů byly sekvence přístupné na stránkách firmy ve formátu PDF, FASTA a abl., který slouží k otevření sekvence v počítačovém programu BioEdit.

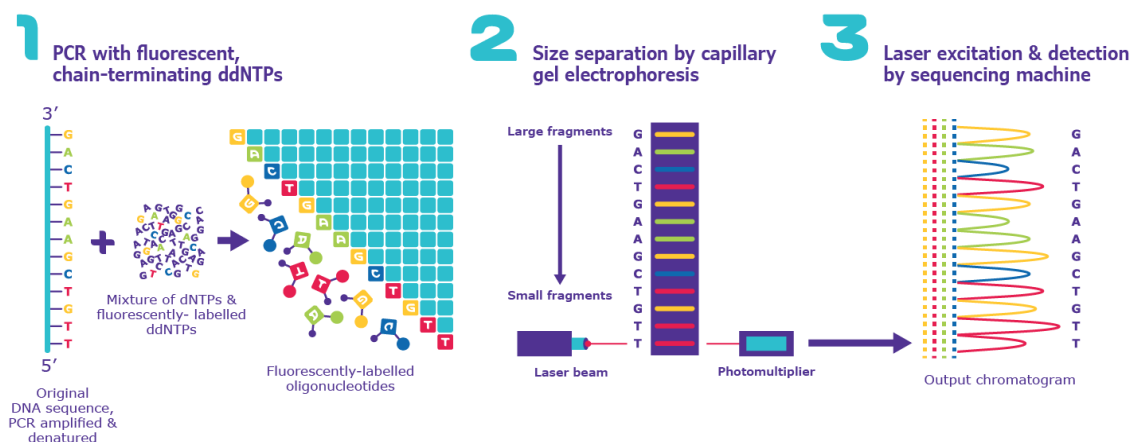
*Tabulka 10 Množství reagentů pro přípravu na sekvenování*

| <b>BAND NA<br/>ELEKTROFORÉZE</b> | <b>MNOŽSTVÍ PCR<br/>PRODUKTU</b> | <b>MNOŽSTVÍ PCR<br/>VODY</b> |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| <b>SILNÝ</b>                     | 1 $\mu$ l                        | 3,5 $\mu$ l                  |
| <b>SLABÝ</b>                     | 1,5 $\mu$ l                      | 4 $\mu$ l                    |

Zdroj: vlastní

## 8.7 Sekvenování

Metoda Sangerova sekvenování (obrázek 13) slouží ke stanovení pořadí jednotlivých nukleotidů v molekule DNA. Princip je založený na PCR reakci, která je na určitém místě ukončena. Na rozdíl od klasické PCR se přidává pouze jeden primer – amplifikace probíhá pouze na jednom řetězci DNA. Ukončení probíhá na základě dideoxyribonukleotidů (ddNTP), které postrádají hydroxylovou skupinu na 3' konci, která je nezbytná pro navázání dalšího nukleotidu v nově vznikajícím řetězci – slouží tedy jako terminátory syntézy. DNA polymeráza začleňuje deoxynukleotidy (v nadbytku) a dideoxyribonukleotidy (v malém množství) náhodně, proto po zařazení ddNTP prodlužování řetězce přestane. Výsledkem jsou miliony až miliardy oligonukleotidových kopií požadované sekvence DNA ukončené v náhodných délkách. Při ručním Sangerově sekvenování probíhá reakce ve 4 zkumavkách – každá obsahuje jeden ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP), vizualizace probíhá na gelové elektroforéze. Při automatickém vše probíhá v jedné reakční zkumavce, přičemž každá ze 4 ddNTP má jedinečnou fluorescenční značku. Pro detekci se využívá kapilární elektroforéza s laserovým detektorem (Bártová, 2011; Merck Group, 2020).



Obrázek 13 Sangerovo sekvenování

(zdroj: Merck Group, 2020;

dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html>)



## 9 Výsledky

Praktická část zahrnovala izolaci DNA, měření její koncentrace, amplifikaci pomocí PCR, zjišťování její úspěšnosti pomocí elektroforézy, enzymatické přečištění PCR produktů, příprava vzorků na sekvenování a seznámení se se samotným sekvenováním.

Vyšetřovaný soubor se skládal dohromady z 18 anonymizovaných vzorků, které jsem si označila čísly. Vyšetřované geny zahrnovaly gen *BRCA2* – exon 10/4, exon 11/12 a gen *PALB2* – exon 13. V březnu jsem podle plánu měla vyšetřit další geny a jejich exony, a to gen *BRCA1* a gen *NBN*, bohužel mi to současná pandemická situace neumožnila.

Cílem práce bylo nalezení a analýza případných mutací v již zmíněných genech. Analýza zahrnovala zhodnocení sekvencí pomocí programu BioEdit (editor pro prohlížení a přizpůsobení biologických sekvencí), následné vyhledání dané sekvence v databázi NCBI (National Centre for Biotechnology Information) a srovnání těchto dvou sekvencí. V případě nalezení mutace zhodnocení typu a patogenity.

### 9.1 Koncentrace DNA

| VZOREK | KONCENTRACE  |
|--------|--------------|
| 1      | 35,50 ng/μl  |
| 2      | 22,28 ng/μl  |
| 3      | 22,44 ng/μl  |
| 4      | 28,66 ng/μl  |
| 5      | 79,34 ng/μl  |
| 6      | 7,33 ng/μl   |
| 7      | 137,68 ng/μl |
| 8      | 64,96 ng/μl  |
| 9      | 147,52 ng/μl |

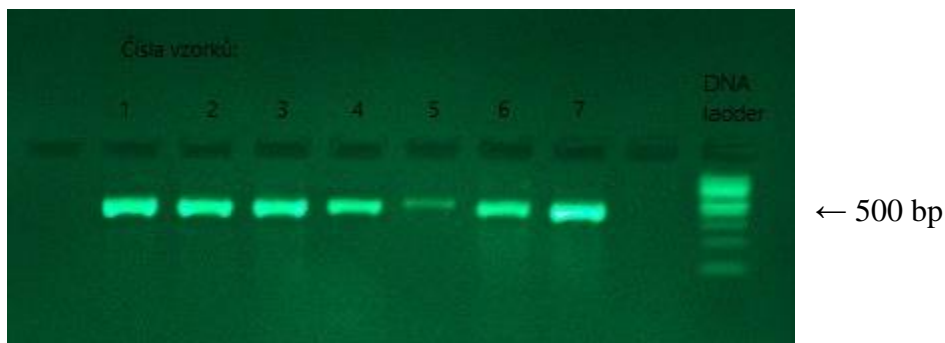
Zdroj: vlastní

| VZOREK | KONCENTRACE  |
|--------|--------------|
| 10     | 182,22 ng/μl |
| 11     | 18,70 ng/μl  |
| 12     | 92,86 ng/μl  |
| 13     | 67,30 ng/μl  |
| 14     | 228,62 ng/μl |
| 15     | 9,30 ng/μl   |
| 16     | 138,26 ng/μl |
| 17     | 121,04 ng/μl |
| 18     | 199,22 ng/μl |

Zdroj: vlastní

## 9.2 Elektroforéza

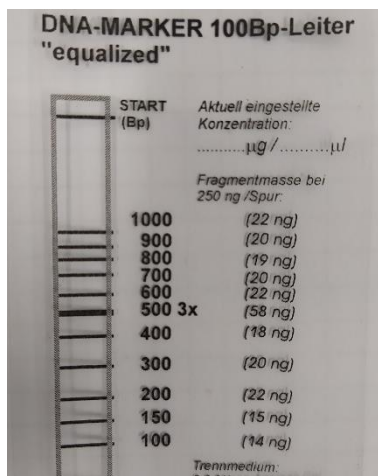
Před samotným sekvenováním bylo potřeba zkontrolovat úspěšnost amplifikace, a to pomocí gelové elektroforézy. Velikost produktů jsem porovnávala s DNA ladderem (obrázek 16) – pohybovala se kolem 500 bp (obrázek 14 a 15), což odpovídá zhruba 58 ng DNA/  $\mu$ l. V závislosti na silném (př. vzorek 1) nebo slabém bandu (př. vzorek 5) na elektroforéze bylo napipetované příslušné množství produktu do zkumavek při přípravě na sekvenování (viz tabulka 10).



Obrázek 14 Elektroforéza na gelu I, (zdroj: vlastní)



Obrázek 15 Elektroforéza na gelu II, (zdroj: vlastní)



Obrázek 16 DNA ladder – 100 bp, (zdroj: vlastní)

### 9.3 Sekvenování

Všechny anonymizované vzorky byly vyšetřeny pomocí metody Sangerova sekvenování v rámci spolupráce s firmou GenSeq s.r.o. a následně vyhodnoceny v programu BioEdit. Vyšetřovaný soubor obsahoval vzorky od 18 pacientů, z čehož u 6 vzorků byl sekvenován gen *PALB2* – exon 13, u dalších 5 vzorků jsem osekvenovala gen *BRCA2* – exon 10/4 a zbylých 7 vzorků bylo vyšetřeno na gen *BRCA2* – exon 11/12.

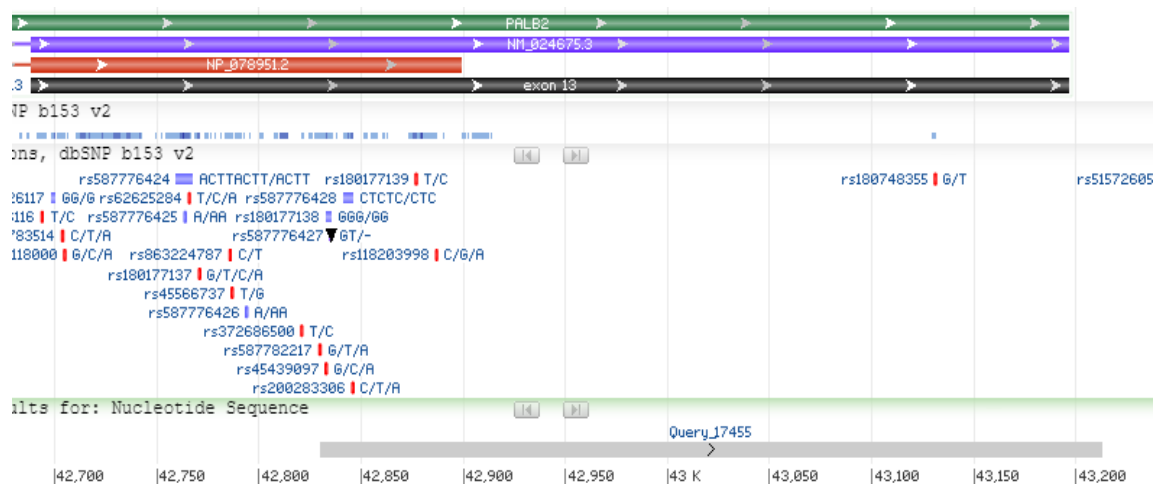
V programu BioEdit jsem si otevřela příslušnou sekvenci (graf v podobě píků a seřazené nukleotidy) a nejprve ji okometricky zhodnotila. V případě nedostatečné velikosti jednotlivých píků bylo možné je zvětšit a pokračovat v hodnocení. Pokud sekvence vypadala v pořádku a bylo možné ji dále identifikovat, překopírovala jsem ji do programu Word a zvýraznila části, které byly kvalitní a bez šumu – odstraněním části sekvence na obou koncích (příloha 6). Vybranou část sekvence jsem vložila do databáze NCBI, kde došlo ke srovnání s referenční sekvencí a vyhledání příslušného genu (obrázek 17). V případě nalezení 100 % shody jsem si ověřila o jaký gen a jeho exon se jedná v grafickém zobrazení a v jakém místě jsem sekvenovala. V tomto případě jsem považovala, že daná sekvence je bez mutací. Nicméně i přes 100 % shodu se v posloupnosti nukleotidů mohla objevit mutace. Jednalo by se o heterozygotní mutaci, kterou program BioEdit nedokáže přečíst (překryv dvou píků). V případě neshody s databází jsem pátrala, v jakém místě se mutace nachází a o jakou mutaci se jedná (delece, duplikace, aj.). Dále jsem zjišťovala její patogenitu – benigní, maligní, nejasný klinický význam a zda její sekvence mění aminokyselinu.

| Score         | Expect | Identities   | Gaps      | Strand     |
|---------------|--------|--|-----------|------------|
| 726 bits(393) | 0.0    | 393/393(100%)  | 0/393(0%) | Plus/Minus |
| Query 1       |        | GCTTTATGTACACCTTTAAAAGCACATGTACAAATGTGGGAAATTACAAAAATCAACCTA |           | 60         |
| Sbjct 43161   |        | GCTTTATGTACACCTTTAAAAGCACATGTACAAATGTGGGAAATTACAAAAATCAACCTA |           | 43102      |
| Query 61      |        | AAACCCTTTTTCTCAAAGTATACATAAATGTACATCCAAGATCAGTGGTGCTACCATCAT |           | 120        |
| Sbjct 43101   |        | AAACCCTTTTTCTCAAAGTATACATAAATGTACATCCAAGATCAGTGGTGCTACCATCAT |           | 43042      |
| Query 121     |        | TAGAATAAAAAATAAGTCTGTCTGGACATAAACAAGCAATCATTTTAAGTGCATTTCAGA |           | 180        |
| Sbjct 43041   |        | TAGAATAAAAAATAAGTCTGTCTGGACATAAACAAGCAATCATTTTAAGTGCATTTCAGA |           | 42982      |

Obrázek 17 Příklad shody vyšetřovaného vzorku s databází NCBI  
(zdroj: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\\_167860127](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_167860127))

### 9.3.1 *PALB2* – exon 13

Na genu *PALB2* se nachází 13 exonů, poslední z exonů obsahuje 508 nukleotidů. Lokace tohoto exonu je v místě 42 689 – 43 174 (Genetics Home Reference, 2020). Primer forward byl nasynthetizován s lokací 42 756 – 42 776, tím pádem nedošlo k úplnému osekvenování celého exonu. Pro přečtení celého exonu by byl potřebný ještě další pár primerů. Hodnocené sekvence byly dlouhé zhruba 400 bp. Na obrázku číslo 18 můžeme vidět část genu *PALB2* zvýrazněný zelenou barvou, černá barva značí exon 13. Dole na obrázku je šedou barvou zvýrazněna osekvenovaná část daného exonu. Tím pádem nebyl osekvenovaný počátek exonu 13. Červené značky s popisky označují popsané mutace.



Obrázek 18 Gen *PALB2* exon 13 – NCBI  
(zdroj: <https://lurl.cz/DzBuG>)

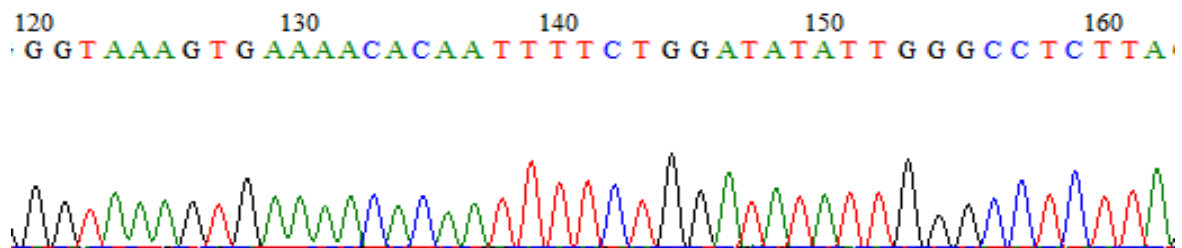
Všechny vzorky osekvenované na gen *PALB2* – exon 13 byly porovnané s referenční sekvencí NG\_007406.1. Zhodnotila jsem je jako bezmutační. (tabulka 11) (obrázek 19).

Tabulka 11 Shoda vzorků s genem *PALB2*, exon 13

| VZOREK | VLÁKNO  | SHODA S NCBI | LOKACE          |
|--------|---------|--------------|-----------------|
| 1      | Forward | 100 %        | 42 831 – 43 212 |
|        | Reverse | 100 %        | 42 767 – 43 174 |
| 2      | Forward | 100 %        | 42 832 – 43 212 |
|        | Reverse | 100 %        | 42 767 – 43 156 |
| 3      | Forward | 100 %        | 42 842 – 43 212 |
|        | Reverse | 100 %        | 42 767 – 43 167 |

|   |         |       |                 |
|---|---------|-------|-----------------|
| 4 | Forward | 100 % | 42 867 – 43 223 |
|   | Reverse | 100 % | 42 757 – 43 161 |
| 5 | Forward | 100 % | 42 828 – 43 207 |
|   | Reverse | 100 % | 42 769 – 43 161 |
| 6 | Forward | 100 % | 42 875 – 43 220 |
|   | Reverse | 100 % | 42 758 – 43 161 |

Zdroj: vlastní



Obrázek 19 Část sekvence genu PALB2 – exon 13 v programu BioEdit (zdroj: vlastní)

### 9.3.2 BRCA2 – exon 10/4

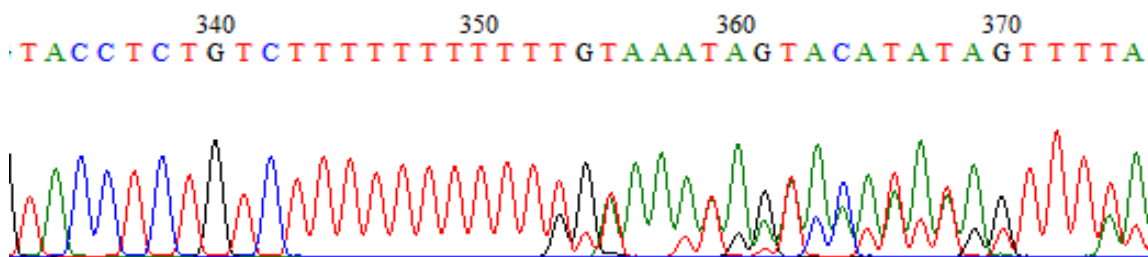
Gen *BRCA2* obsahuje 27 exonů. 10 exon obsahuje 1 116 nukleotidů, jeho lokace je v místě 21 793 – 22 908 (Genetics Home Reference, 2015). Sekvenování proběhlo u poslední třetiny exonu s částí intronu. Hodnocené sekvence byly dlouhé zhruba 400 bp.

Vzorky byly srovnané s referenční sekvencí NG\_012772.3. U všech vzorků (č. 7, č. 8, č. 9 a č. 10) byla nalezena stejná mutace NM\_000059.3(BRCA2):c.1909+22del – jedná se o delecii jednoho nukleotidu v místech tandemového opakování (lokus 22 920 – 22 931), tím pádem došlo k posunu a k překryvu píků (obrázek 20 a 21). Mutace je klasifikována 6x jako benigní, 1x jako pravděpodobně benigní a 1x s nejistým významem (konfliktní interpretace patogenity). Nachází se v intronové části genu, která se nepřekládá do proteinu – není tedy pravděpodobně významná. Tabulka 12 ukazuje shodu sekvence s databází NCBI. Některé sekvence s mutací měly shodu s databází menší než 97 %, bylo to způsobeno překryvem dvou píků a nesprávným vyhodnocením nukleotidu.

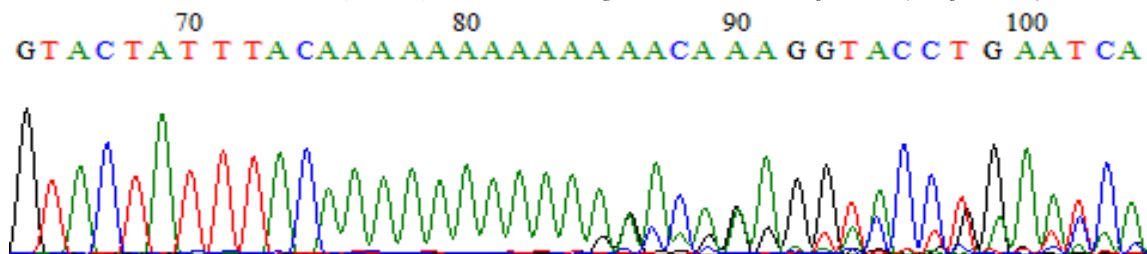
Tabulka 12 Shoda exonu 10/4 na genu BRCA2 s databází NCBI

| VZOREK | VLÁKNO  | SHODA S NCBI | LOKACE          |
|--------|---------|--------------|-----------------|
| 7      | Forward | 99,7 %       | 22 624 – 23 019 |
|        | Reverse | 95,98 %      | 22 564 – 22 961 |
| 8      | Forward | 99,7 %       | 22 624 – 23 034 |
|        | Reverse | 99 %         | 22 561 – 22 961 |
| 9      | Forward | 99,7 %       | 22 624 – 23 017 |
|        | Reverse | 95,6 %       | 22 574 – 22 962 |
| 10     | Forward | 99,5 %       | 22 363 – 23 015 |
|        | Reverse | 97 %         | 22 565 – 22 962 |

Zdroj: vlastní



Obrázek 20 Mutace NM\_000059.3(BRCA2):c.1909+22del v genu BRCA2 – vlákno forward (zdroj: vlastní)

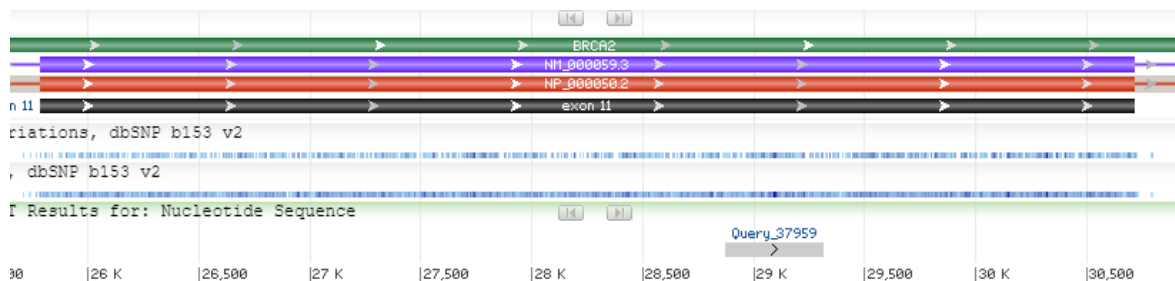


Obrázek 21 Mutace NM\_000059.3(BRCA2):c.1909+22del v genu BRCA2 – vlákno reverse (zdroj: vlastní)

### 9.3.3 BRCA2 – exon 11/12

Exon 11 je nejdelší z exonů genu *BRCA2*. Obsahuje 4 932 nukleotidů. Nachází se v lokaci 25 786 – 30 717 (Genetics Home Reference, 2015). Sekvenování zahrnovalo zhruba desetinu exonu v místech 28 800 – 29 300 (obrázek 22). Hodnocené sekvence byly dlouhé zhruba 400 nukleotidů.

Na obrázku číslo 22 můžeme vidět část genu *BRCA2* zvýrazněný zelenou barvou, černá barva značí exon 11. Dole na obrázku je šedou barvou zvýrazněna osekvenovaná část daného exonu s popiskem Query\_37959.



Obrázek 22 Gen *BRCA2* exon 11 – NCBI  
(zdroj: <https://iurl.cz/XzBuR>)

Všechny sekvence vzorků testovaných na gen *BRCA2* – exon 11 jsem porovnávala s databází NCBI s referenční sekvencí *BRCA2* – NG\_012772.3. 100 % shodu jsem pozorovala u každého vzorku, až na vzorek s číslem 17 (tabulka 13). Považuji tedy, že neobsahují žádnou mutaci.

U vzorku číslo 17 jsem hodnotila pouze vlákno reverse, jelikož sekvence z druhého vlákna byla nečitelná. Nalezla jsem mutaci NM\_000059.3(*BRCA2*):c.5362dup (p.Ser1788fs) – jedná se o duplikaci jednoho nukleotidu v místech tandemového opakování (obrázek 23). Mutace je klasifikována jako patogenní – způsobuje hereditární syndrom nádoru prsu a ovarií. Varianta má za následek předčasný terminační kodon, který zapříčiňuje zkrácení finálního proteinu.

| Score         | Expect   | Identities            | Gaps      | Strand     |
|---------------|--|-----------------------|-----------|------------|
| 795 bits(430) | 0.0  | 433/434(99%)          | 1/434(0%) | Plus/Minus |
| Query 1       | GCATTTGCATCTTTTACATTGGATATTACTTTGGAAAAA                      | CTAGTGtttttttGATCTTC  | 60        |            |
| Sbjct 29272   | GCATTTGCATCTTTTACATTGGATATTACTTTGGAAAAA                      | CTAGTGTTTTTTTGGATCTTC | 29214     |            |
| Query 61      | AACATTCTTCAATACTGGCTCAATACCAGAATCAAGTTTATTTTTTGAGAGATATCCTGA | 120                   |           |            |
| Sbjct 29213   | AACATTCTTCAATACTGGCTCAATACCAGAATCAAGTTTATTTTTTGAGAGATATCCTGA | 29154                 |           |            |
| Query 121     | ATCATTATATACCTCATCAGAATGGTAGGAATAGCTGTTAGACATGCTACTGTTACTTAA | 180                   |           |            |
| Sbjct 29153   | ATCATTATATACCTCATCAGAATGGTAGGAATAGCTGTTAGACATGCTACTGTTACTTAA | 29094                 |           |            |

Obrázek 23 Duplikace nukleotidu a shoda sekvence s NCBI  
(zdroj: <https://iurl.cz/ezBuk>)

Tabulka 13 Shoda exonu 11 genu BRCA2 s NCBI

| <b>VZOREK</b> | <b>VLÁKNO</b> | <b>SHODA S NCBI</b> | <b>LOKACE</b>   |
|---------------|---------------|---------------------|-----------------|
| <b>12</b>     | Forward       | 100 %               | 28 913 – 29 304 |
|               | Reverse       | 100 %               | 28 839 – 29 254 |
| <b>13</b>     | Forward       | 100 %               | 29 062 – 29 319 |
|               | Reverse       | 100 %               | 28 842 – 29 272 |
| <b>14</b>     | Forward       | 100 %               | 28 876 – 29 308 |
|               | Reverse       | 100 %               | 28 842 – 29 233 |
| <b>15</b>     | Forward       | 100 %               | 28 881 – 29 309 |
|               | Reverse       | 100 %               | 28 839 – 29 245 |
| <b>16</b>     | Forward       | 100 %               | 28 882 – 29 309 |
|               | Reverse       | 100 %               | 28 839 – 29 245 |
| <b>17</b>     | Reverse       | 99,8 %              | 28 840 – 29 272 |
| <b>18</b>     | Forward       | 100 %               | 28 883 – 29 318 |
|               | Reverse       | 100 %               | 28 837 – 29 233 |

Zdroj: vlastní



## 10 Diskuse

V porovnání Sangerova sekvenování a NGS (sekvenování nové generace) jsem došla k těmto názorům. Sangerovo sekvenování je zaměřené pouze na konkrétní oblast genu, využití je především v diagnostice chorob a včasnému zjištění náchylnosti jedince k nemocem asociovanými s určitými geny. Výhodou je určitě cenová dostupnost oproti NGS, nicméně i přes inovace je tato metoda časově náročná a pracná. Mezi další nevýhody patří nezachycení přítomnosti změn velkého rozsahu. Pomocí technologie NGS dokážeme přechíst v případě potřeby i celý genom, což je určitě výhoda v onkologii, kdy je často nezbytné vyšetření většího množství genů a jejich variant. Mezi další výhody sekvenování nové generace patří redukce času do poskytnutí výsledků. Mezi nevýhody patří náročnost interpretace velkého množství dat, s čímž se pojí časová i finanční náročnost. Každopádně podle studie Park at al. (2015), která porovnává Sangerovo sekvenování a NGS v oblasti screeningu mutací *BRCA1* a *BRCA2*, je kvalita výsledků u obou metod naprosto shodná. V mém případě jsem prováděla vyšetření vybraných úseků genů *PALB2* a *BRCA2* pomocí Sangerovy metody z finančních důvodů a z nedostupnosti metody NGS.

Při praktické části došlo během přípravy na sekvenování k několika komplikacím. Při izolaci DNA a následnému měření koncentrace jednoho vzorku vycházela opakovaně nula – vzorek jsem vyřadila. Pravděpodobně to bylo způsobeno špatným odběrem materiálu. U některých vzorků došlo ke komplikacím během amplifikace – nedošlo k namnožení úseku DNA. Příčin mohlo být více, např. nedostatečné odstranění nečistot či ethanolu při promývání pufrem ve fázi izolace DNA, chyba mohla pravděpodobně vzniknout i na základě špatného MasterMixu nebo PCR vody nebo v nejméně pravděpodobném případě při enzymatickém čištění. Pro odstranění nežádoucích komplikací jsem použila nový MasterMix i PCR vodu, kdy u valné většiny vzorků došlo k amplifikaci a mohly být odeslány na sekvenaci. Vzorky, u kterých nedošlo i přes toto k amplifikaci, jsem vyřadila z časových i finančních důvodů. Při vyhodnocování jednotlivých sekvencí jsem další 4 testované vzorky vyřadila z důvodu nečitelnosti.

Zpracovala jsem dohromady 18 vzorků, které byly osekvenovány ve spolupráci s firmou GenSeq s.r.o. metodou Sangerova sekvenování, z čehož u 6 vzorků byl vyšetřen gen *PALB2* – exon 13, u dalších 5 vzorků byl osekvenován exon 10/4 nacházející se v genu *BRCA2* a

zbylých 7 bylo vyšetřeno na gen *BRCA2* – exon 11/12. Spolupráce s touto firmou mi vyhovovala, sekvence byly většinou hotové do dvou pracovních dnů a jejich kvalita byla vysoká.

Nejprve jsem vyizolovala DNA z bukálních stěrů pomocí komerčního kitu Generi Biotech. Samotný návod k použití je velice intuitivní, celková práce s kitem mi vyhovovala. Nicméně zajímavé bylo, že i přes stejný postup a použité reagentie u izolace každého vzorku, vyšla koncentrace nukleové kyseliny velice rozdílná. Pohybovala se v rozmezí 7-200 ng/μl. Výsledný rozdíl byl pravděpodobně způsobený samotným odběrem z bukální sliznice. Většina vyšetřovaných pacientů odmítla výtěr sliznice mnou a rozhodla se provézt odběr sama. I přes poučení, jak správně odebírat bukální stěr, došlo ke kontaminaci potravou nebo stěr nebyl prováděn dostatečným tlakem potřebným pro odebrání požadovaného množství buněk. Nicméně velké odchylky v koncentracích měly minimální nebo žádný vliv na výsledek sekvenování DNA.

Pro zjištění úspěšnosti amplifikace DNA jsem používala gelovou elektroforézu. Metoda je podle mého názoru spolehlivá a časově i finančně nenáročná. I přes možnost vynechání tohoto kroku v přípravě vzorků na sekvenaci ji doporučuji provádět. Z vlastních zkušeností vím, že pokud vzorek nevyjde na elektroforéze, nemá cenu ho sekvenovat. Tato metoda předchází finančním i časovým ztrátám v případě neúspěšnosti metody sekvenování a podle mého názoru slouží jako nezbytná kontrola úspěšnosti amplifikace.

K hodnocení sekvencí jsem používala program BioEdit, který je volně dostupný na internetu. Moc mi nevyhovoval, nebyl vůbec intuitivní. Nabízel spoustu funkcí, které jsem ani po dlouhém snažení nedokázala využít. Mezi další nevýhody programu patří neschopnost rozlišení heterozygotní mutace (překryv dvou píků). Každopádně pro zobrazení sekvenogramů a sekvencí nukleotidů je naprosto dostačující. Jako databázi jsem používala NCBI. Ze začátku mi přišla komplikovaná a těžko jsem se v ní orientovala, nicméně po bližším prozkoumání a konzultaci s mým vedoucím práce Ing. Tomášem Nixem, Ph. D jsem databázi porozuměla. Práce s ní mi vyhovovala a splnila moje požadavky.

Výsledné sekvence vybraných oblastí genu *PALB2* jsem zhodnotila jako bezmutační. V případě mutace v určité oblasti v tomto genu je dle Rahman at al. (2007) riziko vzniku karcinomu prsu či ovarií 2,3x vyšší.

U vyšetřování genu *BRCA2* byly primery nasyntetizované tak, že došlo k osekvenování poslední třetiny exonu 10 včetně části nekódujícího intronu. U všech pěti vzorků jsem našla stejnou mutaci v intronové oblasti – NM\_000059.3(*BRCA2*):c.1909+22del. Jedná se o delecii nukleotidu v místech tandemového opakování. Varianta je zárodečná a benigní, tzn. nemá žádný vliv na zdraví jedince. Jelikož se jedná o bezvýznamnou variantu, není jí věnována pozornost. V databázi NCBI byla popsána 4krát. Soubor vzorků s touto variantou byl náhodný a bez jakékoliv příbuzenské linie, zahrnoval 1 muže a 4 ženy. I přes malé množství testovaných vzorků v této oblasti považuji tuto variantu za častou v populaci. Myslím, že by mohlo být zajímavé vyšetřit tuto variantu u většího množství jedinců v české populaci a provést statistické šetření frekvence výskytu. Vzhledem k tomu, že tato varianta je popsána pouze 4x, zajímalo by mě, jestli přece jen nemůže mít nějaký negativní dopad na zdraví jedince.

V případě poslední testované oblasti v genu *BRCA2* jsem našla u jednoho vzorku mutaci NM\_000059.3(*BRCA2*):c.5362dup (p.Ser1788fs) – rs587781849. Nachází se v exonu 11/12, zhodnotila jsem ji jako patogenní – způsobuje hereditární syndrom nádoru prsu a ovarií. Mutace vytváří předčasný stop kodon, způsobuje zkrácení finálního proteinu nebo jeho rozpad. V databázi NCBI byla tato varianta popsána 5krát jako patogenní, bližší publikace jsem nenalezla. Jelikož vzorky byly anonymní, nemohu posoudit rodinnou historii pacienta s touto variantou. Přesto vím, že v souboru vzorků se vyskytovala pacientka s pozitivní rodinnou anamnézou, tudíž předpokládám, že se jedná právě o tento případ. Podle Kolářové (2017) je nejúčinnějším opatřením v rámci primární prevence chirurgické odstranění rizikového orgánu, k čemu se i já přikláním. Doporučené sledování pacientů s mutací v těchto genech (sekundární prevence) uvádím v kapitole číslo 3.1.1.

I přes nalezení benigní i patogenní mutace, jsem testovala pouze malou část genomu, tím pádem nemohu posoudit, zda testování jedinci nemají hereditární mutaci podmiňující vznik familiárních nádorů. Cílem práce ale bylo především osvojení si metody molekulární biologie, což bylo dle mého názoru naplněno. Podle studie Cross (2017) jeden z pěti „zdravých“ dospělých může nést genetické mutace související s onemocněním. Podle této studie jsou v rozporu názory doktorů ohledně celogenomového sekvenování DNA v rámci preventivní medicíny. Někteří doktoři stejně jako American College of Medical Genetics and

Genomics zastávají názor, že tato prevence nestojí za ekonomické nebo emoční náklady a navrhuje informovat lidi o výsledcích pouhých 59 genů, o nichž je známo nebo se očekává, že budou mít dopad na lidské zdraví. Druhá část včetně Christy Martinové – genetička působící v Geisinger Health System v Danville v Pensylvánii zastávají opačný názor, tvrdí, že mít více informací je vždy prospěšné a zjištěné mutace způsobují pozitivní změny chování pacientů vedoucí ke zdraví. Podle mého názoru má celogenomové sekvenování své výhody i nevýhody, nicméně přikláním se ke Christě Martinové. Životní styl má obrovský vliv na fyzické i psychické zdraví člověka a pokud informace o větším riziku vzniku onemocnění přinutí jedince zlepšit způsob života, je to pozitivum. Nicméně konečné rozhodnutí by mělo zůstat na pacientech.

## 11 Závěr

Tato bakalářská práce představila problematiku hereditárních nádorových syndromů. Blíže jsem specifikovala hereditární syndrom nádoru prsu a ovarií, včetně možných genů způsobujících tento syndrom – *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *PALB2*, dále jsem se zabývala Lynchovým syndromem a systémem genů MMR. V neposlední řadě jsem popsala familiární adenomatózní polypózu asociovanou s genem *APC*. Dále jsem se zaměřila na vyšetření vybraných oblastí 18 anonymizovaných vzorků v genu *PALB2* – exon 13 a v genu *BRCA2* – exon 10/4 a exon 11/12. Pomocí izolace DNA, PCR metody a elektroforézy jsem vzorky připravila na Sangerovo sekvenování. V poslední části mé práce se zabývám analýzou a samotným zhodnocením výsledků pomocí programu BioEdit a databáze NCBI.

Cílem práce bylo seznámení se s odbornou literaturou na téma hereditární karcinomy a vytvoření rešerše, osvojení si molekulárně biologické metody: izolace DNA, PCR a sekvenování včetně přípravy vzorků a provedení analýzy a hodnocení získaných dat s databázemi. Během praktické části této práce jsem se naučila pracovat samostatně v laboratoři a osvojila jsem si metody molekulární biologie. Všechny výše zmíněné cíle byly naplněny.

Ze zjištěných výsledků jednotlivých sekvencí daných oblastí genů jsem našla 4 benigní mutace – NM\_000059.3(BRCA2):c.1909+22del a 1 patogenní mutaci – NM\_000059.3(BRCA2):c.5362dup (způsobující hereditární syndrom nádoru prsu a ovarií). V případě benigní mutace bych chtěla v budoucnu provést statistické šetření frekvence varianty v české populaci a zjistit, jestli opravdu nemá žádný vliv na zdraví člověka. U nalezené patogenní mutace doporučuji lepší prozkoumání, jelikož byla popsána pouze 5krát a publikace zatím nejsou dostupné.

Věřím, že práce bude přínosem a přehledem pro čtenáře zajímaví se o problematiku „*Sekvenování genů u pacientů s karcinomem v rodinné anamnéze*“.

## 12 Seznam literatury

1. ALTANER, Č., 2008. *Buněčná a molekulární biologie*. Praha: Liga proti rakovině. 127 s. ISBN: 978-80-86031-85-9.
2. BÁRTOVÁ, E., 2011. *Sekvenování DNA; Enzymová Sangerova metoda*. [online] [cit. 2020-03-23].  
Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-sekvenovani&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-sekvenovani&lang=cz)
3. BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum. 196s. ISBN 9788024632469.
4. BØRRESEN-DALE, A., 2003. *TP53 and breast cancer* [online]. *Human Mutation*. 21(3), 292-300. [cit. 2019-09-28]. ISSN: 1098-1004.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12619115>
5. BROEKS, A., URBANUS, JH., FLOORE, AN., DAHLER, EC., KLIJN, JG., RUTGERS, EJ., DEVILEE, P., RUSSELL, NS., VAN LEEUWEN, FE., VAN'T VEER, LJ., 2000. *ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility* [online]. *The American Journal of Human Genetics*. 66(2), 494-500. [cit. 2019-09-28]. ISSN 1537-6605. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677309>
6. CROSS, R., 2017. *One in five 'healthy' adults may carry disease-related genetic mutations* [online]. *Science*. [cit. 2020-05-12]. doi:10.1126/science.aan7017. Dostupné z: <https://www.sciencemag.org/news/2017/06/one-five-healthy-adults-may-carry-disease-related-genetic-mutations>
7. ČR, Ústav zdravotnických informací a statistiky, 2016. *Novotvary 2016 ČR, Cancer Incidence in the Czech Republic, 2016* [online]. [cit. 2019-06-13]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index-en.php?pg=publications--library&id=372>
8. DUŠEK, M., HADRAVSKÝ, L., ČERNÁ, K., STEHLÍK, J., ŠVAJDLER, M., KOKOŠKOVÁ, B., DUBOVÁ, M., MICHAL, M., DAUM, O., 2016. Diagnóza Lynchova syndromu od patologa. *Klinická Onkologie*, 29(3), 180-186. ISSN: 1802-5307.

9. ELLSWORTH, R., DECEWICZ, D., SHRIVER, C. & ELLSWORTH, D., 2010. *Breast Cancer in the Personal Genomics Era*. [online]. *Current Genomics*. 11(3), 146-161. [cit. 2019-09-19]. ISSN: 1875-5488. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2878980/>
10. ERKKO, H., XIA, B., NIKKILA, J., SCHLEUTKER, J., SYRJAKOSKI, K., MANNERMAA, A., KALLIONIEMI, A., PYLKAS, K., KARPPINEN, S. M., RAPAKKO, K., MIRON, A., SHENG, Q., 2007. *A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families*. [online]. *Nature*. 446(7133), 316-319. [cit. 2019-09-22]. ISSN 1476-4687. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287723>
11. ESCOBAR, C., MUNKER, R., THOMAS J.O., LI B.D., BURTON G.V., 2012. *Update on desmoid tumors*. [online]. *Annals of Oncology*, 23(3), 562-569. [cit. 2019-09-29]. ISSN 0923-7534. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859899>
12. FEARNHEAD, N. S., BRITTON, M. P. & BODMER, W. F., 2001. *The ABC of APC*. [online]. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 721-733. [cit. 2019-11-10]. ISSN 1460-2083. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257105>
13. FODDE, R., 2002. *The APC gene in colorectal cancer*. [online]. *European Journal of Cancer*, 38(7), 867-871. [cit. 2019-11-10]. ISSN 0959-8049. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978510>
14. FORETOVÁ, L., 2008. Genetika nádorů prsu. *Onkologie*, 2(1), 44-48. ISSN 1802-4475.
15. FORETOVÁ, L., 2010. Jak sledovat pacienty s výskytem nádoru v rodině?. *Interní medicína*, 12(10), 510-514. ISSN 1212-7299.
16. FORETOVÁ, L., ŠTĚRBA, J., OPLETAL, P., MACH, V., LISÝ, J., PETRÁKOVÁ, K., PALÁCOVÁ, K., PALÁCOVÁ, M., NAVRÁTILOVÁ, M., GAILLYOVÁ, R., PUCHMAJEROVÁ, A., KŘEPELKOVÁ, A., MACHÁČKOVÁ, E., 2012. *Li-Fraumeni syndrom – návrh komplexní preventivní péče o nosiče TP53 mutace s použitím celotělové magnetické rezonance*. [online] *Klinická onkologie*, 25(6), 49-54. [cit. 2019-09-28]. ISSN: 1802-5307. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/172/4062.pdf>

17. GALIATSATOS, P., FOULKES, W. D., 2006. *Familial adenomatous polyposis*. [online] *American Journal of Gastroenterology*, 101(2), 385-398. [cit. 2019-11-10]. ISSN: 1572-0241. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16454848>
18. Generi biotech, 2015. *Návod k použití, Kit for isolation of DNA from tissues, Kit for isolation of DNA from microorganisms*. Verze manuálu: 1.4. Hradec Králové
19. Genetics Home Reference, 2013. *APC gene* [online]. [cit. 2019-09-28]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/APC>
20. Genetics Home Reference, 2013. *ATM gene* [online]. [cit. 2019-09-28]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATM>
21. Genetics Home Reference, 2015. *BRCA1 gene* [online]. [cit. 2019-09-19]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA1>
22. Genetics Home Reference, 2015. *BRCA2 gene* [online]. [cit. 2019-09-19]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA2>
23. Genetics Home Reference, 2015. *PTEN gene* [online]. [cit. 2019-09-28]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTEN>
24. Genetics Home Reference, 2020. *MLH1 gene* [online]. [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MLH1>
25. Genetics Home Reference, 2020. *MSH2 gene* [online]. [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH2>
26. Genetics Home Reference, 2020. *MSH6 gene* [online]. [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH6>
27. Genetics Home Reference, 2020. *PALB2 gene* [online]. [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PALB2>
28. Genetics Home Reference, 2020. *PMS2 gene* [online]. [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PMS2>
29. Genetics Home Reference, 2020. *TP53 gene* [online]. [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>



30. GORODERSKA, I., KOZERETSKA, I., DUBROVSKA, A., 2019. *BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance*. [online] *Journal of Cancer*, 10(9), 2109-2127. [cit. 2019-09-19]. ISSN 1837-9664. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6548160/>
31. GOSS, K. H., GRODEN, J., 2000. *Biology of the adenomatous polyposis coli tumor*. [online] *Journal of Clinical Oncology*, 18(9), 1967-1979. [cit. 2019-09-22]. ISSN 1527-7755. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10784639>
32. HADRAVSKÝ, L., DAUM, O., 2017. *Lynchův syndrom*. [online] [cit. 2019-09-29]. Dostupné z: <http://www.lynch.cz>
33. HALÁMKOVÁ, J., 2013. *Význam správného odběru rodinné anamnézy u onkologicky nemocných*. [online] *Praktická gynekologie*, 17(1), 20-22. [cit. 2020-02-16]. ISSN 1801–8750. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/prakticka-gynekologie/2013-1/vyznam-spravneho-odberu-rodinne-anamnezy-u-onkologicky-nemocnych-40470>
34. HALF, E., BERCOVICH, D., ROZEN, P., 2009. *Familial adenomatous polyposis*. [online] *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(22). [cit. 2019-11-10]. ISSN 1750-1172. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822006>
35. HATINA, J., SYKES, B., 1999. *Lékařská genetika, problémy a přístupy*. Praha: Akademie věd České republiky. 298s. ISBN 80-200-0700-8.
36. HÁZOVÁ, J., KŘEPELKOVÁ, A., MACHÁČKOVÁ, E., MIKOVÁ, M., NAVRÁTILOVÁ, M., FORETOVÁ, L., 2010. *Molekulárně genetická diagnostika Lynchova syndromu*. [online] *2010 XXXIV. Brněnské onkologické dny a XXIV. Konference pro sestry a laboranty* [cit. 2019-09-29]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/molekularne-geneticka-diagnostika-lynchova-syndromu/>
37. CHEN, C., CHEN, J., HE, L., STILES, B., 2018. *PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator*. [online] *Frontiers in Endocrinology*, 9(338). [cit. 2019-09-28]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6046409/>

38. JANATOVÁ, M., BORECKÁ, M., SOUKUPOVÁ, J., KLEIBLOVÁ P., STŘÍBRNÁ, J., VOČKA, M., ZEMÁNKOVÁ, P., VESELÁ, K., SOUČEK, P., FORETOVÁ, L., KLEIBL, Z., 2016. PALB2 jako další kandidátní gen pro genetické testování u pacientů s hereditárním karcinomem prsu v České republice. *Klinická onkologie*, 29(1), 531-534. ISSN: 1802-5307.
39. KIM, J. Y., BYEON, J., 2019. *Genetic Counseling and Surveillance Focused on Lynch Syndrome*. [online] *Journal of the Anus, Rectum and Colon*, 3(2), 60-68. [cit. 2019-09-29]. ISSN 2432-3853. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6752118/>
40. KLEIBL, Z., NOVOTNÝ, J., 2003. *Hereditární nádorové syndromy*. Praha: Triron. 32s. ISBN: 80-7254-357-1.
41. KNIFFIN, L.C., HARTZ, P.A., 2016. *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED GENE; ATM*. [online] [cit. 2019-09-28]. Dostupné z: <https://www.omim.org/entry/607585?search=ATM&highlight=atm>
42. KOLÁŘOVÁ, H., 2017. Péče o nosičky mutací genů BRCA1 a BRCA2 z hlediska onkogynekologa. *Onkologie*, 11(5), 228-230. ISSN 1802-4475.
43. KOSINSKY, J., HINRICHSSEN, I., BUJNICKI, J. M., FRIEDHOFF, P., PLOTZ, G., 2010. *Identification of Lynch syndrome mutations in the MLH1-PMS2 interface that disturb dimerization and mismatch repair*. [online] *Human Mutation*, 31(8), 975-982. [cit. 2019-09-29]. ISSN 1098-100. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908215/>
44. KRÁL, J., SLYŠKOVÁ, J., VODIČKA, P., ŠPIČÁK, J., 2016. Molekulární genetika kolorektálního karcinomu. *Klinická Onkologie*, 29(6), 419-427. ISSN 0862-495X
45. KŘEPELKOVÁ, A., PAVLÍKOVÁ, K., PLEVOVÁ, P., 2006. Diagnostika Lynchova syndromu - nové geny a metody. *Klinická onkologie*, 19(3), 76-80. ISSN 0862-495X
46. KUJANOVÁ, M., 2019. *SEQme, Přečištění PCR produktů – srovnání kolonkových souprav různých výrobců a naše tipy*. [online] [cit. 2020-02-12]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/cs/magazine/precisten-pcr-produktu>

47. LAURIDSEN, J. L., VYBERG, M., EMANUELSEN, L., 2015. *Mismatch repair (MMR) proteins*. [online] [cit. 2019-09-29]. Dostupné z: <http://www.nordiqc.org/Epitopes/MMR-proteins/MMR.htm>
48. LYNCH, H., LYNCH, J., ATTARD, T., 2009. *Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model*. [online] *The Canadian Medical Association Journal*, 181(5), 273-280. [cit. 2019-09-29]. ISSN 1488-2329. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2734205/>
49. MACHÁČKOVÁ, E., HRABINCOVÁ, E., HÁZOVÁ, J., VAŠÍČKOVÁ, P., MIKOVÁ, M., NAVRÁTILOVÁ, M., SVOBODA, M., FORETOVÁ, L., 2013. *Hereditární syndrom nádoru prsu a/nebo ovaria - výsledky genetického testování brca1/2 genů v MOÚ*. [online] [cit. 2019-09-19]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/hereditarni-syndrom-nadoru-prsu-a-nebo-ovaria-vysledky-genetickeho-testovani-brc/>
50. MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, 2019. *Nabídka testování dědičné dispozice k nádorům tlustého střeva a dělohy – geny MLH1 a MSH2*. [online] [cit.2019-11-11]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/nabidka-testovani-dedicne-dispozice-k-nadorum-tlusteho-streva-a-delohy-geny-mlh1-a-msh2/t4184>
51. MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, DVOŘÁČKOVÁ, B., 2019. *Genetické poradenství u rizikových nádorových rodin*. [online] [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/geneticke-poradenstvi-u-rizikovych-nadorovych-rodin/t2044>
52. MASCIARI, S., DILLON, D.A., RATH, M., ROBSON, M., WEITZEL, J.N., BALMANA, J.; GRUBER, S.B., FORD, J.M., EUTHUS, D., LEBENSOHN, A., TELLI, M., POCHEBIT, S.M., LYPAS, G., GARBER, J.E., 2012. *Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort*. [online] *Breast Cancer Research and Treatment*, 133(3), 1125-1130. [cit. 2019-09-28]. ISSN 1573-7217. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392042>

53. MERCK GROUP, 2020. *Sanger Sequencing Steps & Method*. [online]. [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html>
54. MISHRA, N., HALL, J., 2012. *Identification of patients at risk for hereditary colorectal cancer*. [online] *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 25(2), 67-82. [cit. 2019-09-29]. ISSN 1531-0043. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23730221>
55. NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F., 2004. *Thompson and Thompson, Klinická genetika*. 6. vydání. Praha: Triton. 492s. ISBN 8072544756.
56. PALÁCOVÁ, M., 2019. Karcinom prsu u nosiček mutací v genu BRCA1/2 – léčíme ho jinak? Zaměřeno na systémovou terapii u mutací v genu BRCA1/2. *Klinická onkologie*, 32(2), 24-30. ISSN 0862-495X
57. PARK, J., JANG; W., CHAE, H., KIM, Y., YOUNG CHI, H., KIM, M., 2015. *Comparison of Targeted Next-Generation and Sanger Sequencing for the BRCA1 and BRCA2 Mutation Screening*. [online]. [cit. 2020-05-08]. Dostupné z: <https://synapse.koreamed.org/search.php?where=aview&id=10.3343/alm.2016.36.2.197&code=3039ALM&vmode=FULL>
58. PASSARGE, E., 2016. *Barevný atlas genetiky*. 5. vydání. Praha: Grada Publishing. 472 s. ISBN: 978-80-247-3099-8
59. PETRÁKOVÁ, K., PALÁCOVÁ, M., SCHNEIDEROVÁ, M., STANDARA, M., 2016. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií. *Klinická onkologie*, 29(1), 14-21. ISSN 0862-495X
60. PLEVOVÁ, P., NOVOTNÝ, J., PETRÁKOVÁ, K., PALÁCOVÁ, M., KALÁBOVÁ, R., SCHNEIDEROVÁ, M., FORETOVÁ, L., 2009a. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií. *Klinická onkologie*, 22(1), 8-11. ISSN: 0862-495X
61. PLEVOVÁ, P., NOVOTNÝ, J., ŠACHLOVÁ, M., KŘEPELKOVÁ, A., FORETOVÁ, L., 2009b. Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom). *Klinická onkologie*, 22(1), 12-15. ISSN: 0862-495X

62. PLEVOVÁ, P., ŠTEKROVÁ, J., KOHOUTOVÁ, M., NOVOTNÝ, J., ŠACHLOVÁ, M., PETRÁKOVÁ, K., FORETOVÁ, L., 2009c. Familiární adenomatózní polypóza. *Klinická onkologie*, 22(1), 16-19. ISSN: 0862-495X
63. PUCHMAJEROVÁ, A., TORNIKIDIS, J., MRŇA, L., HAVLICOVICOVÁ, M., VLČKOVÁ, M., CHRUDIMSKÁ, J., MACEK, M., HOCH, J., 2018. Hereditární formy karcinomu prsu: genetická etiologie a současné možnosti prevence a léčby. *Časopis lékařů českých*, 157(2), 90-95. ISSN 1803-6597.
64. RAHMAN, N., SEAL, S., THOMPSON, D., KELLY, P., RENWICK, A., ELLIOTT, S., REID, S., SPANOVA, K., BARFOOT, R., CHAGTAI, T., JAYATILAKE, H., MCGUFFOG, L., HANKS, S., EVANS, D., ECCLES, D., THE BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY COLLABORATION, EASTON, D. F., STRATTON, M. R., 2007. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. [online] *Nature Genetics*, 39(2), 165-167. [cit. 2019-09-28]. ISSN 1546-1718. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17200668>
65. ROTMAN, G., SHILOH, Y., 1997. *Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress?*. [online]. *BioEssays*, 19(10), 911-917. [cit. 2019-09-28]. ISSN 1521-1878. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9363685>
66. SENDA, T., SHIMOMURA, A., LIZUKA-KOGO, A., 2005. Adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. [online]. *Anatomical Science International*, 80(3), 121-131. [cit. 2019-09-28]. ISSN 1447-073X. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/med/16158975>
67. SEO, M., CHO, N., SHIN AHN, H., MOON, H., 2014. *Cowden Syndrome Presenting as Breast Cancer: Imaging and Clinical Features*. [online]. *Korean Journal of Radiology*, 15(5), 586-590. [cit. 2019-09-28]. ISSN 2005-8330. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4170159/>
68. SILWAL-PANDIT, L., LANGERØD, A., BØRRESEN-DALE, A., 2017. *TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer*. [online] *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(1). [cit. 2019-09-28]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5204332/>

69. SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ, K., 1995. *Základy klinické genetiky*. 2.vydání. Žilina: Osveta. 259 s. ISBN 8021704772.
70. SWIFT, M., MORRELL, D., MASSEY, R., CHASE, C., 1991. *Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia..* [online] *The New England Journal of Medicine*, 325(26), 1831-1836. [cit. 2019-09-28]. ISSN 1533-4406. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1961222>
71. ŠACHLOVÁ, M., 2004. *Problémy preventivní a léčebné strategie HNPCC (Lynchův syndrom), XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laboranty.* [online] [cit. 2019-11-11]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinarnim/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/problemy-preventivni-a-lecebne-strategie-hnpcc-lynchuv-syndrom/>
72. TEPLICK, A., KOWALSKI, M., BIEGEL, J., NICHOLS, K., 2011. *Educational paper Screening in cancer predisposition syndromes: guidelines for the general pediatrician.* [online] *European Journal of Pediatrics*, 170(3), 285-294. [cit. 2019-09-28]. ISSN 1432-1076. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21210147>
73. TISCHKOWITZ, M., XIA, B., SABBAGHIAN, N., REIS-FILHO, J. S., HAMEL, N., LI, G., VAN BEERS, E. H., LI, L., KHALIL, T., QUENNEVILLE, L. A., OMEROGU, A., POLL, A., LEPAGE, P., WONG, N., NEDERLOF, P. M., ASHWORTH, A., TONIN, P. N., NAROD, S. A., LIVINGSTON, D. M., FOULKES, W. D., 2007. *Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families.* [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), 6788-6793. [cit. 2019-10-27]. ISSN 1091-6490. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17420451>
74. TOMÁŠEK, J., 2015. *Onkologie - minimum pro praxi*. Praha: Inform, s.r.o., 445 s. ISBN 9788088046011.
75. VOGELSANG, M., 2013. *DNA Alterations in Lynch Syndrome: advances in molecular diagnosis and genetic counselling*. New York: Springer. 195 s. ISBN: 9400765967.
76. VORLÍČEK, J., ABRAHÁMOVÁ, J., VORLÍČKOVÁ, H., 2006. *Klinická onkologie pro sestry*. Praha: Grada Publishing, a.s. 450 s. ISBN 978-80-247-3742-3.

77. VYZULA, R., ŽALOUĐÍK, J., 2007. *Rakovina tlustého střeva a konečníku: vybrané kapitoly*. Praha: Maxdorf s.r.o. 288 s. ISBN 978-80-204-2474-7.
78. XIA, B., SHENG, Q., NAKANISHI, K., OHASHI, A., WU, J., CHRIST, N., LIU, X., JASIN, M., COUCH, F. J., LIVINGSTON, D. M., 2006. *Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2*. [online] *Molecular Cell*, 22(6), 719-729, [cit. 2019-10-27]. ISSN 1097-4164. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276506003376>
79. ZHANG, X., LI, R., 2018. *BRCA1-Dependent Transcriptional Regulation: Implication in Tissue-Specific Tumor Suppression*. [online] *Cancers (Basel)*, 10(12). [cit. 2019-09-18]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30558184>

### 13 Seznam obrázků a tabulek


|   |    |
|---|----|
| Obrázek 1 Lokace genu <i>BRCA1</i> .....  | 14 |
| Obrázek 2 Lokace genu <i>BRCA2</i> .....  | 15 |
| Obrázek 3 Lokace genu <i>TP53</i> .....   | 18 |
| Obrázek 4 Lokace genu <i>PTEN</i> .....   | 18 |
| Obrázek 5 Lokace genu <i>ATM</i> .....  | 19 |
| Obrázek 6 Lokace genu <i>PALB2</i> .....  | 20 |
| Obrázek 7 Lokace genu <i>MLH1</i> .....   | 22 |
| Obrázek 8 Lokace genu <i>MSH2</i> .....   | 23 |
| Obrázek 9 Lokace genu <i>MSH6</i> .....   | 23 |
| Obrázek 10 Lokace genu <i>PMS2</i> .....  | 23 |
| Obrázek 11 Lokace genu <i>APC</i> .....   | 27 |
| Obrázek 12 PCR - 1. denaturace, 2. Annealing, 3. Syntéza .....  | 33 |
| Obrázek 13 Sangerovo sekvenování.....   | 40 |
| Obrázek 14 Elektroforéza na gelu I .....  | 42 |
| Obrázek 15 Elektroforéza na gelu II.....  | 42 |
| Obrázek 16 DNA ladder – 100 bp .....  | 42 |
| Obrázek 17 Příklad shody vyšetřovaného vzorku s databází NCBI.....                                    | 43 |
| Obrázek 18 Gen <i>PALB2</i> exon 13 – NCBI .....  | 44 |
| Obrázek 19 Část sekvence genu <i>PALB2</i> – exon 13 v programu BioEdit .....                         | 45 |
| Obrázek 20 Mutace NM_000059.3( <i>BRCA2</i> ):c.1909+22del v genu <i>BRCA2</i> – vlákno forward ..... | 46 |
| Obrázek 21 Mutace NM_000059.3( <i>BRCA2</i> ):c.1909+22del v genu <i>BRCA2</i> – vlákno reverse ..... | 46 |
| Obrázek 22 Gen <i>BRCA2</i> exon 11 – NCBI.....   | 47 |
| Obrázek 23 Duplikace nukleotidu a shoda sekvence s NCBI .....   | 47 |
| Obrázek 24 Vzorový anamnestický dotazník .....  | 66 |
| Obrázek 25 Spektrofotometr Colibri Microvolume od výrobce Titertek Berthold.....                      | 67 |
| Obrázek 26 Termocycler MJ Mini od výrobce Bio-Rad .....   | 67 |
| Obrázek 27 Elektroforetická vana od výrobce MajorSciences .....                                       | 68 |
| Obrázek 28 UVIsave HD5 od firmy Uvitec Cambridge.....   | 68 |



|  |    |
|--|----|
| Tabulka 1 Geny zvyšující riziko nádorů prsu (RR – relativní riziko) .....                  | 13 |
| Tabulka 2 Doporučené sledování žen s mutací v genech <i>BRCA1</i> nebo <i>BRCA2</i> .....  | 16 |
| Tabulka 3 Doporučené sledování mužů s mutací v genech <i>BRCA1</i> nebo <i>BRCA2</i> ..... | 16 |
| Tabulka 4 Mutace MMR genů.....   | 21 |
| Tabulka 5 Odhadovaná rizika dle rodinné anamnézy.....                                      | 25 |
| Tabulka 6 Objemy reagensů.....   | 34 |
| Tabulka 7 Průběh PCR .....   | 35 |
| Tabulka 8 Sekvence primerů .....   | 35 |
| Tabulka 9 Program na přečištění PCR produktů .....   | 38 |
| Tabulka 10 Množství reagensů pro přípravu na sekvenování.....                              | 39 |
| Tabulka 11 Shoda vzorků s genem <i>PALB2</i> , exon 13.....                                | 44 |
| Tabulka 12 Shoda exonu 10/4 na genu <i>BRCA2</i> s databází NCBI .....                     | 46 |
| Tabulka 13 Shoda exonu 11 genu <i>BRCA2</i> s NCBI.....                                    | 48 |

## 14 Seznam příloh

### Příloha 1

|   |   |
|---|---|
|  | <b>Anamnestické rizikové faktory<br/>u nádorů<br/>prsu (dotazník)</b> |
|---|---|

---

**1. Vyskytl se ve Vaší rodině nádor (rakovina) prsu?** ano /\_/ ne /\_/

a) jestliže ano: u koho? matka /\_/ sestra /\_/ babička /\_/ jiná příbuzná /\_/

b) jestliže ano: věk příbuzné při zjištění nádoru prsu /\_\_\_\_/.

**2. Vyskytl se u Vás / ve Vaší rodině nádor (rakovina) vaječniku?** ano /\_/ ne /\_/

a) jestliže ano: u koho? Vy /\_/ Matka /\_/ babička /\_/ jiné /\_\_\_\_\_/

b) jestliže ano: věk příbuzné při zjištění nádoru vaječniku /\_\_\_\_/

**3. Vyskytl(-y) se jiné zhoubné nádory (rakovina) v rodině?** ano /\_/ ne /\_/

a) jestliže ano, udejte, o jaký orgán se jednalo /\_\_\_\_\_/

**4. Nahmatala jste si v poslední době nějaký tužší útvar v prsu (bulku)?** ano /\_/ ne /\_/.

a) jestliže ano: datum /\_\_\_\_\_/

**5. Váš věk při prvním menstruačním krvácení (tzv. menarche) /\_\_\_\_/**

a) při zániku menstruace (tzv. menopauza) /\_\_\_\_/

**6. Váš věk při prvním porodu /\_\_\_\_/ počet porodů /\_\_\_\_/**

**7. Užívala jste nebo užíváte náhradní hormonální léčbu (jinou než hormonální antikoncepci) ano /\_/ ne /\_/**

a) jestliže ano: doba užívání hormonální léčby 1-5 let /\_/ 6-10 let /\_/ více než 10 let /\_/

**8. měla jste někdy úraz prsu?** ano /\_/ ne /\_/

a) jestliže ano: v kolika letech? /\_\_\_\_/

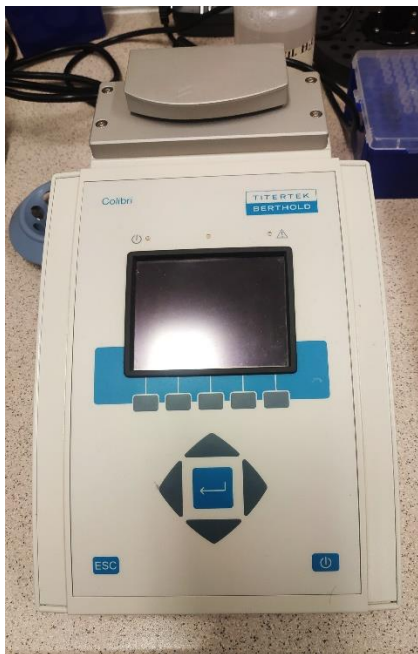
**9. Byl u Vás někdy proveden odběr vzorku prsu? (tzv. biopsie) ano /\_/ ne /\_/**

a) jestliže ano: kolikrát /\_\_\_\_\_/

**10. Byla jste někdy v minulosti léčena zářením na oblast hrudníku? ano /\_/ ne /\_/**

Obrázek 24 Vzorový anamnestický dotazník, (zdroj: [www.mediray.cz](http://www.mediray.cz))

## Příloha 2



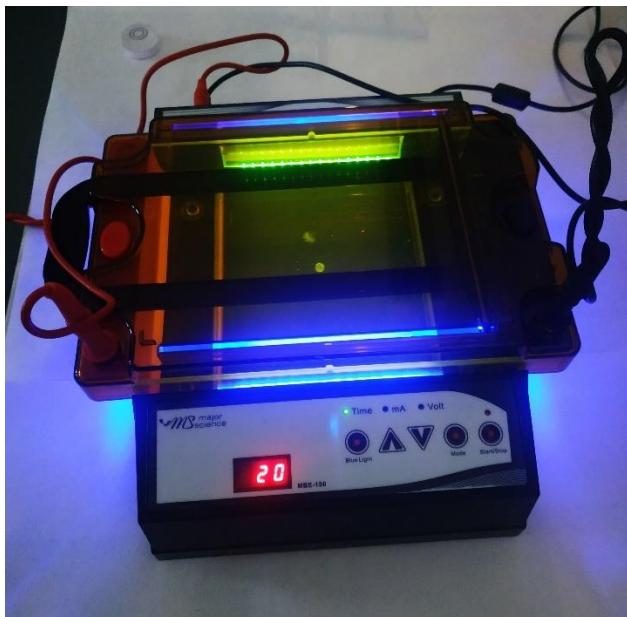
Obrázek 25 Spektrofotometr Colibri Microvolume od výrobce Titertek Berthold (zdroj: vlastní)

## Příloha 3



Obrázek 26 Termocycler MJ Mini od výrobce Bio-Rad (zdroj: vlastní)

#### Příloha 4



Obrázek 27 Elektroforetická vana od výrobce MajorSciences (zdroj: vlastní)

#### Příloha 5



Obrázek 28 UVISave HD5 od firmy Uvitec Cambridge (zdroj: vlastní)

Příloha 6

*PALB2* – exon 13

1F

CGAACCCCCTCACTGTCTCTGACCACATTGGTCTTTTGTGAATGGTCGGGTACAGACTCTCATTGCTGGCTG  
GACAAAAAGATGGAAATATATTTGTATACCACTATTCATAAGTTAGGGTAAAGTGAAAAACACAATTTCTG  
GATATATTGGGCCTCTTAGTATTTTTGGAGTTTTAAATATAAAGGAGAATATCTGAATGACACTTAAAAATG  
ATTGCTTGTTTATGTCCAGACAGACTTATTTTTATTCTAATGATGGTAGCACCCTGATCTTGGATGTACAT  
TTATGTATACTTTGAGAAAAAGGGTTTTAGGTTGATTTTTGTAATTTCCACATTTGTACATGTGCTTTTAAA  
GGTGTACATAAAGCTTCAAATGGCAATAAATATTTATTTTTATACATTCTGCTTGGCATGTTATTGTTCCCA

TTCC

1R

AGTAAATAAATATTTATTGCCATTTGAAGCTTTATGTACACCTTTAAAAGCACATGTACAAATGTGGGAAA  
TTACAAAAATCAACCTAAAACCTTTTTCTCAAAGTATACATAAATGTACATCCAAGATCAGTGGTGCTACC  
ATCATTAGAATAAAAAATAAGTCTGTCTGGACATAAACAAGCAATCATTTAAGTGTCATTCAGATATTCTC  
CTTTATATTTAAAACCTCCAAAAATACTAAGAGGCCCAATATATCCAGAAAATTGTGTTTTCACTTTACCT  
AACTTATGAATAGTGGTATACAAATATATTTCCATCTTTTTGTCCAGCCAGCAAATGAGAGTCTGTACCCGA  
CCATTCACAAAAGACCAATGTTGGTCAGAGACAGGTGGGAGGAGGGCAGTACACTGACCGAGAATAAG

TCCCAA

2F

TCTGACCACATTGGTCTTTTGTGAAATGGTTCGGGTACAGACTCTCATTGCTGGCTGGACAAAAAGATGGAA  
ATATATTTGTATACCACTATTCATAAGTTAGGGTAAAGTGAAAAACACAATTTCTGGATATATTGGGCCTCT  
TAGTATTTTTGGAGTTTTAAATATAAAGGAGAATATCTGAATGACACTTAAAATGATTGCTTGTTTATGTCC  
AGACAGACTTATTTTTATTCTAATGATGGTAGCACCCTGATCTTGGATGTACATTTATGTATACTTTGAGA  
AAAAGGGTTTTAGGTTGATTTTTGTAATTTCCACATTTGTACATGTGCTTTTAAAGGTGTACATAAAGCTTC  
AAATGGCAATAAATATTTATTTTTATACATTCTGCTTGGCATGTTATTGTTCCATT

2R

AAGTAAATAATAATTTATTGCCATTTGAAGCTTTATGTACACCTTTAAAAGCACATGTACAAATGTGGGAA  
ATTACAAAAATCAACCTAAAACCTTTTTCTCAAAGTATACATAAATGTACATCCAAGATCAGTGGTGCTAC  
CATCATTAGAATAAAAAATAAGTCTGTCTGGACATAAACAAGCAATCATTTAAGTGTCATTCAGATATTCT  
CCTTTATATTTAAAACCTCCAAAAATACTAAGAGGCCCAATATATCCAGAAAATTGTGTTTTCACTTTACCC  
TAACTTATGAATAGTGGTATACAAATATATTTCCATCTTTTTGTCCAGCCAGCAAATGAGAGTCTGTACCCG  
ACCATTCACAAAAGACCAATGTTGGTCAGAGACAGGTGGGAGGAGGGCAGTACACTGACCGAGAATAAA

GTCCCA

3F

CTGACCACATTGGTCTTTTGTGAATGGTTCGGGTACAGACTCTCATTGCTGGCTGGACAAAAAGATGGAAAT  
ATATTTGTATACCACTATTCATAAGTTAGGGTAAAGTGAAAAACACAATTTCTGGATATATTGGGCCTCTTA  
GTATTTTTGGAGTTTTAAATATAAAGGAGAATATCTGAATGACACTTAAAATGATTGCTTGTTTATGTCCA  
GACAGACTTATTTTTATTCTAATGATGGTAGCACCCTGATCTTGGATGTACATTTATGTATACTTTGAGAA  
AAAGGGTTTTAGGTTGATTTTTGTAATTTCCACATTTGTACATGTGCTTTTAAAGGTGTACATAAAGCTTCA  
AATGGCAATAAATATTTATTTTTATACATTCTGCTTGGCATGTTATTGTTCCATT

3R

AGTAAAATAAATAATTTATTGCCA TTTGAAGCTTTATGTACACCTTTAAAAGCACATGTACAAATGTGGGAA  
ATTACAAAATCAACCTAAAACCTTTTTCTCAAAGTATACATAAATGTACATCCAAGATCAGTGGTGCTAC  
CATCATTAGAATAAAAAATAAGTCTGTCTGGACATAAACAAGCAATCATTTTAAGTGTCAATCAGATATTCT  
CCTTTATATTTAAAACCTCAAAAAATACTAAGAGGCCCAATATATCCAGAAAATTGTGTTTTCACTTTACCC  
TAACCTATGAATAGTGGTATACAAATATATTTCCATCTTTTTGTCCAGCCAGCAAATGAGAGTCTGTACCCG  
ACCATTTACAAAAAGACCAATGTTGGTCAGAGACAGGTGGGAGGAGGGCAGTACACTGACCGAGA GTAAA  
GTCCCAA

4F

TTGTCGCATCATTGATTTGCACATTGGTCTTTTGTAGAAAATGGTCGGGTACAGACTCTCATTGCTGGCTGGA  
CAAAAA GATGGAAATATATTTGTATACCACTATTCATAAGTTAGGGTAAAGTGAAAACACAATTTTCTGGA  
TATATTGGCCCTCTTAGTATTTTTTGGAGTTTTAAATATAAAGGAGAATATCTGAATGACACTTAAAATGAT  
TGCTTGTTTATGTCCAGACAGACTTATTTTTATTCTAATGATGGTAGCACCCTGATCTTGGATGTACATT  
ATGTATACTTTGAGAAAAAGGGTTTTAGGTTGATTTTTGTAATTTCCACATTTGTACATGTGCTTTAAAGG  
TGTACATAAAGCTTCAAATGGCAATAAATATTTATTTTTATACATTCTGCTTGGCATGTTATTGTTTCCCAT  
C CACTCCTGGTGTGTCTTTGAGATTACGTACTCCGAAATGCATTCTCCCCTGGATCCCTAAAATGTAGCTTTC  
AGCTCATTGCTGA

4R

AGAATCGAGAAAAGTAGTCCAAATTAGCCATTGAA GCTTTATGTACACCTTTAAAAGCACATGTACAAATG  
TGGGAAATTACAAAATCAACCTAAAACCTTTTTCTCAAAGTATACATAAATGTACATCCAAGATCAGTG  
GTGCTACCATCATTAGAATAAAAAATAAGTCTGTCTGGACATAAACAAGCAATCATTTTAAGTGTCAATCAG  
ATATTCTCCTTTATATTTAAAACCTCAAAAAATACTAAGAGGCCCAATATATCCAGAAAATTGTGTTTTAC  
TTACCCTAACTTATGAATAGTGGTATACAAATATATTTCCATCTTTTTGTCCAGCCAGCAAATGAGAGTCTG  
TACCCGACCATTTACAAAAAGACCAATGTTGGTCAGAGACAGGTGGGAGGAGGGCAGTACACTGACCGAG  
AAGTAAGTCCC AAAAA

5F

GGGGGACCTTTCAACTTCCAACCTCAAACCAACATTGGTCTTTTGTGAAA TGGTCGGGTACAGACTCTCAT  
TTGCTGGCTGGACAAAAGATGGAAATATATTTGTATACCACTATTCATAAGTTAGGGTAAAGTGAAAACA  
CAATTTTCTGGATATATTGGCCCTCTTAGTATTTTTTGGAGTTTTAAATATAAAGGAGAATATCTGAATGAC  
ACTTAAAATGATTGCTTGTTTATGTCCAGACAGACTTATTTTTATTCTAATGATGGTAGCACCCTGATCTT  
GGATGTACATTTATGTATACTTTGAGAAAAAGGGGTTTTAGGTTGATTTTTGTAATTTCCACATTTGTACAT  
GTGCTTTTAAAGGTGTACATAAAGCTTCAAATGGCAATAAATATTTATTTTTTATACATTCTGGCTTGGCATG  
TTATGGTTCCCCCATTTCA

5R

GGAAACAGAAAAATAGTACCAAATTGCCATTGAA GCTTTATGTACACCTTTAAAAGCACATGTACAAATG  
TGGGAAATTACAAAATCAACCTAAAACCTTTTTCTCAAAGTATACATAAATGTACATCCAAGATCAGTG  
GTGCTACCATCATTAGAATAAAAAATAAGTCTGTCTGGACATAAACAAGCAATCATTTTAAGTGTCAATCAG  
ATATTCTCCTTTATATTTAAAACCTCAAAAAATACTAAGAGGCCCAATATATCCAGAAAATTGTGTTTTAC  
TTACCCTAACTTATGAATAGTGGTATACAAATATATTTCCATCTTTTTGTCCAGCCAGCAAATGAGAGTCTG  
TACCCGACCATTTACAAAAAGACCAATGTTGGTCAGAGACAGGTGGGAGGAGGGCAGTACACTGACCGAG  
AGTAAAGTTCCCAA

6F

GGGAAGGTCTCTCCCTGTCTCAGACCAACATTGGTCTTTTGTGAATGGTCGGGTACAGACTCTCATTGCTG  
GCTGGACAAAAAGATGGAAA **TATATTTGTATACCACTATTCATAAGTTAGGGTAAAGTGAAAAACAATTT**  
**TCTGGATATATTGGGCCCTCTTAGTATTTTTTGGAGTTTTAAATATAAAGGAGAATATCTGAATGACACTTAA**  
**AATGATTGCTTGTATTATGTCCAGACAGACTTATTTTTTATTCTAATGATGGTAGCACCCTGATCTTGGATGT**  
**ACATTTATGTATACTTTGAGAAAAAGGGTTTTAGGTTGATTTTTGTAAATTTCCACATTTGTACATGTGCTTT**  
**TAAAGGTGTACATAAAGCTTCAAATGGCAATAAATATTTATTTTTATACATTCTGCTTGGCATGTTATTGTTT**  
**CCCA**TTCAAT

6R 81FF51

GGAAAAGAAAAATAATATTATATTGCCATTTGAA **GCTTTATGTACACCTTTAAAAGCACATGTACAAATGT**  
**GGGAAATTACAAAAATCAACCTAAAACCCTTTTCTCAAAGTATACATAAATGTACATCCAAGATCAGTGG**  
**TGCTACCATCATTAGAATAAAAAATAAGTCTGTCTGGACATAAACAAGCAATCATTTTAAGTGTCAATCAGA**  
**TATTCCTTTATATTTAAAACTCAAAAAATACTAAGAGGGCCAATATATCCAGAAAAATTGTGTTTTCACTT**  
**TACCCTAACTTATGAATAGTGGTATACAAATATATTTCCATCTTTTGTCCAGCCAGCAAATGAGAGTCTGT**  
**ACCCGACCATTTCAAAAAGACCAATGTTGGTCAGAGACAGGTGGGAGGAGGGCAGTACACTGACCGAGA**  
**AGTAAGTCC**CAAAC

*BRCA2* – exon 10/4

7F

GGGAGACACTTTAAAAGAACTGAAGCCTCTGAAAGTGGACTGGAAA **TACATACTGTTTGCTCACAGAAGGA**  
**GGACTCCTTATGTCCAAATTTAATTGATAATGGAAGCTGGCCAGCCACCACCACAGAATTCTGTAGCTTT**  
**GAAGAATGCAGGTTTAATATCCACTTTGAAAAAGAAAACAAATAAGTTTATTTATGCTATACATGATGAAA**  
**CATCTTATAAAGGAAAAAAAATACCGAAAAGACCAAAAATCAGAACTAATTAAGTTCAGCCCAGTTTGAA**  
**GCAAATGCTTTTGAAGCACCCTTACATTTGCAAATGCTGATTGAGTACCTCTGTCTTTTTTTTTTTGTAAA**  
**TAGTACATATAGTTTTATAGATGACGATTCCTTCTGGGTTTTTTTCTGCTTTTTTAAAATCTTCATATCTTATAT**  
**TTAATCTTAG**GCACTCGGGGTATAAAAA

7R

TATGAAATGAGATTTTAAAAGCAGAAAAACACAGAAGGAAT **CGTCATCTATAAAAATATATGTAATTTT**  
**ACAAAAAATAAAGGACAAAGGTACCTGAATCACCATTTGCAAATGTAAGTGGGGCTTCAAAGCATTGCT**  
**TCAAAGTGGGCTGAACAGTTAATTAGTTCTGATTTTTGGTCTTTCCGGTATTTTTTTTCTTTATAAAAATGTTT**  
**ATCATGTATAGCAAAAATAAAGTATTTGTTTTCTTTTTCAAAGGGAATATTAACCTGCATTCTTCAAAGCT**  
**ACAAAATTCTGGGGGGGGGGGGCTGGCCAGCTTCCATTATCAATTAATTTGGACATAAAGGAGCCCTCCTT**  
**CTGTGAGCAAACAGTATGATTTCCAGCCCACTTTCAAAGGCTTCAAGTTTCTTTTTTAAAGTTTGGATCAGTC**  
**ATATGAC**CTGAAAACTTTGCATGGAA

8F

GGATAGACACTTTAAAAGAACTGAAGCCTCTGAAAGTGGACTGGAAA **TACATACTGTTTGCTCACAGAAGG**  
**AGGACTCCTTATGTCCAAATTTAATTGATAATGGAAGCTGGCCAGCCACCACCACAGAATTCTGTAGCTT**  
**TGAAGAATGCAGGTTTAATATCCACTTTGAAAAAGAAAACAAATAAGTTTATTTATGCTATACATGATGAA**  
**ACATCTTATAAAGGAAAAAAAATACCGAAAAGACCAAAAATCAGAACTAATTAAGTTCAGCCCAGTTTGA**  
**AGCAAATGCTTTTGAAGCACCCTTACATTTGCAAATGCTGATTGAGTACCTCTGTCTTTTTTTTTTTGTAA**  
**ATAGTACATATAGTTTTATAGATGACGATTCCTTCTGTGTTTTTTTCTGCTTTTTTAAAATCTTCATATCTTATA**  
**TTAATCTTAGGCATCATCTGTATAC**AAA

8R

TAATAGAATGAAGAATTTTAAAAGCAGAAAAAACACAGAAGGAATCGTCATCTATAAAACTATATGTACT  
ATTTACAAAAAAAAAAAAACCAGAGGTACCTGAATCAGCATTGCAAATGTAAGTGGTGCTTCAAAAGCATT  
TGCTTCAAACCTGGGCTGAACAGTTAATTAGTTCTGATTTTGGTCTTTCGGTATTTTTTTTCCTTTATAAGATG  
TTTCATCATGTATAGCATAAAATAAACTTATTTGTTTTCTTTTTCAAAGTGGATATTAACCTGCATTCTTCAA  
AGCTACAGAATCCTGTGTGGTGGTGGCTGGCCAGCTTCCATTATCAATTAATTTGGACATAAGGAGTCCCTC  
CTTCTGTGAGCAAACAGTATGTATTTCCAGTCCACTTTCAAAGGCTTCAGTTTCTTTTTTAAAGTTTGGATCA  
GTCATATGACCTGAAAACTTGCATTGAAA

9F

GGATTGACACTTTAAAAGAACTGAAGCCTCTGAAAGTGGACTGGGAAAACACATACTGTTTGTCTACAGAAG  
GAGGACTCCTTATGTCCAAATTTAATTGATAATGGAAGCTGGCCAGCCACCACCACACAGAATTCTGTAGCT  
TTGAAGAATGCAGGTTTAATATCCACTTTGAAAAAGAAAACAAATAAGTTTATTTATGCTATAACATGATGAA  
ACATCTTATAAAGGAAAAAAAAATACCGAAAGACCAAAAAATCAGAACTAATTAAGTTCAGCCCAGTTTGA  
AGCAAATGCTTTTGAAGCACCCTTACATTTGCAAATGCTGATTACAGGTACCTCTGTCTTTTTTTTTTTGTAA  
ATAGTACATATAGTTTATAGATGACGATTCCTTCTGGGTTTTTTTCTGCTTTTTTAAAATCTTCATATCTTATA  
TTAATCTTAGGCATCTCGGGGTATAAAAAA

9R

AATCGCATTGAGATTTTAAAAGCAGAAAAAACACAGAAGGAAACACATACTATAAAACTATATGTACTATT  
TACAAAAAAAAAAAAACAAAGGTACCTGAATCAGCATTGCAAATGTAAGGGGGGCTTCAAAAGCATTG  
CTTCAAACCTGGGCTGAACAGTTAATTAGTTCTGATTTTGGTCTTTCGGTATTTTTTTTCCTTTATAAAATGTT  
TCATCATGTATAGCAAAAAAAAAACTTATTTGTTTTCTTTTTCAAAGGGGAAATTAACCTGCATTCTTCAAA  
GCTACAAAATTCTGTGGGGGGTGGCGGGCCAGCTTCCATTATCAATTAATTTGGACATAAGGAGCCCC  
CTTCTGTGAGCAAACAGTATGTATTTCCAGCCCCTTTCAAAGGCTTCAGTTTCTTTTTTAAAGTTTGGATCA  
TTCATATGACCTGAAAACCTTTGCATGGAAACTGAAAATGGAAGTACCCTTTCAAACCTTTTTTC

10F

GGAGGGACACTTTAAAAGAACTGGAAGCCTCTGGATAGTGGGACTGGGAAATACATACTGGTTTGCTCA  
CAGAAGGAGGACTCCTTCATGTCCAAATTTAATTCGATAATCGGAAGCTCGGCCAGCCACCACCACACAGA  
ATTCGTAGCTTCGAAGAATGCAGGTTAATATCCACTTCCGAAAAAGAAAACAAATAAGTTTATTTATGCT  
ATACATGATGAAACATCTTATAAAGGAAAAAAAAATACCGAAAGACCAAAAAATCAGAACTAATTAAGTTC  
AGCCCAGTTTGAAGCAAATGCTTTTGAAGCACCCTTACATTTGCAAATGCTGATTACAGGTACCTCTGTCT  
TTTTTTTTTTGTAATAGTACATATAGTTTTTATAGATGGACGATTCCTTCTGTGTTTTTTCTTGCTTTTTA  
AAATCTTCATATCTTATATTTAATCTTAGGACCCGGGGGGTAAAAAAAAA

10R

AATGATCTTTGGAAGATTTTAAAGCAGAAAAAACACAGAAGGAAACACATACTATAAAACTATATGTACT  
TATTTACAAAAAAAAAAAAAGACAGAGGTACCTGAATCAGCATTGCAAAGTAAAGTGGGGCTTCAAAAGCAT  
TTGCTTCAAACGGGGCTGAACAGTTAATTAGTTCTGATTTTGGTCTTTCGGTATTTTTTTTCCTTTATAAAAT  
GTTTCATCATGTATAGCAAAAAATAAACTTATTTGTTTTCTTTTTCAAAGGGGATATTAACCTGCATTCTTCA  
AAGCTACAAAATTCTGGGGGGGGGGGCTGGCCAGCTTCCATTATCAATTAATTTGGACATAAGGAGTCC  
TCCTTCTGTGAGCAAACAGTATGTATTTCCAGTCCACTTTCAAAGGCTTCAGTTTCTTTTTTAAAGTTTGGAT  
CAGTCATATGACCTGAACTTTTTGATTGAAAACCTTCTCTATGG



11F

GGTGGGGAACTTTAAAAAGAACTGGAAGCCTCTGAAAGTGGACTGGAAA TACATACTGGTTTGCTCACAGA  
AGGAGGACTCCTTATGTCCAAATTTAATTGATAATGGAAGCTGGCCAGCCACCACCACACAGAATTCTGTA  
GCTTGAAGAATGCAGGTTTAATATCCACTTTGAAAAAGAAAACAAATAAGTTTATTTATGCTATACATGAT  
GAAACATCTTATAAAGGAAAAAAAAATACCGAAAGACCAAAAATCAGAACTAATTAAGTTGTTGAGCCAGTT  
TGAAGCAAATGCTTTTGAAGCACCCTTACATTTGCAAATGCTGATTCAGGTACCTCTGTCTTTTTTTTTTTG  
TAAATAGTACATATAGTTTTATAGATGACGATTCCTTCTGTGTTTTTTCTGCTTTTTAAAAATCTTCATATCTT  
ATATTTAATCTT AGGCTACCGGGTGTA AAAAAA

11R

AATACATTAGGAAGATTCTATAAGCAGAAAAACACAGAAGGGAATC GTCATCTATAAACTATATGTA  
ATTTACAAAAAAGACAGAGGTACCGAAATCAGCATTGGCAAAGGTAAGGGGGCTTCAAAAGCAT  
TGGCTTCAAACGGGGCGAACAGTTAATTAGTTCTGATTTTGGGTCTTTCGGTATTTTTTTTCTTTATAAAA  
GGTTTCATCAGGTATAGCAAAAATAAACTTATTGGTTTTCTTTTCAAAGGGGATATTAACCTGCATTCTC  
AAAGCTACAAAATTCTGTGGGGGGGGGGCGGGCCAGCTTCCATTATCAATTAATTGGGACATAAGGAGTC  
CTCCTTCTGGGAGCAAACAGTAGGTATTTCCAGTCCATTTTCAAAGGCTTCAGTTCTTTTTTAAAGTTGGGA  
TCAGTCATATGA CCGGACTTTTGTGAT

*BRCA2* – exon 11/12

12F

AAAAATATCGTCATTGAAATTCAGCCTTAGCTTTTTACACAAGTTGTAGTAGAAAAAC TTCTGTGAGTCAGA  
CTTCATTACTTGAAGCAAAAAATGGCTTAGAGAAGGAATATTTGATGGTCAACCAGAAAGAATAAACTACT  
GCAGATTATGTAGGAAATTATTTGTATGAAAATAATTCAAACAGTACTATAGCTGAAAATGACAAAAATCA  
TCTCTCCGAAAAACAAGATACTTATTTAAGTAACAGTAGCATGTCTAACAGCTATTCCTACCATTCTGATGA  
GGTATATAATGATTGAGGATATCTCTCAAAAAATAAACTTGATTCTGGTATTGAGCCAGTATTGAAGAATGT  
TGAAGATCAAAAAACACTAGTTTTTCCAAAGTAATATCCAATGTAAAAGATGCAAATGCATACCCACAAA  
CTGTAAATGAAGATATTTGCGTTGTGAAAACTTTGTGAA

12R

AATTAAGTTGTGGGTTGCATTTGCATCTTTTACA TTGGATATTACTTTGGAAAAGTGTGTTTTTTGATCT  
TCAACATTCTCAATACTGGCTCAATACCAGAATCAAGTTTATTTTTGAGAGATATCCTGAATCATTATATA  
CCTCATCAGAATGGTAGGAATAGCTGTTAGACATGCTACTGTTACTTAAATAAGTATCTGTTTTTCGGAGA  
GATGATTTTTGTCATTTTCAGCTATAGTACTGTTTGAATTATTTTCATACAAATAATTTCTACATAATCTGC  
AGTATTTATCTTTCTGGTTGACCATCAAAATTCCTTCTCTAAGCCATTTTTTTGCTTCAAGTAATGAAGTCT  
GACTCACAGAAGTTTTTCTACTACAACCTGTGTAAAAAGCTAAGGCTGAATTTTCAATGACTGAATAAGGGG  
ACTGATTTGTGTA ACAGTTGGCAGGACAA

13F

CCATACAACAGCTTGTGTCTTGAATTCGCCTTATCTTTTTACACAAGTTGTATTA AAAAAACTTCTGTGAG  
TCAGACTTGATGACTTGAAGCAGAGAAATGGATTATAGAAGGAATATTTGATGGTCAACCAGAAAGAATAA  
ATACTGCCATTATGTAGGAAATTTTGTATGAAAATAATTCAAACAGGACTATAGCTGAAAATGACA AA  
AATCATCTCTCCGAAAAACCAGATACTTATTTAAGTAACAGTAGCATGTCTAACAGCTATTCCTACCATTCT  
GATGAGGTATATAATGATTCAGGATATCTCTCAAAAAATAAACTTGATTCTGGTATTGAGCCAGTATTGAAG

AATGTTGAAGATCAAAAAAACTAGTTTTTCCAAAGTAATATCCAATGTAAAAGATGCAAATGCATACCC  
ACAAACTGTAAATGAAGATATTTGCGTTGAGGAACCTGTGA ACTACACCTGCTGCTACTCGTCCCAGTCTC  
CGATTCGTCATGAACTTCTTAAAGAGATTTTGCCTGTCTGACGCACGGAACCTTGATCCAGTGGCCAGCCTG  
TCATGCCCTTGATGTTCTGGAGTGCGCGCACGCTACGCTGACAC

13R

CCTATTAGTTTGTGGGTAT GCATTGTCATCTTTACATTGGATATTACTTTGGAAAAGTAGTGTTTTTTTGATC  
TTCAACATTCTTCAATACTGGCTCAATACCAGAATCAAGTTTATTTTTGAGAGATATCCTGAATCATTATAT  
ACCTCATCAGAATGGTAGGAATAGCTGTTAGACATGCTACTGTTACTTAAATAAGTATCTGTTTTTTCGGAG  
AGATGATTTTTGTCAATTTTACAGCTATAGTACTGTTGAATTATTTTCATACAAAATAATTTCTACATAATCTG  
CAGTATTTATCTTTCTGGTTGACCATCAAATATTCCTTCTCTAAGCCATTTTTTTGCTTCAAGTAATGAAGTC  
TGACTCACAGAAGTTTTTCTACTACAACCTGTGTAAAAAGCTAAGGCTGAATTTTCAATGACTGAATAAGGG  
GACTGATTTGT GTAACAAGTTGGCAGGACA

14F

ATAAACTTTTCGTCATTGAAATT CAGCCTTAGCTTTTTACACAAGTTGTAGTAGAAAACTTCTGTGAGTCA  
GACTTCATTACTTGAAGCAAAAAATGGCTTAGAGAAGGAATATTTGATGGTCAACCAGAAAAGAATAAATA  
CTGCAGATTATGTAGGAAATTATTTGTATGAAAATAATTCAAACAGTACTATAGCTGAAAATGACAAAAAT  
CATCTCTCCGAAAAACAAGATACTTATTTAAGTAACAGTAGCATGTCTAACAGCTATTCCTACCATTCTGAT  
GAGGTATATAATGATTCAGGATATCTCTCAAAAAATAAACTTGATTCTGGTATTGAGCCAGTATTGAAGAAT  
GTTGAAGATCAAAAAAACTAGTTTTTCCAAAAGTAATATCCAATGTAAAAGATGCAAATGCATACCCACA  
AACTGTAAATGAAGATATTTGCGTTGA GAAAACTTGTGAAAAA

14R

ACAAAAAGTTTGTGGGTTGCATTTGCATCTTTTACATTGGATATTACTTTGGAAAAGTAGTGTTTTTTTGATC  
TTCAACATTCTTCAATACTGGCTCAATACCAGAATCAAGTTTATTTTTGAGAGATATCCTGAATCATTATAT  
ACCTCATCAGAATGGTAGGAATAGCTGTTAGACATGCTACTGTTACTTAAATAAGTATCTGTTTTTTCGGAG  
AGATGATTTTTGTCAATTTTACAGCTATAGTACTGTTGAATTATTTTCATACAAAATAATTTCTACATAATCTG  
CAGTATTTATCTTTCTGGTTGACCATCAAATATTCCTTCTCTAAGCCATTTTTTTGCTTCAAGTAATGAAGTC  
TGACTCACAGAAGTTTTTCTACTACAACCTGTGTAAAAAGCTAAGGCTGAATTTTCAATGACTGAATAAGGG  
GACTGATTTGT GTAACAGTTTGCCAGGAAAAAA

15F

AAAAACTTTTCGTCATTGAAATTCAGCC TTAGCTTTTTACACAAGTTGTAGTAGAAAACTTCTGTGAGTCAG  
ACTTCATTACTTGAAGCAAAAAATGGCTTAGAGAAGGAATATTTGATGGTCAACCAGAAAAGAATAAATAC  
TGCAGATTATGTAGGAAATTATTTGTATGAAAATAATTCAAACAGTACTATAGCTGAAAATGACAAAAATC  
ATCTCTCCGAAAAACAAGATACTTATTTAAGTAACAGTAGCATGTCTAACAGCTATTCCTACCATTCTGATG  
AGGTATATAATGATTCAGGATATCTCTCAAAAAATAAACTTGATTCTGGTATTGAGCCAGTATTGAAGAATG  
TTGAAGATCAAAAAAACTAGTTTTTCCAAAAGTAATATCCAATGTAAAAGATGCAAATGCATACCCACAA  
ACTGTAAATGAAGATATTTGCGTTGAG AAACTTGTGAAAAA

15R

ACATAAAGTTTGTGGGTTGCATTTGCATCTTTTACATTGGATATT ACTTTGGAAAAGTAGTGTTTTTTTGATC  
TTCAACATTCTTCAATACTGGCTCAATACCAGAATCAAGTTTATTTTTGAGAGATATCCTGAATCATTATAT  
ACCTCATCAGAATGGTAGGAATAGCTGTTAGACATGCTACTGTTACTTAAATAAGTATCTGTTTTTTCGGAG  
AGATGATTTTTGTCAATTTTACAGCTATAGTACTGTTGAATTATTTTCATACAAAATAATTTCTACATAATCTG  
CAGTATTTATCTTTCTGGTTGACCATCAAATATTCCTTCTCTAAGCCATTTTTTTGCTTCAAGTAATGAAGTC

TGACTCACAGAAGTTTTTCTACTACAACCTGTGTAAAAAGCTAAGGCTGAATTTTCAATGACTGAATAAGGG  
GACTGATTTGTGTAACAGTTTGCAGGACAA

16F

AAAAACTTTCGTCTTGAAATTCAGCCTTAGCTTTTTACACAAGTTGTAGTAGAAAAACTTCTGTGAGTCAGA  
CTTCATTACTTGAAGCAAAAAATGGCTTAGAGAAGGAATATTTGATGGTCAACCAGAAAGAATAAACTACT  
GCAGATTATGTAGGAAATTATTTGTATGAAAATAATTCAAACAGTACTATAGCTGAAAATGACAAAAATCA  
TCTCTCCGAAAAACAAGATACTTATTTAAGTAACAGTAGCATGTCTAACAGCTATTCCTACCATTCTGATGA  
GGTATATAATGATTCAGGATATCTCTCAAAAAATAAACTTGATTCTGGTATTGAGCCAGTATTGAAGAATGT  
TGAAGATCAAAAAACACTAGTTTTTCCAAAAGTAATATCCAATGTAAAAGATGCAAATGCATACCCACAAA  
CTGTAAATGAAGATATTTGCGTTGAGAAACTTGTGAAA

16R

ACTTTAAGTTGTGGGTATGCATTTGCATCTTTTACATTGGATATTACTTTGGAAAAGTGTGTTTTTTTGTATC  
TTCAACATTCTCAATACTGGCTCAATACCAGAATCAAGTTTATTTTTGAGAGATATCCTGAATCATTATAT  
ACCTCATCAGAATGGTAGGAATAGCTGTTAGACATGCTACTGTTACTTAAATAAGTATCTGTTTTTTCGGAG  
AGATGATTTTTGTGATTTTTCAGCTATAGTACTGTTTGAATTATTTTCATACAAATAATTTCTACATAATCTG  
CAGTATTTATCTTTCTGGTTGACCATCAAATATTCCTTCTCTAAGCCATTTTTTTGCTTCAAGTAATGAAGTC  
TGACTCACAGAAGTTTTTCTACTACAACCTGTGTAAAAAGCTAAGGCTGAATTTTCAATGACTGAATAAGGG  
GACTGATTTGTGTAACAAGTTGGCAGGACAAA

17R

ACAAAAAGTTTGTGGGTTGCATTTGCATCTTTTACATTGGATATTACTTTGGAAAAACTAGTGTTTTTTTGA  
TCTTCAACATTCTTCAATACTGGCTCAATACCAGAATCAAGTTTATTTTTGAGAGATATCCTGAATCATTAT  
ATACCTCATCAGAATGGTAGGAATAGCTGTTAGACATGCTACTGTTACTTAAATAAGTATCTGTTTTTTCGG  
AGAGATGATTTTTGTGATTTTTCAGCTATAGTACTGTTTGAATTATTTTCATACAAATAATTTCTACATAATC  
TGCAGTATTTATCTTTCTGGTTGACCATCAAATATTCCTTCTCTAAGCCATTTTTTTGCTTCAAGTAATGAA  
GTCTGACTCACAGAAGTTTTTCTACTACAACCTGTGTAAAAAGCTAAGGCTGAATTTTCAATGACTGAATAA  
GGGACTGATTTGTGTAACAGTTGTGCAGGAAAAAC

18F

CCCAAACATCGTCATTGAAATTCAGCCTTAGCTTTTTACACAAGTTGTAGTAGAAAAACTTCTGTGAGTCA  
GACTTCATTACTTGAAGCAAAAAATGGCTTAGAGAAGGAATATTTGATGGTCAACCAGAAAGAATAAATA  
CTGCAGATTATGTAGGAAATTATTTGTATGAAAATAATTCAAACAGTACTATAGCTGAAAATGACAAAAAT  
CATCTCTCCGAAAAACAAGATACTTATTTAAGTAACAGTAGCATGTCTAACAGCTATTCCTACCATTCTGAT  
GAGGTATATAATGATTCAGGATATCTCTCAAAAAATAAACTTGATTCTGGTATTGAGCCAGTATTGAAGAAT  
GTTGAAGATCAAAAAACACTAGTTTTTCCAAAAGTAATATCCAATGTAAAAGATGCAAATGCATACCCACA  
AACTGTAAATGAAGATATTTGCGTTGAGGAACTTGTGAA

18R

CCAAAAAGTTTGTGGGTAGCATTTCATCTTTTACTTGGATATTACTTTGGAAAACTAGTGTTTTTTTGATCT  
TCAACATTCTTCAATACTGGCTCAATACCAGAATCAAGTTTATTTTTGAGAGATATCCTGAATCATTATATA  
CCTCATCAGAATGGTAGGAATAGCTGTTAGACATGCTACTGTTACTTAAATAAGTATCTGTTTTTTCGGAGA  
GATGATTTTTGTGATTTTTCAGCTATAGTACTGTTTGAATTATTTTCATACAAATAATTTCTACATAATCTGC  
AGTATTTATCTTTCTGGTTGACCATCAAATATTCCTTCTCTAAGCCATTTTTTTGCTTCAAGTAATGAAGTCT  
GACTCACAGAAGTTTTTCTACTACAACCTGTGTAAAAAGCTAAGGCTGAATTTTCAATGACTGAATAAGGGG  
ACTGATTTGTGTAACAAGTTGCAGGACAATATTCTGCCCTCTGTGCTACTCTTGCTTTGTGCTTTGTCT

## 15 Seznam zkratek

APC – adenomatous polyposis coli

AT – ataxia telangiectasia

*ATM* – ataxia telangiectasia mutated

BASC – *BRCA1*-associated genome surveillance complex

BL Buffer – Bass/Lead buffer

bp – páru bází (base pair)

*BRCA* – breast cancer

CNS – centrální nervová soustava

CRC – kolorektální karcinom

ČR – Česká republika

ddATP – dideoxyadenosintrifosfát

ddCTP – dideoxycytosintrifosfát

ddGTP – dideoxyguanosintrifostát

ddNTP – dideoxyribonukleotid

ddTTP – dideoxythymosintrifosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FAP – familiární adenomatózní polypóza

GAPPS – gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach

HNPCC – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom

HPV – lidský papilomavirus

*CHEK2* – checkpoint kinase 2

LOF – lost of function

LS – Lynchův syndrom

*MLH* – mutL homolog

MM – Mastermix

*MSH* – mutS homolog

MSI-H – microsatellite instability, high

MSI-L – microsatellite instability, low

NBN – nibrin

NCBI – National Centre for Biotechnology Information

NGS – sekvenování nové generace (next-generation sequencing)

NK – nukleová kyselina

*PALB2* – partner and localizer of *BRCA2*

PBS – Phosphate Buffer Saline

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

PIP3 – fosfatidylinositol-3,4,5-fosfát

PMS – postmeiotic segregation increased

*PTEN* – phosphatase and tensin homologue

*RAD51* – RAD51 rekonbináza

RNA – ribonukleová kyselina

RR – relativní riziko

TBE buffer – Tris Boritan Edta Buffer

*TP53* – tumor protein p53

UV záření – ultrafialové záření