

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Kristýna Bednaříková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Kristýna Bednaříková

Studijní obor: Zdravotní laborant (5345R020)

VYUŽITÍ SEKVENAČNÍCH METOD PŘI VYŠETŘENÍ HEREDITÁRNÍCH NÁDORŮ PRSU A VAJEČNÍKŮ

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Zavoral

PLZEŇ 2020

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kristýna BEDNAŘÍKOVÁ**
Osobní číslo: **Z17B0076P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Využití sekvenčních metod při vyšetření hereditárních nádorů prsu a vaječníků**
Zadávací katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu



Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- NUSSBAUM, Robert L., Roderick R. MCINNES a Huntington F. WILLARD. Klinická genetika. 6. vyd. Praha: Triton, 2004. 492 s. ISBN 8072544756.
- Pitchard, D.J., Korf, B.R. Základy lékařské genetiky, 1. vydání, GALÉN, 2007, 182 s., ISBN 9788072624492.
- ČIHÁK, Radomír. Anatomie. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2016. 512 s. ISBN 978-80-247-4788-0.
- ROKYTA, Richard. Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi. Praha: Grada Publishing, 2015. 712 s. ISBN 978-80-247-4867-2.
- The National Center for Biotechnology Information, [online], dostupné z <https://www.nih.gov/>.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Tomáš Zavoral**
Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **18. června 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2020**



PhDr. Lukáš Štich
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

V Plzni dne 31. ledna 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 30. 4. 2020.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Bednaříková Kristýna

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Využití sekvenačních metod při vyšetření hereditárních nádorů prsu a vaječnicků

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Zavoral

Počet stran – číslované: 46

Počet stran – nečíslované: 19

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 27

Klíčová slova: hereditární syndromy prsu a vaječnicku, predispoziční geny, sekvenační metody, Sangerovo sekvenování, sekvenování nové generace

Souhrn:

Práce se zabývá studiem diagnostiky hereditárních nádorů prsu a vaječnicku pomocí sekvenačních metod. Diagnostika hereditárních nádorů přechází v současnosti na sekvenování nové generace, které se stalo hlavní metodou při diagnostice dědičných predispozic pro vznik karcinomů prsu a vaječnicku. Případný nález patogenní varianty je ověřován metodou přímé sekvenace. Práce se skládá z části teoretické a části praktické. V teoretické části je popsána anatomie prsu a vaječnicku, hereditární syndromy prsu a vaječnicku, karcinom prsu a vaječnicku, polymerázová řetězová reakce, vybrané predispoziční geny (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*) a sekvenační metody (Sangerovo sekvenování, sekvenování nové generace). Praktická část se zaměřuje na návrh primerů a optimalizaci PCR, sekvenaci vybraných úseků genů a ověření patogenní varianty pomocí sekvenačních metod. Tyto technologie nám umožňují analyzovat patogenní varianty, které jsou zodpovědné za vznik dědičných karcinomů prsu a vaječnicku.

Abstract

Surname and name: Bednaříková Kristýna

Department: Department of Rescue, Diagnostics and Public Health

Title of thesis: Utilization of sequencing methods for examination of hereditary breast and ovarian tumors

Consultant: Mgr. Tomáš Zavoral

Number of pages – numbered: 46

Number of pages – unnumbered: 19

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 27

Keywords: hereditary breast and ovarian cancer syndromes, predisposing genes, *sequencing* methods, Sanger Sequencing, Next Generation Sequencing

Summary:

The work deals with the study of the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer syndromes by means of the sequencing methods. Nowadays the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer syndromes makes for the next generation sequencing that has become the main method at the diagnosis of hereditary predispositions for a rise of breast and ovarian cancer syndromes. A potential finding of the pathogenic variant is verified by the direct sequencing method.

The work consists of the theoretical and the practical part. The anatomy of breast and ovarian, hereditary breast and ovarian syndromes, breast and ovarian cancers, polymerase chain reaction, selected predisposing genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*) and sequencing methods (Sanger's sequencing, next generation sequencing) are described in the theoretical part. The practical part is aimed at the proposal of primers and the optimization of PCR, sequencing of selected parts of genes and the verification of the pathogenic variant by means of sequencing methods. These methods enable to analyse pathogenic variants which create conditions for the rise of hereditary breast and ovarian cancer syndromes.

Předmluva

Existuje celá řada faktorů, které se mohou podílet na vzniku karcinomu prsu a vaječníků. V rodinách se mohou vyskytovat nádorová onemocnění, která jsou podmíněná dědičností. Dědičná nádorová onemocnění tvoří pouze malou, ale za to významnou část onkologických onemocnění, představují asi 5–10 % všech nemocných. Cílem práce bylo získat znalosti o metodách sekvenování DNA (přímá sekvenace, sekvenování nové generace), navrhnout primery pro provedení PCR reakce a sekvenaci DNA a poté osekvenovat vybrané exony genů *ATM* a *BARD1* a ověřit přítomnost patogenní varianty v genu *BRCA1*.

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Tomáši Zavoralovi za odborné vedení mé bakalářské práce, za velkou trpělivost při psaní této práce, za poskytování cenných materiálů a rad a metodických pokynů k práci.

Také bych chtěla poděkovat Mgr. Bc. Světluši Chabrové za poskytnutí souhlasu s provedením analýzy anonymizovaných dat na pracovišti Ústavu lékařské genetiky (ÚLG) FN Plzeň.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	11
SEZNAM TABULEK	12
SEZNAM ZKRATEK	13
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1 ANATOMIE PRSU	16
1.1 Stavba prsu	16
1.2 Cévy prsu	17
1.3 Nervy prsu	18
2 ANATOMIE VAJEČNÍKU	19
2.1 Stavba vaječníku	19
2.2 Cévy vaječníku	21
2.3 Nervy vaječníku.....	21
3 HEREDITÁRNÍ KARCINOMY PRSU A VAJEČNÍKU	22
4 NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ PRSU.....	24
4.1 Maligní nádory	24
4.2 Karcinomy in situ	25
4.2.1 Duktální karcinomy in situ – DCIS.....	25
4.2.2 Lobulární karcinom in situ – LCIS	25
4.3 Invazivní karcinomy	25
4.3.1 Invazivní duktální karcinomy.....	25
4.3.2 Invazivní lobulární karcinom.....	25
4.3.3 Medulární karcinom	26
4.3.4 Tubulární karcinom.....	26
4.4 Benigní nádory.....	26
4.4.1 Fibroadenom.....	26
5 NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ VAJEČNÍKU	27
5.1 Maligní nádory vaječníku	27
5.1.1 Epitelové karcinomy	27
5.1.2 Germinální nádory ovaria	27
5.1.3 Nádory z ovariálního stromatu.....	28
5.2 Benigní nádory vaječníku.....	28
6 PREDISPOZIČNÍ GENY	29
6.1 <i>BRCA1</i> a <i>BRCA2</i>	29
6.2 <i>ATM</i>	30

6.3	<i>BARD1</i>	30
7	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	31
7.1	Komponenty reakce	31
7.2	Princip reakce	32
8	METODY SEKVENOVÁNÍ DNA	34
8.1	Maxam – Gilbertova metoda	34
8.2	Sangerova metoda	35
8.2.1	Princip metody	35
8.3	Sekvenování nové generace	36
	PRAKTICKÁ ČÁST	37
9	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	37
9.1	Hlavní cíl	37
9.2	Dílčí cíle	37
10	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	38
11	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	39
12	METODIKA PRÁCE	40
12.1	Izolace DNA	40
12.2	Návrh primerů a optimalizace PCR reakce	41
12.2.1	Návrh primerů	41
12.2.2	Příprava a optimalizace PCR reakce	43
12.2.3	Gelová elektroforéza	45
12.2.4	Purifikace produktů PCR genu <i>ATM</i> a genu <i>BARD1</i>	47
12.2.5	Příprava sekvenační reakce genu <i>ATM</i> a <i>BARD1</i>	48
12.2.6	Purifikace sekvenačních produktů	48
12.3	Analýza patogenní varianty v genu <i>BRCA1</i>	49
12.3.1	Příprava PCR reakce	49
12.3.2	Separace vzorků na gelové elektroforéze	50
12.3.3	Purifikace PCR produktů a sekvenační reakce	51
13	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	53
14	DISKUZE	57
	ZÁVĚR	60
	BIBLIOGRAFIE	61
	SEZNAM PŘÍLOH	64
	PŘÍLOHY	65

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Vizualizace produktů PCR na agarózovém gelu.....	46
Obrázek 2 - Vizualizace produktů PCR reakce exonu 7 genu <i>BRCA1</i>	51
Obrázek 3- BioEdit – výsledky sekvenace exonu 37 genu <i>ATM</i>	53
Obrázek 4 - BioEdit – výsledky sekvenace exonu 40 genu <i>ATM</i>	54
Obrázek 5 - BioEdit – výsledky sekvenace exonu 3 genu <i>BARD1</i>	54
Obrázek 6 - SeqScape v2.1 - výsledky sekvenace vzorku ZCU_2019_2.....	55
Obrázek 7 - BioEdit – výsledek sekvenace vzorku ZCU_2019_2.....	55
Obrázek 8- BioEdit – výsledek sekvenace vzorku ZCU_2019_3.....	56
Obrázek 9 - SeqScape v2.1 - výsledky sekvenace vzorku ZCU_2019_3.....	56

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Sekvence navržených primerů	43
Tabulka 2 - Ředění primerů pro PCR reakci genu <i>ATM</i> a <i>BARD1</i>	43
Tabulka 3 - Složení master mixu pro PCR reakci genu <i>ATM</i> a <i>BARD1</i>	44
Tabulka 4 - Teploty nasedání primerů.....	44
Tabulka 5 - Teplotní profil PCR reakce	45
Tabulka 6 - Příprava master mixu pro sekvenační reakci	48
Tabulka 7 - Teplotní profil sekvenační reakce genu <i>ATM</i> a <i>BARD1</i>	48
Tabulka 8 - Master mix pro PCR reakci genu <i>BRCA1</i>	49
Tabulka 9 - Primery pro sekvenační reakci genu <i>BRCA1</i>	50
Tabulka 10 - Teplotní profil PCR reakce genu <i>BRCA1</i>	50
Tabulka 11 - Master mix pro sekvenační reakci genu <i>BRCA1</i>	51
Tabulka 12- Teplotní profil sekvenační reakce genu <i>BRCA1</i>	52

SEZNAM ZKRATEK

A.....	Adenin
<i>ATM</i>	Ataxia-telangiectasia mutated kinase (kináza indukovaná DNA poškozením)
<i>BARD1</i>	Breast cancer 1 Associated RING Domain 1
<i>BRCA1</i>	Breast cancer 1
<i>BRCA2</i>	Breast cancer 2
<i>BRIP1</i>	Breast cancer 1 – interacting protein 1
C	Cytosin
<i>CDH1</i>	Cadherin 1
<i>CHEK2</i>	Checkpoint kinase 2
dATP	Deoxyadenosine Triphosphate
ddATP	2', 3'-Dideoxyadenosine-5'-Triphosphate
dCTP	Deoxycytidine Triphosphate
ddCTP.....	2', 3'-Dideoxycytidine-5'-Triphosphate
dGTP.....	Deoxyguanosine Triphosphate
ddGTP.....	2', 3'-Dideoxyguanosine-5'-Triphosphate
dTTP	Deoxythymidine Triphosphate
ddTTP	2', 3'-Dideoxythymidine-5'-Triphosphate
ddNTP	Dideoxyribonukleotid
dNTP	Deoxynukleosidtrifosfáty
DCIS	Duktální karcinom in situ
DNA	Deoxyribonukleová kyselina

EDTA Ethylendiamintetraoctová kyselina

EPCAM Epithelial cell adhesion molecule

FN Fakultní nemocnice

G Guanin

LCIS Lobulární karcinom in situ

MLH1 MutL homolog 1

MSH2 MutS homolog 2

MSH6 MutS homolog 6

MUTYH MutY homolog

NGS Next Generation Sequencing

NBN Nibrin

NF1 Neurofibromin 1

NTC No template control

PALB2 Partner and localizer of BRCA2

PCR Polymerázová řetězová reakce

PMS2 Postmeiotic segregation increased 2

PTEN Phosphatase and tensin homolog

STK11 Serine/threonine kinase 11

T Thymin

TP53 Transkripční faktor

ÚLG Ústav lékařské genetiky

ÚVOD

Nádorové onemocnění prsu a vaječníku patří k nejčastějším onemocněním žen. Přibližně 5-10 % karcinomů vzniká na podkladě dědičné nádorové predispozice. Lidé, kteří jsou nosiči těchto patogenních variant, si je tak předávají z generace na generaci. Nosič patogenní varianty má 50 % pravděpodobnost, že danou variantu předá potomkům. Velmi častý je výskyt hereditárního karcinomu prsu a vaječníku. Toto onemocnění vzniká nejčastěji na podkladě patogenní varianty v genu *BRCA1* nebo *BRCA2*. Tyto geny patří mezi vysoce rizikové geny a nosiči patogenních variant jsou vystaveni celoživotnímu riziku, že se u nich nemoc projeví. Karcinomem prsu mohou onemocnět i muži, u nich je ale riziko onemocnění karcinomem nižší. Pohybuje se u patogenní varianty *BRCA2* kolem 8 % a u *BRCA1* kolem 1,2 %. Jako hlavní metoda, která se v posledních letech používá pro diagnostiku hereditárních nádorových syndromů, je testování pomocí sekvenování nové generace (NGS). Sekvenování nové generace se v dnešní době stalo velmi populární metodou, která je využívána jak při diagnostice onemocnění, tak při medicínském nebo biologickém výzkumu. Vedle nových metod se k diagnostice stále využívá i původní metoda přímé sekvenace (sekvenování dle Sangera). Tato metoda je využívána od 70. let 20. století, a ačkoliv ji metody nové generace nahrazují, stále je součástí laboratorních postupů a používá například pro ověření patogenních variant detekovaných metodou NGS.

Tato bakalářská práce se zabývá využitím sekvenačních metod při diagnostice hereditárních syndromů prsu a vaječníků. Je důležité, aby tyto genetické změny byly včas diagnostikovány a mohlo se tak přistoupit k řadě opatření, zabraňujícím vzniku nemoci. Pokud se nemoc vyskytne v rodině a je zjištěna patogenní varianta u nemocného v některém z predispozičních genů, je důležité, aby proběhlo vyšetření i u ostatních členů rodiny, pokud k tomu udělí souhlas. V této práci se nejprve zabýváme teoretickým popisem dané problematiky, v praktické části potom návrhem primerů pro provedení PCR reakce a ověření patogenní varianty ve vybraných genech pomocí přímé sekvenace DNA. Důvodem k sepsání práce byla především aktuálnost daného tématu. Tyto technologie se neustále vyvíjí a pomocí jejich diagnostiky se může včas odhalit patogenní varianta, a tak zabránit vzniku onemocnění.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ANATOMIE PRSU

1.1 Stavba prsu

Prs (mamma) je párový orgán, uložený na přední straně hrudníku, v plném vývoji sahá od 3. do 6. žebra, v horizontální rovině od okraje hrudní kosti do střední čáry axilární, někdy mohou být uvedené hranice posuny v závislosti na velikosti prsu (Dražan, 2006, s. 18). Kůže prsu je světlá a tenká, tím je zapříčiněno, že kožní žíly prosvítají, je hojně inervovaná (Čihák, 2016, s. 647). U dospělé ženy se prs vyskytuje v různých antropologických typech, které se během života postupně mění. V pokročilém věku nastává úbytek tuku a zmenšuje se žlázové těleso prsu (Čihák, 2016, s. 647).

Na vrcholu prsu se nachází dvorec (areola mammae). Průměr dvorce je 3-5 cm, v těhotenství se zvětšuje. Dvorec je pigmentovaný v závislosti na celkové pigmentaci ženy, v graviditě se pigmentace zvyšuje. Kolem obvodu dvorce se nachází drobné hrbolky, které jsou vyvýšeny žlázkami (glandulae areolares), svým složením shodnými s mléčnou žlázou (Čihák, 2016, s. 647). Uprostřed dvorce se nachází prsní bradavka (papilla mammae). Bývá lehce vyvýšená, občas lehce vkleslá, je citlivá na dotykové podráždění. Na hrotu bradavky ústí mlékovody (ductus lactiferi). Mlékovody jsou přiváděny z hloubky ze žlázy, ústí zde přibližně 15-20 otvůrek na vrcholku bradavky, označovaném jako area cribriformis papillae. Bradavka obsahuje mazové žlázy, které svým výměškem ochraňují kůži před macerací mlékem a slinami kojence. Dvorec je tvořen hladkou svalovinou, probíhá zde paprscitě, v bradavce šroubovitě. Na periferii dvorce a na špičce bradavky se svalovina upíná do kůže. To způsobí, že se dvorec smršťuje a vyzdvihuje bradavku (Čihák, 2016, s. 648).

Těleso žlázy (corpus mammae) je tvořeno vlastní žlázou, uschovanou v nitru prsa. Představuje laločnaté, bělošedé a tuhé těleso s nepravidelným povrchem. Těleso nemá okrouhlý tvar a vně tvoří malý processus axillaris. Normálně váží těleso 130 až 200 g. V období laktace se hmotnost zvyšuje na 300–500 g (Čihák, 2016, s. 648).

Mléčná žláza (glandula mammae) je apokrinní žláza, vytvářející u dospělé ženy podklad prsu. Struktura mléčné žlázy se odvíjí od stáří a funkčního stavu organismu ženy. Je tvořena z 15-20 laloků (lobi mammae), uschovaných v tukovém polštáři. Tyto laloky se dále rozbíhají v lalůčky mléčné žlázy (lobulli mammae) tvořené ze žlázových alveolů, tato definitivní stavba žlázy se nazývá terminální duktolobulární jednotka. Terminální duktolobulární jednotka představuje základní hormonálně senzitivní a laktující jednotku. Z každého lalůčku vychází vývody, spojující se z jednoho laloku žlázy v ductus lactifer. V období tvorby a vylučování mléka se na nich nalézají sinusy (sinus lactiferi), kde se hromadí mléko před odchodem z bradavky (Dražan, 2006, 18 str.). Mlékovody jednotlivých laloků se koncentricky sbíhají k prsní bradavce na jejímž vrcholu ústí malými otvory (Dylevský, 2009, s. 20).

K největšímu vývoji mléčné žlázy dochází v těhotenství. Žlázové tubuly se rozrůstají. Jejich konce se rozvětvují do váčků – alveolů. Když žena porodí, zahájí buňky alveolů a tubulů tvorbu mléka. Tukové kapičky mléka se z cytoplazmy epitelů odlučují do mlékovodů žlázy. Po ukončení kojení, se žláza vrací do klidového stavu – sekreční oddíl zůstává zachován. Aktivátorem sekrece mléčné žlázy je prolaktin. Estrogeny napomáhají růstu vývodů a progesteron růst sekrečních úseků žlázy (Dylevský, 2009, s. 20).

1.2 Cévy prsu

Mléčná žláza má bohaté krevní zásobení. Tepny prsu přicházejí jako rr. mammarii mediales z a. thoracica interna, rr. mammarii laterales z a. thoracica lateralis a rr. mammarii laterales z aa. intercostales posteriores v rozsahu žlázy. Prs se dělí na čtyři kvadranty – horní zevní, dolní zevní, horní vnitřní, dolní vnitřní. Cévní zásobení žlázy se liší podle toho, kde se kvadrant nachází. Horní a dolní vnitřní kvadrant je zásobován perforantními větvemi z a. thoracica interna. Dále je horní část zásobena z a. thoracoacromialis a a. thoracica suprema. Zevní kvadranty jsou zásobovány z a. mammae externa a z větví interkostálních arterií (Dražan, 2006, s.18).

Žíly prsu tvoří pod dvorcem kruhovitou síť – žilní drenáž (circulus venosus Halleri). Odtud krev dále proudí podkožně do v. thoracica interna a do v. thoracica lateralis a v hloubce do vv. intercostales (Čihák, 2016, s. 649).

Prs obsahuje bohatou kapilární síť lymfatických cév. Mízní odtok představuje podstatnou roli v radikálním řešení nádorů. Mízní cévy utvářejí pleteně pod dvorcem (plexus subareolaris Sappey) a pod kůží (plexus subdermalis) (Dražan, 2006, s.18). Z plexus subareolaris míří odtok do nodi lymphoidei axillares vedle vasa thoracica lateralis, poté to jsou uzliny vedle lemu musculus pectoralis major, uzliny při jeho vzniku vedoucí mizu do hlubokých nodi lymphoidei parasternales a také kraniálně do nodi lymphoidei supraclaviculares (Roztočil, 2011, s. 37). Z přední a boční části prsu vedou cévy do axilárních lymfatických uzlin, z horní části prsu do apikálních axilárních a subklavikulárních uzlin. Ze středních částí prsu směřuje lymfatická drenáž podél perforátorů krevních cév a. a v. thoracica interna do nitrohrudních parasternálních lymfatických uzlin. Kolem 75-90 % lymfatické drenáže prsu vede do axilárních lymfatických uzlin, 15-20 % spěje parasternálně (Dražan, 2006, s. 18).

1.3 Nervy prsu

Nervy prsu jsou senzitivní a přicházejí z nn. intercostales II. – VI. Při horním lemu se do senzitivní inervace zapojují i nn. supraclaviculares (Čihák, 2016, s. 649). Pro senzitivní inervaci středního segmentu prsu, včetně dvorce a bradavky, jsou hlavní interkostální nervy 3.-5. s převahou 4. mezižeberního nervu (Dražan, 2006, s. 18).

2 ANATOMIE VAJEČNÍKU

2.1 Stavba vaječnicku

Vaječník (ovarium) je párový orgán, má tvar ovoиду a ze stran je zploštělý. Vzhled, tvar a velikost vaječnicku záleží na stáří a funkčním stavu organismu ženy (Roztočil, 2011, s. 18). Vaječník je ženská pohlavní žláza, která tvoří pohlavní hormony, řadí se mezi žlázy endokrinní. Vaječník dále produkuje ženské pohlavní buňky, vajíčka (oocyty) (Čihák, 2016, s. 358).

Délka vaječnicku je 3-5 cm, šířka 1,5-3 cm a tloušťka 1-1,5 cm, této velikosti dosahuje u žen mezi 20. až 30. rokem života. Hmotnost vaječnicku je 6-10 g. Tyto parametry se mohou individuálně měnit (Čihák, 2016, s. 358).

Povrch vaječnicku je šedorůžový. V mládí je jeho povrch hladký, postupem času se mění na hrbolatý vlivem vyklenujících se folikulů s vajíčky. V pokročilém věku ženy se vaječník zmenšuje a jeho povrch se stává svráštělým (Čihák, 2016, s. 358).

Na vaječnicku se popisují jednotlivé strany. Vnitřní plocha, která je přivrácená do dutiny pánve, se nazývá facies medialis. Zevní plocha, která je přivrácena k nástěnnému peritoneu boční stěny pánve, se nazývá facies lateralis. Přední okraj připojený závěsem (mesovarium) na ligamentum latum je pojmenovaný margo mesovaricus. Zde se nachází vstup cévních struktur a nervů (hilum ovarii). Volný zadní okraj se nazývá margo liber (Čihák, 2016, s. 358). Podle polohy vaječnicku k sousedním orgánům se rozlišuje horní pól (extremitas tubaria), který je přivrácený k vejcovodu a dolní pól (extremitas uterina), přivrácený k děloze. Umístění vaječnicku záleží na pozici těla, je velmi pohyblivý. Vaječník je upevněný pomocí mesovaria a ligamenta ovarii propria. U žen, které nerodily (nullipar) se vaječník nachází ve fossa ovarica. Je to prohlubeň, mělká jamka, kterou dorzálně ohraničuje vasa iliaca interna a uterus, kraniálně vasa iliaca externa a ventrálně ligamentum latum uteri. U žen, které rodily, vaječník klesá dozadu, až za průběh vasa iliaca interna, v případě mnohorodiček (multipar) až do tzv. Claudiovy jamky. Vaječník je možno nahmatat per vaginam (Roztočil, 2011, s. 18).

Povrch vaječnicku kryje jednovrstevný kubický epitel, jedná se o původní celomový epitel. Dříve byl označován jako zárodečný epitel, protože měl být zdrojem

pohlavních buněk. Dnes víme, že tomu tak není. Farreova-Waldeyerova čára je makroskopická hranice mezi kubickým epitelem vaječníku a jednovrstevným plochým peritoneálním epitelem. Pod epitelem se nachází vazivová vrstva, tunica albuginea. Vazivo, které vyplňuje celý vaječník, se nazývá stroma ovarii. Stroma ovarii se dá rozdělit na hustší povrchovou vrstvu – kůru (cortex ovarii) a řidší vnitřní dřev (medulla ovarii). V kůře se nacházejí ovariální folikuly (folliculi ovarici), obsahující zárodečné buňky, které jsou v různém stupni vývojového stádia. Medulla ovarii obsahuje hladkou svalovinu, cévy a autonomní nervy. Ovariální folikuly se skládají z malých buněk, které obklopují vajíčko a zrají společně s jeho vývojem (Čihák, 2016, s. 358). Jejich velikost je na počátku 30-40 μm , vajíčko se nachází uprostřed (folliculi ovarii primarii). Jejich množství je kolem 300-400 000, tento stav zůstává zachován až do puberty. V období puberty se vlivem hormonů zahajuje jejich zráním. Folikuly zrají souběžně, vaječník obsahuje folikuly různého stupně vývoje. Vícevrstevný vazivový obal vajíčka tvořený kubickými buňkami se nazývá theca folliculi. Dalším vývojem se ve folikulu tvoří dutina, která obsahuje excentricky uschovaný oocyt (antrum folliculi). Dutina je vyplněná tekutinou, nazývanou liquor folliculi. 4-5 vrstev folikulárních buněk tvoří tzv. membrana granulosa, kterou pokrývá theca folliculi. Theca folliculi se skládá ze dvou vrstev – theca folliculi interna a theca folliculi externa. Útvar, který je takto složený se nazývá dozrávající či zralý folikul (folliculus ovaricus vesiculosus, Graafův folikul) (Roztočil, 2011, s. 19).

Zralý oocyt se řadí k největším buňkám v lidském těle. Jeho velikost je 120-150 μm , je uschované v membrana granulosa. Tvoří v ní vyvýšeninu zvanou cumulus oophorus. Zralý Graafův folikul vyklenuje povrch vaječníku, následně praská a vajíčko je spolu s folikulární tekutinou vyplaveno k břišnímu ústí vejcovodu. Zde je zachyceno pomocí fimbriae tubae uterinae a dopraveno do vejcovodu (Roztočil, 2011, s. 19). Tomuto procesu se říká ovulace. Obvykle se dostaví v půlce menstruačního cyklu. Během života plodné ženy, dojde průměrně k 450 ovulacím. Po 3-4 dnech po ovulaci se prasklý folikul mnohonásobně zřasí a vytvoří se žluté tělísko – corpus luteum. Jedna z vrstev buněk stěny folikulu se změní na luteinové buňky, který obsahují žlutý pigment. Tyto buňky tvoří hormon žlutého tělíska, který se nazývá progesteron. Pokud je vajíčko oplozeno, žluté tělísko je hormonálně aktivní až do 4. měsíce gravidity. Poté funkci žlutého tělíska přebírá placenta.

Když vajíčko oplozené není, žluté tělísko se přemění na vazivovou vrstvu – bílé tělísko (corpus albicans). Bílé tělísko neprodukuje hormony (Dylevský, 2009, s. 16).

2.2 Cévy vaječníku

Tepny vaječníku jsou přiváděny dvěma zdroji. Aorta abdominalis vydává párovou a. ovarica, která je paralelou a. testicularis u muže, mají podobný průběh v retroperitoneu. A. uterina vydává k vaječníku ramus ovaricus. Tyto větve jsou spojeny v tepenné ovariální arkádě. Vystupuje z ní 10-12 tepenných větví do hilu ovaria (Čihák, 2016, s. 365).

Žilní krev se sbírá do vena ovarica, vpravo ústí do vena cava inferior a vlevo do vena renalis sinistra. Menší množství krve odtéká do děložních žil (Čihák, 2016, s. 365).

Mízní cévy z vaječníku se sbírají vedle vasa ovarica do nodi lumbales (Čihák, 2016, s. 365).

2.3 Nervy vaječníku

Vaječník obsahuje autonomní vlákna sympatická, parasympatická a senzitivní. Autonomní vlákna jsou přiváděna z plexus coeliacus a z plexus mesentericus inferior. Senzitivní vlákna vstupují do míšních segmentů L1-L3. Nervy jsou přiváděny do ovaria jako plexus ovaricus (Čihák, 2016, s. 365).

3 HEREDITÁRNÍ KARCINOMY PRSU A VAJEČNÍKU

V rodinách se mohou vyskytovat nádorová onemocnění, která jsou podmíněná dědičností. Dědičná nádorová onemocnění tvoří pouze malou, ale za to významnou část onkologických onemocnění, představují asi 5–10 % všech nemocných. Vliv na vznik onemocnění má přenos patogenní varianty určitého predispozičního genu. Důležité je tyto patogenní varianty v nádorových predispozičních genech identifikovat z důvodů jak prognostických, tak i prediktivních. Lidé, kteří jsou nosiči těchto patogenních variant, mají vysoké celoživotní riziko, že u nich nemoc propukne v mladém věku. Příčinou vzniku onemocnění je přenos zárodečné patogenní varianty inaktivující jednu z alel daného genu. Následně může dojít k inaktivaci druhé alely, čímž je gen vyřazen z funkce. Tento typ dědičnosti nádorové predispozice je autozomálně dominantní. Pozornost je věnována hlavně karcinomu prsu, vaječníku a endometria (Cibula, Petruželka, 2009, s. 69; Staněk, Tesařová, Gürlich, 2017, s. 46).

V dnešní době je známo několik predispozičních genů, jejichž patogenní varianty zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu a ovaria. Mezi vysoce rizikové geny způsobující vznik nádoru prsu, patří například geny *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, *TP53*. Mezi geny středního rizika jsou řazeny například geny *BARD1*, *BRIP1*, *NBN* či geny *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *MUTYH*, *EPCAM*. (Klinická onkologie, 2019, s. 2S6). Další skupina genů již představuje menší riziko vzniku onemocnění. Tato skupina se nazývá nízce penetrantní geny. Nízce penetrantní geny nemají klinické využití (Cibula, Petruželka, 2009, s. 69; Staněk, Tesařová, Gürlich, 2017, s. 46).

Karcinom prsu a vaječníků je nejčastěji zapříčiněn germinálními patogenními variantami v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Patogenní alterace těchto genů významně podněcuje riziko vzniku karcinomu. Patogenní varianty genu *BRCA1* jsou zodpovědné asi za 70 % případů, genu *BRCA2* za 20 % případů. Potomci nosičů mají 50 % šanci, že patogenní variantu zdědí. V ostatních případech jsou důvodem onemocnění patogenní varianty v genech se střední penetrancí, tyto varianty jsou relativně vzácné. U hereditárních nádorů nemoc vzniká o 10–15 let dříve než u sporadických. Nosičky patogenních variant, které jsou ve věku 25–29 let, by měly být vyšetřované v půlročních intervalech. Na základě rodinné anamnézy a přítomnosti

dědičných patogenních variant, genetik vyhodnotí možná rizika. Může být doporučena profylaktická mastektomie, která je vhodná u genů vysokého rizika, kdy je vznik onemocnění velmi pravděpodobný. U karcinomu ovarií může být preventivně provedena profylaktická adnexektomie. Obecně mají hereditární nádory lepší prognózu než nádory sporadické. (Cibula, Petruželka, 2009, s. 69; Staněk, Tesařová, Gürlich, 2017, s. 46).

4 NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ PRSU

Karcinom prsu patří mezi nejčastější nádorové onemocnění žen. Ovlivňuje všechny oblasti života ženy, postihuje její rodinný život a tím zasahuje do celé společnosti. Dopady jsou závažnější u žen, u kterých je nižší věk v době diagnózy. Od nepaměti jsou prsa znakem ženské krásy a ženství, proto onemocnění vyvolává hluboké city a pocity, jak u nemocných žen, tak u jejich okolí. (Abrahamova, 2019, s. 13)

Každý rok se po celém světě vyskytne více než 2 miliony nových případů této nemoci. Počet narůstá v mnoha zemích o 1-2 % ročně. I u nás je výskyt zhoubného nádoru prsu nejčastější nález u žen. Během posledních 20 let narostl počet nových případů o 60 %. V České republice se každoročně objeví zhruba 6 000 nových případů (www.mammacentrum.cz/; Abrahamova, 2019, s. 30). Četnost výskytu karcinomu prsu se zvyšuje s věkem. Po každé dekádě se riziko zdvojnásobuje až do menopauzy a po 50. roce života je zvyšování incidence každoročně dramatické. Ačkoliv je v dnešní době, hlavně v raných stádiích, léčba karcinomu prsu velmi úspěšná, přesto zůstává toto onemocnění i nadále nejčastější onkologickou příčinou úmrtí u žen (Abrahamova, 2019, s. 30).

Nádor prsu může být diagnostikován jako onemocnění sporadické nebo dědičně podmíněné. Častější forma, kterou nalézáme u žen je forma sporadická, vznikající v důsledku nahromadění somatických patogenních variant v buňkách prsní žlázy. Dědičně podmíněné formy nádoru prsu představují 15-20 % mamárních karcinomů. Rozdělují se na nádory familiární a nádory hereditární. V případě familiárních forem je v rodině vyšší výskyt nádorového onemocnění, ale bez zřejmé genetické příčiny (Staněk, Tesařová, Gürlich, 2017, s. 46).

4.1 Maligní nádory

V těle vzniká celá řada různých typů buněk. Normální zdravé buňky se dělí a tvoří nové podle potřeb organismu. Může nastat situace, kdy se buňky začnou dělit a vznikat nové, i bez iniciativy organismu. Tvoří se tak nově vznikající útvar, který se nazývá nádor (MOU.CZ, 2009).

Maligní nádory jsou charakteristické tím, že jsou neostře ohraničené a rychle rostoucí, šíří se do okolních tkání, které ničí (takzvané místní šíření nádoru).

Následně může dojít k narušení stěny cév a nádorové buňky se šíří dále do organismu cévní a mízní soustavou. Pokud v určitém místě panují vhodné podmínky pro jejich další dělení, vznikají metastázy (MOU.CZ, 2009).

4.2 Karcinomy in situ

Tyto nádory náleží mezi karcinomy neinvazivní. Jejich epitelové buňky mají některé změny podobné karcinomu, tyto změny nepřesahují bazální membránu epitelu. Rozdělují se na duktální a lobulární (Dražan, 2006, s. 20-21).

4.2.1 Duktální karcinomy in situ – DCIS

Duktální karcinomy in situ mají nádorově změněný epitel v duktech, tvoří se ve vývodech prsu. V některých případech se dají nahmatat. Tento typ nádoru nemá schopnost metastazovat. Duktální karcinom in situ se může zvrhnout v invazivní karcinom prsu. Je diagnostikovatelný pomocí mamografie (Dražan, 2006, s. 20-21).

4.2.2 Lobulární karcinom in situ – LCIS

Lobulární karcinom in situ se objevuje hlavně u žen v menopauze. Je často odhalen náhodně při biopsii z jiných důvodů, bývá asymptomatický. Je velmi špatně diagnostikovatelný pomocí mamografu. Doba, za kterou by se mohl stát invazivním karcinomem je 15-20 let (Dražan, 2006, s. 20-21).

4.3 Invazivní karcinomy

Existuje několik kategorií, tyto kategorie se od sebe liší histologickým obrazem a typem růstu nádoru (Dražan, 2006, s. 20-21).

4.3.1 Invazivní duktální karcinomy

Tyto karcinomy představují přibližně 75 % invazivních nádorů. Jsou specifické šedobělavými tuhými ložisky s nepravidelným ohraničením. Nádor se tvoří v mléčných vývodech, nádorové buňky penetrují přes stěnu vývodů a napadají okolní tukovou tkáň. Metastázy se mohou tvořit v kostech, játrech, plicích a mozku (Dražan, 2006, s. 20-21).

4.3.2 Invazivní lobulární karcinom

Tento karcinom se vyskytuje v 6-8 % případů. Oblast výskytu je v horních zevních kvadrantech prsu. Jeho rozměry kolísají od několika milimetrů až po zasáhnutí celého prsu. Může metastazovat do meningeálního prostoru, GIT, retroperitonea, ovarií a dělohy (Dražan, 2006, s. 21).

4.3.3 Medulární karcinom

Medulární karcinom se objevuje v 8 % případů. Tento karcinom je jasně ohraničený a má ovoidní formu (Dražan, 2006, s. 22).

4.3.4 Tubulární karcinom

Tubulární karcinom se vyskytuje velmi zřídka, tvoří 1-4 % případů. V současnosti je řazen spíše do kategorie tubuloduktálních karcinomů. Pokud se jedná o samotný tubulární karcinom, rozměry nádoru jsou menší než 1 cm a nejsou zasazeny axilární lymfatické uzliny, má tento typ karcinomu velmi dobrou prognózu (Dražan, 2006, s. 22).

4.4 Benigní nádory

Benigní neboli nezhoubné nádory mají většinou ostré ohraničení, rostou pomalu a netvoří metastázy. Jsou nebezpečné tím, že mohou při svém růstu ohrožovat jiné důležité orgány, na které mohou tlačit. Léčba bývá chirurgická (MOU.CZ, 2009).

4.4.1 Fibroadenom

Tento typ nádoru je nejčastějším benigním nádorem prsu. Je diagnostikován u žen mezi 25. až 35. rokem. Jeho rozměry jsou 2-4 cm. Přesahuje-li velikost 10 cm, označuje se jako obrovský fibroadenom. Je ohraničený a pohyblivý oproti okolí (Dražan, 2006, s. 20).

5 NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ VAJEČNÍKU

Ovariální karcinomy dlouhodobě patří mezi nejčastější nádory ženských pohlavních orgánů a zároveň mezi nádory, které zaujímají první místa v úmrtí žen. Je to z důvodu diagnostiky v pozdním stádiu, a tudíž zhoršené prognózy nemoci. Riziko onemocnění stoupá s rostoucím věkem ženy. V průběhu života ovariálním karcinomem onemocní asi 1-2 % žen. Dědičně podmíněných je asi 5-10 % případů. Propuknutí nemoci bylo také častěji pozorováno u žen, které mají v rodinné anamnéze výskyt hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (Lynchův syndrom) (Adam, Vorlíček, 2004, s. 231-232).

5.1 Maligní nádory vaječnicku

Zhoubné maligní onemocnění vaječnicků tvoří velmi heterogenní skupinu chorob. V ovariální tkáni se nachází řada buněk, ze kterých může vzniknout nádor. Nejčastěji vznikají karcinomy ovaria ze zárodečného epitelu, nazývají se nádory epitelové. Tento druh karcinomu se u žen vyskytuje především po 50. roce života. Mezi další typy karcinomů se řadí germinální ovariální nádory a nádory z buněk ovariálního stromatu. Tyto typy se vyskytují u žen mladšího věku. Ostatní typy karcinomů jsou velmi vzácné (Adam, Vorlíček, 2004, s. 231).

5.1.1 Epitelové karcinomy

Rozdělují se do skupin podle histologické charakteristiky. Patří mezi ně například nádory serózní, mucinózní, endometriální, nádor z jasných buněk a Brennerův tumor.

Prognóza se odvíjí od stádia ovariálního karcinomu. Karcinomy s nižším stádiem mají celkem příznivou prognózu. V případech, kdy jsou pacientky už v pokročilejším stádiu onemocnění a léčba byla zprvu efektivní, většinou dochází k recidivě. Pacientku, u které došlo k recidivě, je téměř nemožné vyléčit. V tomto případě je léčba paliativní a jejím účelem je prodloužení nebo zkvalitnění života pacientky (Adam, Vorlíček, 2004, s. 238).

5.1.2 Germinální nádory ovaria

Tento typ nádorů se objevuje u mladších žen. Výskyt je kolem 5 %. Nejčastěji se vyskytujícím typem nádoru patřícím do této skupiny je dysgerminom a nezralý teratom. Prognóza je závislá na klinickém stádiu karcinomu, při správné léčbě je možné 5leté přežití až u 90 % žen (Adam, Vorlíček, 2004, s. 239).

5.1.3 Nádory z ovariálního stromatu

Karcinomy tohoto typu vznikají z buněk mezenchymového stromatu vaječ-
níků. Nejrozšířenějším typem karcinomu, který patří do této skupiny je karcinom
z buněk granulózy. Tento druh karcinomu se vyskytuje u žen po menopauze. Může
zde docházet k recidivám po 20 letech od první léčby (Adam, Vorlíček, 2004, s. 239;
Novotný, Vítek, Kleibl, 2006, s. 55).

5.2 Benigní nádory vaječníku

Do této skupiny patří nepravé nádory, cysty a pravé benigní nádory. Při dia-
gnostikování nádoru může být obtížné rozlišit, o jaký druh se jedná. Jestli jde o be-
nigní nádor, hraniční nádor, potenciálně maligní nádor, prekancerózu nebo jasně
maligní nádor. Protože jsou tyto nádory volně uložené v intraabdominálním prostoru
a většinou rostou dlouho bez příznaků, mohou se symptomy objevit, až když doros-
tou do značných rozměrů. Mezi symptomy patří zvětšování břicha, nepravidelné kr-
vácení, příznaky estrogenizace, jako akutní břišní příhoda při jejich ruptuře, hemo-
peritoneu a torzi. Vyšetření pacientky probíhá na základě osobní anamnézy a jejího
klinického stavu, dále palpačního nálezu, ultrazvukového vyšetření a stanovení sé-
rových hladin hormonů a nádorových markerů. Léčba poté spočívá v pravidelných
kontrolách pacientky nebo je nádor chirurgicky odstraněn (Roztočil, 2011, s. 262).

6 PREDISPOZIČNÍ GENY

6.1 *BRCA1* a *BRCA2*

Geny *BRCA1* a *BRCA2* kódují proteiny, které zabraňují vzniku nádoru. Proteiny tohoto typu pomáhají chránit buňky před příliš rychlým a nekontrolovatelným růstem a dělením. Geny *BRCA1/BRCA2* se podílí na opravě poškozené DNA. V jádrech mnoha typů běžných buněk se proteiny *BRCA1/BRCA2* spolu s několika dalšími proteiny podílí na opravách zlomů v DNA. Tyto zlomy mohou být způsobeny přírodní nebo zdravotnickou radiací nebo dalšími vlivy životního prostředí a také dochází k jejich vzniku, když si chromozomy vyměňují genetický materiál v přípravné fázi dělení buňky. Tím, že pomáhají při opravě DNA, sehrávají proteiny *BRCA1* a *BRCA2* důležitou roli v udržení stability genetické informace buňky (přeloženo a upraveno dle www.nlm.nih.gov).

Výzkum ukazuje, že protein *BRCA1* také reguluje aktivitu dalších genů a hraje zásadní roli v embryonálním vývoji. K uskutečnění těchto funkcí interaguje protein *BRCA1* s mnoha dalšími proteiny, včetně dalších nádorových supresorů a proteinů, které regulují dělení buňky. Také protein *BRCA2* má v buňkách i další funkce. Například může pomáhat regulovat cytokinezi v průběhu buněčného dělení (přeloženo a upraveno dle www.nlm.nih.gov).

Výzkumy odhalily více než 1800 patogenních variant v genech *BRCA1/BRCA2*. Řada z těchto variant je spojena se zvýšeným rizikem výskytu rakoviny prsu jak u mužů, tak u žen, tak i s několika dalšími typy rakoviny. Tyto patogenní varianty jsou přítomny v každé buňce a mohou být přenášeny z generace na generaci. Avšak, ne u každého, kdo zdědí patogenní variantu, dojde ke vzniku rakoviny. Ke zvýšení rizika vzniku rakoviny přispívají i další genetické vlivy, faktory prostředí a životní styl konkrétní osoby (přeloženo a upraveno dle www.nlm.nih.gov).

Patogenní varianty genů *BRCA1/BRCA2* také zvyšují riziko rakoviny vaječníků. V případě genu *BRCA1* je 35–60 % pravděpodobnost vzniku rakoviny vaječníků, oproti 1.6 % u běžné populace, ženy s patogenní variantou v genu *BRCA2* mají přibližně 12-25 % celoživotní riziko vzniku rakoviny vaječníků. Patogenní varianty genů *BRCA1/BRCA2* rovněž zvyšují riziko několika dalších typů rakoviny

včetně rakoviny slinivky břišní a tlustého střeva (přeloženo a upraveno dle www.nlm.nih.gov).

6.2 ATM

Gen *ATM* zajišťuje tvorbu proteinu, který se nachází primárně v buněčném jádře, kde se podílí na kontrole růstu a dělení buňky. Tento protein také hraje důležitou roli v běžném vývoji a činnosti několika tělesných systémů, včetně nervového a imunitního. Navíc tento protein pomáhá buňkám rozpoznat poškozené vlákno DNA. DNA může být poškozena toxickými látkami, chemikáliemi nebo zářením. K poškození DNA dochází i přirozenou cestou, když si chromozomy vyměňují genetický materiál během buněčného dělení (přeloženo a upraveno dle www.nlm.nih.gov).

Opravu DNA protein ATM koordinuje aktivací enzymů, které zpevní porušené vlákno. Účinná reparace poškozené DNA napomáhá udržovat stabilitu genetické informace buňky. Díky ústřední roli v dělení buněk a opravě DNA je protein ATM v popředí zájmu výzkumu rakoviny (přeloženo a upraveno dle www.nlm.nih.gov).

6.3 BARD1

Tento gen kóduje protein, který interaguje s N-terminalní oblastí proteinu BRCA1. Kromě schopnosti vázat BRCA1 in vivo a in vitro, sdílí homologii se dvěma nejvíce konzervovanými oblastmi BRCA1, kterými jsou N – terminal RING motif a C-terminal BRCT domain. RING motif je na cystein bohatá sekvence, která se často vyskytuje v různých proteinech regulujících buněčný růst včetně genů, potlačujících vznik nádoru. Vzájemná interakce BARD1/BRCA1 je narušována patogenními substitucemi aminokyselin v BRCA1, což naznačuje, že struktura stabilního komplexu mezi těmito proteiny může být zásadním aspektem nádorové suprese proteinu BRCA1 (přeloženo a upraveno dle www.nlm.nih.gov).

7 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Princip polymerázové řetězové reakce (PCR) v roce 1983 navrhl a rozpracoval Kary Mullis. V roce 1993 za svojí práci obdržel Nobelovu cenu.

Metoda PCR je založená na rychlém zmnožení (amplifikaci) vybraného úseku DNA. Slouží především k získání dostatečného množství materiálu pro další analýzu. Izolovaná DNA obsahuje cílovou sekvenci, kterou chceme dále analyzovat, ovšem pouze v malém množství. PCR metoda nám umožní si tento konkrétní úsek sekvence vybrat a namnožit. Metoda se dále využívá např. při diagnostice infekčních nemocí, analýze genové exprese, identifikaci dědičných chorob, vnášení mutací do vzorků a dalších (www.labguide.cz; Cibula, Petruželka, 2009, s. 62).

Vlastní reakce probíhá v thermocykleru. Je to přístroj, ve kterém je možné naprogramovat teplotní profil v rozsahu 4–100 °C a umožňující rychlý přechod mezi teplotami (tzv. ramping). Během reakce dochází k cyklickému střídání teplot (www.labguide.cz; Cibula, Petruželka, 2009, s. 62).

7.1 Komponenty reakce

Mezi komponenty reakce patří templátová DNA, primery, DNA polymeráza, deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP), pufr, MgCl₂, H₂O, případně další aditiva.

Templátová DNA obsahuje cílový úsek, který chceme namnožit. Vzorek nesmí být kontaminován jinou DNA, která by se mohla v průběhu reakce namnožit, a výsledek vyšetření by tak byl zkreslen. Nesmí obsahovat látky, které by mohly inhibovat DNA polymerázu (např. heparin, ethanol, EDTA) (www.labguide.cz; Cibula, Petruželka, 2009, s. 62).

Primery jsou krátké oligonukleotidy, které se skládají obvykle z 20–25 nukleotidů. Označují se jako forward a reverse. Jsou komplementární k sekvenci na koncích amplifikovaného úseku a ohraničují tak amplifikovanou oblast. Primery by měly v daném páru obsahovat srovnatelný počet GC a AT párů. Jsou důležité pro správné provedení PCR reakce. Od přisedlých primerů je zahájena syntéza DNA (www.labguide.cz; Cibula, Petruželka, 2009, s. 62).

DNA polymeráza je termostabilní enzym, který se připojuje na 3' konce primerů odkud začíná syntetizovat nové vlákno ve směru 5' → 3' podle templátové DNA na základě komplementarity bází. Během reakce dochází k cyklickým změnám teploty, které umožňují denaturaci DNA, nasedání primerů a syntézu DNA. Jedním z běžně používaných typů polymerázy je *Taq* polymeráza, původně izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Tyto termofilní bakterie obývají horké prameny a díky tomu není termostabilní *Taq* polymeráza z ní izolovaná inaktivována při vyšších teplotách (www.labguide.cz; Cibula, Petruželka, 2009, s. 63).

Pro reakci PCR se používá směs deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP). Obsahuje dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP jsou poté připojovány na základě komplementarity bází k templátové DNA (www.labguide.cz).

PCR pufr je komponenta reakce, která zajišťuje stabilní pH, koncentraci solí a obsahuje látky pro stabilizaci a aktivitu DNA polymerázy (www.labguide.cz; www.botanika.bf.jcu.cz).

Koncentrace $MgCl_2$ je závislá na množství dNTP. Aby byla reakce specifická, koncentrace $MgCl_2$ musí být vyšší než koncentrace dNTP. Hořečnaté ionty jsou zásadní pro správné fungování *Taq* polymerázy (www.labguide.cz; www.botanika.bf.jcu.cz).

H_2O se používá pro doplnění reakce na výsledný objem (www.labguide.cz).

7.2 Princip reakce

PCR je založená na denaturaci, annealingu a elongaci, tyto kroky se cyklicky opakují, obvykle 30 – 40x (www.labguide.cz).

Denaturace je proces, při kterém vlivem zvýšené teploty dochází k narušení vodíkových můstků ve dvouvláknové molekule DNA a k rozvázání této dvoušroubovice. Vytváří se tak dvě nově vzniklé jednovláknové molekuly DNA. Úvodní denaturace probíhá při teplotě 94-98 °C a trvá 1-10 minut. Tento krok je nezbytný hlavně u genomové DNA kvůli její délce. Počáteční denaturace musí být dostatečně dlouhá, aby se dvouřetězcová molekula DNA zcela rozpletla. V dalších cyklech již reakce obsahuje kratší templátovou DNA, vzniklou v předchozích cyklech, a proto

stačí kratší časy denaturace (20–30 sekund) (www.labguide.cz; Cibula, Petruželka, 2009, s. 63).

V dalším kroku dochází k nasednutí primerů (tzv. annealing). V této části se teplota sníží na 50-65 °C na dobu obvykle okolo 20-45 sekund, což umožní nasednutí (hybridizaci) primerů na určitá místa DNA. Na tyto úseky se potom váže DNA polymeráza. Teplota, která se při hybridizaci nastaví, musí být vhodně zvolená pro použitý pár primerů. Při nízkých teplotách může docházet k nespecifickému navázání primerů a při vysoké teplotě mohou primery málo hybridizovat a nevznikne dostatečné množství produktu (www.labguide.cz; Cibula, Petruželka, 2009, s. 63).

Elongace neboli syntéza DNA je samotná syntéza nového vlákna DNA podle templátové DNA. Elongace probíhá při teplotě 72-80 °C, její trvání závisí na velikosti amplifikovaného úseku (obvykle 30 s až 1 minuta) (www.labguide.cz; Cibula, Petruželka, 2009, s. 63).

Na konci dochází k finální elongaci, která probíhá při teplotě 72-80 °C a trvá 5–15 minut. Finální elongace zajistí, že jsou všechny produkty plně dosyntetizovány (www.labguide.cz; Cibula, Petruželka, 2009, s. 63).

Posledním krokem je ochlazení reakce na teplotu 4–15 °C. Výsledkem reakce jsou miliardy kopií cílové sekvence (www.labguide.cz; Cibula, Petruželka, 2009, s. 63).

8 METODY SEKVENOVÁNÍ DNA

Sekvenační metody poskytují informaci o pořadí nukleotidů ve vybraném úseku nukleové kyseliny (tzv. primární struktura polynukleotidového řetězce). Cílem sekvenačních metod je tedy získat informaci o pořadí nukleotidů v cílovém úseku DNA, případné změny mohou souviset s geneticky podmíněnou chorobou. Sekvenování dále umožňuje vyhledávat repetitivní sekvence, pozice a sekvence genů u různých dalších organismů a hledat homologii těchto genů s genovou výbavou člověka (Beránek, 2016, s. 129).

Existuje termín sekvenování *de novo*, který znamená, že dochází k prvnímu sekvenování u vybraného druhu, sekvence tedy není známa. Opačným případem je tzv. komparativní sekvenování (resekvenování), kdy se porovnávají sekvence DNA vyšetřovaného vzorku s referenčními sekvencemi, které jsou dostupné ve veřejných databázích. Cílem je zjistit, zda se zde vyskytly zárodečné nebo somatické patogenní varianty nebo alelové varianty, které souvisí s etiopatogenezí geneticky podmíněných onemocnění. Sekvenační metody jsou využívány i pro potvrzení výsledků z jiných molekulárně genetických metod (Beránek, 2016, s. 129).

Mezi klasické metody sekvenování DNA patří Maxam-Gilbertovo degradační sekvenování a Sangerovo syntetické sekvenování. Přibližně od roku 2005 se začaly objevovat metody sekvenování druhé generace (tzv. next generation sequencing, NGS) (Beránek, 2016, s. 129).

8.1 Maxam – Gilbertova metoda

Metoda patří mezi klasické metody sekvenování. Byla vyvinuta v roce 1977 Allanem Maxamem a Walterem Gilbertem. Je založená na chemickém štěpení jednotlivých nukleotidů. Analýza probíhá ve čtyřech zkumavkách, v každé zkumavce dochází ke štěpení jen daných nukleotidů. Výsledkem jsou různě dlouhé fragmenty DNA, které jsou zakončené v místě, kde se nachází daný nukleotid. Poté následuje elektroforéza vzniklých fragmentů v polyakrylamidovém gelu k určení jejich délky. Analýzou délky fragmentů poté byla určena sekvence daného úseku DNA (www.la-bguide.cz).

Vzhledem k toxicitě použitých chemikálií a vysoké teplotě nutné pro degradaci DNA nebyla metoda automatizována a v dnešní době již není využívána, byla nahrazena novějšími metodami (Beránek 2016, s. 132).

8.2 Sangerova metoda

Metoda byla navržena v roce 1977 Frederickem Sangerem. Tato technika je založená na syntetickém sekvenování. Sangerova metoda je založena na replikaci DNA a využívá podobný princip jako PCR. Na rozdíl od PCR se používá jen jeden primer a díky tomu dochází k syntéze jen jednoho řetězce v jednom směru. Jedná se o enzymovou metodu, jejímž principem je enzymově katalyzovaná terminace syntézy DNA po začlenění dideoxynukleotidu do nově vznikajícího vlákna (Beránek, 2016, s. 133).

8.2.1 Princip metody

Cílový úsek DNA je vybrán jako matrice pro vznik komplementárního vlákna. Na jednovláknovou DNA se připojuje sekvenační primer (obvykle 15-25 bp dlouhý). Poté probíhá syntéza DNA, při které se do nově vznikajícího vlákna zabudují deoxynukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a jeden z dideoxynukleotidů (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Pokud se do řetězce začlení dideoxynukleotid, který nese 3'-OH skupinu, DNA polymeráza nemůže do vznikajícího vlákna připojit další nukleotid a syntéza nového řetězce DNA se zastaví (nazývají se jako tzv. terminátory polymerace). Vznikají tak fragmenty, které mají různou délku. Na konci fragmentů jsou připojené dideoxynukleotidy, které jsou značené buď fluorochromy nebo radioaktivně. Délka fragmentu společně s dideoxynukleotidem nám poskytuje informaci o sekvenci nukleotidů v cílové DNA (www.labguide.cz; Beránek, 2016, s. 133).

Analýza probíhala ve čtyřech vzorcích, které jsou umístěny do čtyř zkumavek. Ve zkumavkách je směs cílové DNA, primeru, nukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a jednoho z dideoxynukleotidů a DNA polymerázy. V jednotlivých vzorcích se poté určuje pořadí daného nukleotidu. Délka fragmentů se zjišťuje pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Na gel se nanese všechny čtyři vzorky a po rozdělení fragmentů následuje odečet délky jednotlivých fragmentů. Umístění fragmentů je shodné s umístěním nukleotidů v cílovém vzorku (www.labguide.cz).

Na rozdíl od Maxam-Gilbertovy metody byla Sangerova metoda automatizována a v současnosti se provádí v jedné zkumavce. Je založená na fluorescenčně značených ddNTP, kdy každý dideoxynukleotid má své barevné značení. Díky tomu lze jednotlivé ddNTP detekovat. Analýza probíhá kapilární elektroforézou a výsledkem je sekvenogram (www.labguide.cz).

8.3 Sekvenování nové generace

Metody sekvenování nové generace jsou založené na principu, který umožňuje paralelně sekvenovat velké množství cílů najednou. Lze se setkat i s dalším označením jako masivně paralelní nebo hluboké sekvenování. Všechny tyto pojmy popisují technologii sekvenování DNA, která způsobila revoluci v genomickém výzkumu. Dříve trvalo mnoho let než laboratoře osekvenovaly celý lidský genom, dnes je tomu jinak. Díky této metodě, se zkrátil čas analýzy lidského genomu na několik dní. NGS je oproti jiným metodám rychlejší, v jedné analýze lze testovat celý genom nebo vybrané úseky a je možno použít i vzorky od více pacientů. NGS je neselektivní a lze ji použít k objevování zcela nových variant a vyhledávat geny, které způsobují onemocnění. V dnešní době již existuje několik technologií (např. Ion Torrent, Illumina, PacBio a další), umožňujících diagnostickou aplikaci NGS (www.prolekare.cz; www.labguide.cz).

Vlastní analýza se skládá z několika kroků. Na počátku analýzy se připraví cílový vzorek DNA, tento krok je označován jako tzv. příprava sekvenační knihovny. Principem je, že na začátku analýzy se templátová DNA (DNA izolovaná například z nádoru) musí fragmentovat na úseky, které se skládají z několika stovek bází. Na konce vzniklých fragmentů se navážou adaptorové sekvence, které umožní jejich amplifikaci a fixaci na solidní povrch. Poté se fragmenty jednotlivě amplifikují pomocí PCR reakce (tento krok u některých technologií chybí) a následuje paralelní sekvenování. K DNA fragmentům jsou komplementárně přiřazovány jednotlivé nukleotidy, při čemž dochází k vysílání signálu, který zachytí detektor. Tyto zachycené signály se poté bioinformaticky analyzují. Vyšetřovaná sekvence se porovnává s referenční sekvencí, pokud se vyšetřuje genom, porovnává se s referenčním genomem. Poté se hledají případné změny v sekvenovaném vzorku DNA (www.prolekare.cz; www.labguide.cz).

PRAKTICKÁ ČÁST

9 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

9.1 Hlavní cíl

Získat znalosti o metodách sekvenování DNA a jejich využití v diagnostice karcinomu prsu a ovaríí.

9.2 Dílčí cíle

1. Návrh primerů pro provedení PCR reakce a její optimalizace.
2. Vyšetření vzorku DNA na přítomnost patogenní varianty.

10 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

V rámci této práce jsme se nejprve zaměřili na problematiku návrhu primerů a optimalizaci PCR reakce a poté jsme u vybraných respondentů pomocí přímé sekvenace ověřovali případnou patogenní variantu v jejich DNA.

11 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Byla analyzována anonymizovaná DNA tří pacientů. Jeden vzorek byl použit pro optimalizaci PCR reakce a následnou sekvenaci, u všech vzorků jsme pomocí přímé sekvenace zjišťovali přítomnost patogenní varianty.

Všichni pacienti, jejichž vzorky byly použity v praktické části bakalářské práce, podepsali informovaný souhlas s anonymním využitím svojí DNA pro účely výuky.

12 METODIKA PRÁCE

12.1 Izolace DNA

DNA byla izolována z plné krve. Pro izolaci byl použit izolační kit Genra Puregene blood kit (QIAGEN).

Do předem popsané zkumavky jsme napipetovali 300 µl plné krve. Poté jsme přidali 900 µl RBC lyzačního roztoku. Lyzační roztok působí na červené krvinky a způsobí jejich hemolýzu (rozpad červených krvinek). Zkumavku jsme promíchali a nechali inkubovat přibližně 5 minut při pokojové teplotě (15-25 °C). Následně bylo patrné, že došlo k lýze červených krvinek, krev byla průhlednější. Zkumavku jsme vložili do centrifugy a centrifugovali 2 minuty na plný výkon (13000 rpm). Po odpipetování supernatantu jsme zkumavku krátce vortexovali. V dalším kroku jsme přidali 300 µl Cell Lysis Solution, následovalo promíchání a zkumavka se opět krátce vortexovala. V dalším kroku jsme přidali 100 µl protein precipitačního pufru. Před přidáním protein precipitačního pufru je nutné zkumavku dát do lednice a ochladit na méně než 22 °C. Po přidání protein precipitačního pufru jsme zkumavku opět 2 minuty centrifugovali na plný výkon, během centrifugace jsme do nové zkumavky o objemu 1,5 ml napipetovali 300 µl 100 % isopropanolu. Po centrifugaci jsme odpipetovali 300 µl supernatantu, který jsme poté přidali k isopropanolu. Po promíchání bylo ve zkumavce patrné vlákno DNA. Následovala centrifugace a odebrání supernatantu. Dále jsme ke zbylému sedimentu napipetovali 300 µl 70 % ethanolu a 1 minutu centrifugovali. Po centrifugaci jsme odebrali supernatant a zkumavku dali vysušit do termobloku vyhřátého na 45 °C, dokud nebyla zcela suchá. Ethanol je inhibátorem PCR a je proto nutné, aby došlo k jeho odstranění z izolované DNA. K vysušené DNA jsme nakonec přidali 100 µl DNA Hydration Solution, krátce vortexovali a inkubovali v termobloku při 45 °C k rozpuštění DNA. Výsledkem byla izolovaná DNA pacienta.

Celkem byla izolována anonymizovaná DNA od tří pacientů (označení vzorků ZCU_2019_1, ZCU_2019_2, ZCU_2019_3).

12.2 Návrh primerů a optimalizace PCR reakce

12.2.1 Návrh primerů

Primery jsou krátké oligonukleotidy, které se obvykle skládají z 20-25 bází. Jsou komplementární k sekvenci na koncích amplifikovaného úseku. Primery musí být navrženy správně pro každou reakci, jedná se o důležitý komponent, který je zásadní pro správný výsledek analýzy (www.labguide.cz).

Primery byly navrženy pro každý vyšetřovaný exon, syntetizovány byly firmou Sigma-Aldrich.

Jako první byl navržen pár primerů pro exon 37 genu *ATM*. Pro PCR reakci se navrhuje forward (přední) primer a reverse (zadní) primer. Na internetové adrese <https://www.lrg-sequence.org/> jsme vyhledali referenční sekvenci genu *ATM* (LRG_135t1). Byl vybrán úsek referenční sekvence genu *ATM* pro návrh primerů, který obsahuje exon 37. Cílová oblast, kterou jsme chtěli osekvenovat je značena zelenou barvou, zahrnuje exon 37 a přilehlé intronové oblasti dlouhé 20 bp. Vybraná oblast byla vložena do nástroje Primer-BLAST, který je dostupný na stránkách <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>. Výsledkem byly navržené primery, které jsou komplementární k sekvenci vybraného úseku a ohraničují amplifikovanou oblast, která obsahuje exon 37 genu *ATM*. Světle modře jsou vyznačené navržené primery.

```
ATGGCCTAGACTGGAAATAAACAGTTACAGTGTCACATAATATATATTTGATATT
GATATACTAGCCTAGTGTGGTTTTTAAACACCACCTAATACATGTTTTTGTGTTG
TTTTTTAGCAGTATGTTGAGTTTATGGCAGATTAATCTATCATCTTTAGAAATTT
AATATGTCAACGGGGCATGAAAATTTAAGTAAAATGTATTAATTTTACTCATTTT
TACTCAAATATTGGGTGGATTGTGTGTATATCTAGGTGAAAAGTACTGACTTTGT
CAGACTGTACTTCCATACTTGATTCATGATATTTACTCCAAGATACAAATGAATC
ATGGAGAAATCTGCTTTCTACACATGTTTACAGGGATTTTTCACCAGCTGTCTTCGA
CACTTCTCGCAAACGAGCCGATCCACAACCCCTGCAAACCTGGATTCAGGTATT
CTATTAATTTTTAACATTAATACTGTAAACTCAGTTCTAGAGAAAGATGGATTTA
AGATGGAATCCCACTAAAAGCACTTTACAGGATTAATCTATAACCTCTAAATTT
GTTTCTTCATCTATGGAATGGAGATAAAAGTTGCCAACAGTTGCAACAAGTTTTT
AATGAAATAATGTGTGTAAAGTGCCTAGGATAGTACTTGATGTATAGTATTCCC
```

Dále byl navržen pár primerů pro exon 40 genu *ATM*. Postup byl stejný jako u předchozího návrhu primerů. Byl vybrán úsek referenční sekvence genu *ATM* pro návrh primerů, který obsahuje exon 40. Cílová oblast, včetně exonu 40, je značena zelenou barvou, primery jsou označené modře.

```
TTTTGCATATAGGCTTCCCATATGTAGATTATTCTTAAAATATAATTTTCATTAC
AAATTCCTTTTCCATCCTAGGTATAAATGGTATTATGTTTTAAAGTATAAGTGATT
TATTCTGTTTTGTTGCCACCTTCATTAGTTTTTTTCTGTCAAAGTCTATAGTATAT
GTATTCAGGAGCTTCCAAATAGTATGTTCTCATTAAAAGAGGTGTCTTGTGACA
AACAGAAGTCTTGCATTTGAAGAAGGAAGCCAGAGTACAACTATTTCTAGCTTG
AGTGAAAAAAGTAAAGAAGAACTGGAATAAGTTTACAGGTAAAATATTAGAGGC
TCTATTATTTATGACAGTATTTATCTCATACTTTGGGTTATTTTGTATAGACACT
GTACAGATGCCATGTGATTTTTAAACTGAATTTACTTACTGGACTAAGCATCATA
TATATAAAATTATGGTCTGAAGCTTAAGCCTTAGAGTAGACAGACTTGAGTTCTA
ATACTGACTCTGCCACTTCT
```

Poslední byl navržen pár primerů pro exon 3 genu *BARD1* (LRG_297t1). Postup se opakoval jako u předchozích návrhů. Byl vybrán úsek referenční sekvence genu *BARD1* pro návrh primerů, který obsahuje exon 3. Modře jsou vyznačené navržené primery a zeleně je označena cílová oblast zahrnující exon 3 a přilehlé intro-nové oblasti dlouhé 20 bp.

```
CTTAGATTTGATGTATGTATTTTACTCTTTAAAACAGTATTCAACAAGGATATTAC
AATTGACCATTGTATGTTAGAATAACCTCTGCTCCATTTATTTCTGTTCAAAGTGT
TTAGTTTTTGGAATTAAATTCTGCTGAATGGGTTGCTTTTTTTTTTTTTTTAATTA
TTTTAAAGTAATTGTGTAAGTGACTGCATTGGAACTGGATGTCCAGTGTGTTACA
CCCCGGCCTGGATACAAGACTTGAAGATAAATAGACAACTGGACAGCATGATTC
AACTTTGTAGTAAGCTTCGAAATTTGCTACATGACAATGAGCTGTCAGGTAAGAA
CTATCCCTATCTCTCTTAGTTAAATTCATCAGTTAAAAACTGATGAATTCATATTC
ATAAAGTATATAAAACATCTATCTGGAGTTCTGGAATACGTATTTTCAGATTTTAAA
ATCTGTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCCATTGAGTCTCTCTATGTTGTCC
AAGCCGGACTTGAACTCCTGCACTCAAGGGATTCCCCCACCTCAGCCTCCCT
```

K sekvenci každého primeru byly přidány univerzální sekvenační primery Uniseq tags US1 (gtagcgcgacggccagt) a US2 (cagggcgcagcgatgac) (Mattocks C., Ward D., 2007, Journal of Medical Genetics). K forward primerům byl přidán sekvenační primer US1, k reverse primerům sekvenační primer US2. Sekvence navržených primerů viz tabulka 1.

Tabulka 1 - Sekvence navržených primerů

Název primerů	Sekvence primerů
ATM_37F	gtagcgcgacggccagtAATATGTCAACGGGGCATGAAA
ATM_37R	cagggcgcagcgatgacCCTGTAAAGTGCTTTTAGTGGGAT
ATM_40F	gtagcgcgacggccagtTTCTGTTTTGTTTGCCACCTTCA
ATM_40R	cagggcgcagcgatgacGAACTCAAGTCTGTCTACTCTAAGG
BARD1_3F	gtagcgcgacggccagtTAAATTCTGCTGAATGGGTTGC
BARD1_3R	cagggcgcagcgatgacACGTATTCCAGAACTCCAGATAGAT

Zdroj: vlastní

Syntetizované primery byly firmou Sigma-Aldrich dodány v lyofilizované formě. Nejprve byly dle návodu výrobce naředěny na zásobní koncentraci 100 μM , ze zásobních primerů poté byly dle tabulky 2 připraveny pracovní primery o koncentraci 10 μM .

Tabulka 2 - Ředění primerů pro PCR reakci genu ATM a BARD1

Exon	Forward primer (μl)	Reverse primer (μl)	H ₂ O (μl)	Celkový objem (μl)
ATM_37	10	10	80	100
ATM_40	10	10	80	100
BARD1_3	10	10	80	100

Zdroj: vlastní

12.2.2 Příprava a optimalizace PCR reakce

Pro optimalizaci PCR reakce byly vybrány exony 37 a 40 genu *ATM* a exon 3 genu *BARD1*, byla použita DNA ze vzorku č. ZCU_2019_1.

Proces přípravy PCR reakce probíhal v laminárním boxu. Je to z toho důvodu, aby se analyzované vzorky nekontaminovaly cizí DNA, která by mohla znehodnotit výsledek. Laminární box je laboratorní přístroj, ve kterém se filtruje vzduch předfiltry a filtry a poskytuje nám tak práci ve sterilním prostředí. Bylo připraveno dvacet jedna zkumavek ve stojánku. Zkumavky jsme rozdělili do tří řad po sedmi zkumavkách, jedna řada zkumavek byla pro jeden z vybraných exonů. V sedmé zkumavce byla NTC kontrola (no template control – kontrola bez templátové DNA), která slouží pro kontrolu kontaminace reakce.

Všechny zkumavky jsme nejdříve popsali pro pozdější identifikaci vzorků. Dále jsme připravili master mix smícháním ATGold, H₂O a primerů dle tabulky 3.

Tabulka 3 - Složení master mixu pro PCR reakci genu ATM a BARD1

Reagencie	Objem (μl) pro 1 vzorek	Objem (μl) pro 7 vzorků	Rezerva 5 % (μl)
ATGold	5	35	36,7
H ₂ O	1	7	7,35
Primery F+R	2	14	14,7
	8	56	58,75

Zdroj: vlastní

Do šesti zkumavek z každé řady jsme přidali 2 μl templátové DNA. Do sedmé zkumavky, tedy do NTC jsme místo DNA přidali 2 μl H₂O. Vzorky poté byly připravené pro amplifikaci pomocí PCR reakce.

U každé zkumavky probíhala PCR reakce s odlišnou teplotou nasedání primerů (viz tabulka 4).

Tabulka 4 - Teploty nasedání primerů

	Teplota nasedání primerů
Zkumavka č. 1	56 °C
Zkumavka č. 2	58 °C
Zkumavka č. 3	60 °C
Zkumavka č. 4	62 °C
Zkumavka č. 5	64 °C
Zkumavka č. 6	66 °C
NTC	60 °C

Zdroj: vlastní

Vzorky jsme následně umístili do thermocykleru a spustili teplotní profil dle tabulky 5.

Tabulka 5 - Teplotní profil PCR reakce

Cyklus	Teplota	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	95 °C	10 min	
Denaturace	95 °C	30 s	30x
Hybridizace	56–66 °C	30 s	30x
Elongace	72 °C	45 s	30x
Konečná elongace	72 °C	5 min	
Chlazení	15 °C	∞	

Zdroj: vlastní

Po skončení PCR reakce jsme pokračovali kontrolou amplifikace vzorků pomocí gelové elektroforézy.

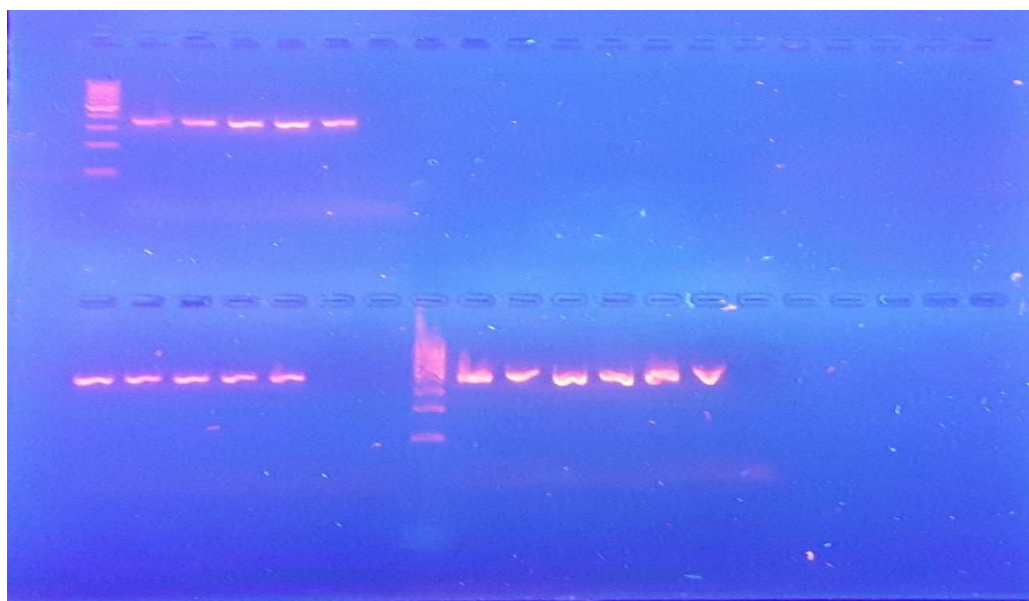
12.2.3 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda, při které se pohybují záporně nabitě částice v elektrickém poli směrem k anodě. Tato metoda nám umožňuje separovat fragmenty nukleových kyselin díky jejich rozdílné rychlosti pohybu v gelu. Rozdílná rychlost molekul DNA je nepřímo úměrná jejich velikosti. Delší fragmenty nukleových kyselin se pohybují pomaleji než kratší fragmenty. Existují dva druhy gelů, agarózový a polyakrylamidový. Preferovaným gelem je agarózový, protože představuje menší riziko pro zdraví pracovníka. Pokud jsou ale fragmenty velmi krátké, používá se gel polyakrylamidový. Dalším faktorem je koncentrace gelu, na které je závislá velikost pórů ovlivňující pohyb molekul. Koncentraci gelu zvolíme na základě toho, jaké fragmenty molekul DNA chceme separovat. Čím je koncentrace gelu vyšší, tím probíhá oddělení molekul DNA pomaleji. Vyšší koncentrace gelu je vhodná pro separaci krátkých fragmentů. Gelem o nižší koncentraci se separují dlouhé fragmenty nukleových kyselin. Dalším faktorem je prostorové uspořádání molekuly DNA. Méně spiralizovaná DNA se pohybuje v gelu pomaleji, ale molekula DNA, která je spiralizovaná se naopak pohybuje rychleji, protože prochází lépe póry. Dalším faktorem ovlivňujícím elektroforézu je vhodně nastavené elektrické napětí. S rostoucím elektrickým napětím se rychlost pohybu molekul zvyšuje. Pokud je nastaveno příliš vysoké napětí, může dojít k destrukci gelu, naopak při velmi nízkém napětí mohou

molekuly DNA unikat do okolí, což může vézt ke zkresleným výsledkům. Dalším komponentem jsou elektroforetické pufrы. Pufrы ovlivňují pohyb molekul DNA obsahem solí. Obsah solí musí být přiměřený. Vysoký obsah solí vede k větší produkci tepla a deformaci gelu (www.labguide.cz).

Na předem připravený 3 % agarózový gel jsme napipetovali 2,5 μ l velikostního markeru GeneRuler 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific) a dále 7 μ l vzorku vzniklého smícháním 1 μ l původního amplifikovaného vzorku a 6 μ l nanášecí barvičky. U vzorku č. 6 exonu 37 genu *ATM* došlo během PCR reakce k odpaření pravděpodobně vlivem špatně zavřeného víčka zkumavky, do dalších analýz tedy tento vzorek zařazen nebyl. Jako poslední byla napipetována NTC kontrola. Následně byla spuštěna elektroforéza.

Obrázek 1 - Vizualizace produktů PCR na agarózovém gelu



Zdroj: vlastní

Horní řada zleva: 100bp DNA ladder, *ATM* exon 37, NTC

Dolní řada zleva: *ATM* exon 40, NTC, 100bp DNA ladder, *BARD1* exon 3, NTC

Analýzou gelu po ukončení elektroforézy jsme zjistili, že došlo k namnožení všech vzorků, kromě vzorku č. 6 exonu 40 genu *ATM*. NTC kontroly byly bez přítomnosti amplifikačního produktu, nedošlo tedy ke kontaminaci reakce.

Pro další analýzu jsme od každého genu vybrali vzorky č. 3. U těchto vzorků nasedaly primery při teplotě 60 °C.

12.2.4 Purifikace produktů PCR genu *ATM* a genu *BARD1*

Dalším krokem bylo přečistění produktů PCR, byl použit kit Agencourt AMPure XP. Tento systém pracuje na základě technologie Agencourt na pevné fázi na bázi paramagnetických částic pro vysoce účinnou purifikaci amplikonů z reakce PCR. Metoda využívá k selektivnímu navázání amplikonů z reakce PCR o velikosti 100 bp a větších na paramagnetické částice optimalizovaný pufr. Díky tomuto procesu se očistí produkty PCR od nadbytečných primerů, nukleotidů, solí a enzymů. Výsledkem je přečistěný produkt, který není kontaminovaný žádnými látkami (Agencourt AMPure XP, protokol 000387v001, str.1).

Vybrané vzorky jsme purifikovali pro sekvenační reakci. Byl použit postup Agencourt AMPure XP pro formát 96 jamek. Před použitím se lahvička s obsahem reagensie Agencourt AMPure XP musela jemně promíchat, aby se všechny magnetické částice promíchaly a resuspendovaly. Ke vzorku jsme přidali 18 µl Agencourt AMPure XP. Přidaná reagensie se promíchala se vzorkem pomocí pipety, aby se produkt z PCR reakce navázal na magnetické částice, poté následovala 5minutová inkubace při pokojové teplotě. Po inkubaci jsme zkumavky se vzorky přesunuli na magnetickou destičku, aby došlo k separaci částic z roztoku. Po několika minutách jsme pipetou odsáli supernatant z každé zkumavky. Špička pipety se pomalu přiložila na dno zkumavky a opatrně se odsál supernatant tak, aby se nedošlo k narušení a odsátí prstence magnetických částic usazených na stěnách zkumavky. Dále jsme provedli dvě promytí 70 % ethanolem. Přidali jsme 200 µl 70 % ethanolu do všech zkumavek a nechali krátce inkubovat. Po inkubaci jsme ethanol odsáli. Bylo velmi důležité, aby se odsál veškerý ethanol, protože je inhibátorem PCR reakce. Po promytí se vzorky nechaly 5 minut sušit na vzduchu při pokojové teplotě. Poté jsme mimo magnetickou destičku ke každému vzorku přidali 40 µl elučního pufru (100:1 TE pufr), obsah zkumavky jsme promíchali pipetou a inkubovali 2 minuty při pokojové teplotě. Po inkubaci jsme vzorky opět umístili na magnetickou destičku a čirý supernatant jsme přenesli do nových zkumavek. Výsledné přečistěné produkty PCR reakce byly připraveny pro sekvenační reakci.

12.2.5 Příprava sekvenační reakce genu *ATM* a *BARD1*

Pro sekvenační reakci jsme použili univerzální sekvenační primery US1 a US2. Podle tabulky 6 jsme připravili sekvenační master mix.

Tabulka 6 - Příprava master mixu pro sekvenační reakci

Reagencie	Objem (μl)	Objem pro 3 vzorky (μl)
H ₂ O	2,9	8,7
5x Seq. Buffer Big Dye Terminator	1,8	5,3
BigDye	0,4	1,1
US1/US2 primery	2	6
		21

Zdroj: vlastní

Pro každý PCR produkt proběhla sekvenační reakce ve forward (US1) i reverse (US2) směru. Na jednu reakci jsme použili 7 μl master mixu a 3 μl přečištěného PCR produktu. Takto připravené vzorky jsme umístili do thermocykleru a spustili sekvenační program dle tabulky 7.

Tabulka 7 - Teplotní profil sekvenační reakce genu *ATM* a *BARD1*

Cyklus	Teplota	Čas	Opakování
1	96 °C	1 min	
2	96 °C	10 s	25x
3	60 °C	4 min	25x
4	10 °C	∞	

Zdroj: vlastní

12.2.6 Purifikace sekvenačních produktů

Po sekvenační reakci byla na řadě purifikace sekvenačních produktů. Byl použit systém Agencourt CleanSEQ (protokol 000600v32). Tento systém funguje na bázi magnetických částic.

Lahvičku s reagenty Agencourt CleanSEQ jsme promíchali, aby se částice zcela resuspendovaly. Do každé zkumavky jsme přidali 10 μl reagentu a pipetou promíchali, aby došlo k homogenizaci obsahu zkumavky. Poté jsme zkumavky umístili na magnetickou destičku, aby došlo k odseparování magnetických částic.

Po 5minutové inkubaci jsme špičkou pipety opatrně se odsáli supernatant. Dále jsme provedli dvě promytí 85 % ethanolem. Do každé zkumavky jsme přidali 100 μ l 85 % ethanolu. Po usazení částic se pipetou opatrně odsál veškerý ethanol, pokud možno bez porušení prstence magnetických částic. Po promytí se vzorky nechaly 10 minut sušit na vzduchu při laboratorní teplotě. Dalším krokem bylo přidání 40 μ l 0,1 μ M EDTA pufru do všech vzorků a poté 5minutová inkubace při laboratorní teplotě. Pufry se používá k eluci sekvenačních produktů po přečištění.

Vlastní sekvenace vzorků proběhla v genetickém analyzátoru ABI 3130 umístěném v laboratoři ÚLG FN Plzeň.

12.3 Analýza patogenní varianty v genu *BRCA1*

V další analýze DNA jsme vyšetřovali přítomnost patogenní varianty v exonu 7 genu *BRCA1*. Pro analýzu byly použity vzorky ZCU_2019_2 a ZCU_2019_3.

12.3.1 Příprava PCR reakce

Postup pro přípravu PCR reakce viz kapitola 12.2.2 Příprava a optimalizace PCR reakce. Celkem jsme připravili tři zkumavky (dva analyzované vzorky + jedna NTC kontrola). Dle tabulky 8 jsme připravili master mix smícháním příslušného množství reagensů, rozpipetovali po 8 μ l a přidali 2 μ l DNA. Do NTC kontroly jsme místo DNA napipetovali 2 μ l H₂O. Sekvence a názvy použitých primerů viz tabulka 9.

Tabulka 8 - Master mix pro PCR reakci genu *BRCA1*

	Objem (μ l)	Objem (μ l) pro 3 vzorky
ATGold	5	15
H ₂ O	1	3
Primery	1+1	2
		24

Zdroj: vlastní

Tabulka 9 - Primery pro sekvenační reakci genu BRCA1

Název primeru	Sekvence primeru
BC1_07_fwd_US1_01	gtagcgcgacggccagtGGGTTTCTCTTGGTTTCTTTGATT
BC1_07_rvs_US2_02	cagggcgcagcgatgacAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAAACAAATGG

Zdroj: vlastní

Vzorky jsme umístili do thermocykleru a spustili teplotní profil dle tabulky 10.

Tabulka 10 - Teplotní profil PCR reakce genu BRCA1

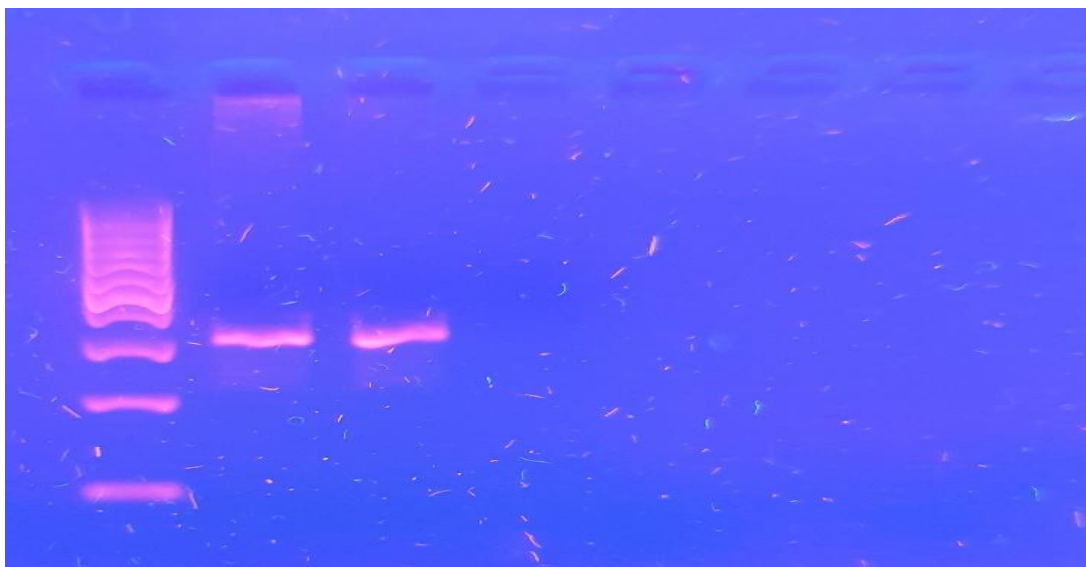
Cyklus	Teplota	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	95 °C	10 min	
Denaturace	95 °C	5 s	40x
Hybridizace	61 °C	30 s	40x
Elongace	72 °C	1 min	40x
Konečná elongace	72 °C	5 min	
Chlazení	15 °C	∞	

Zdroj: vlastní

12.3.2 Separace vzorků na gelové elektroforéze

Po PCR reakci jsme provedli kontrolu amplifikace na gelu. Příprava a postup viz kapitola 12.2.3 Gelová elektroforéza. Kontrolou produktů PCR reakce jsme zjistili, že došlo k namnožení obou vyšetřovaných vzorků, v NTC kontrole nebyl žádný produkt, nedošlo tedy ke kontaminaci reakce (viz obr. 2).

Obrázek 2 - Vizualizace produktů PCR reakce exonu 7 genu BRCA1



Zdroj: vlastní

Zleva: 100bp DNA ladder, ZCU_2019_2, ZCU_2019_3, NTC

12.3.3 Purifikace PCR produktů a sekvenační reakce

Následovala purifikace PCR produktů a příprava sekvenační reakce. Postup viz kapitoly 12.2.4 Purifikace produktů PCR a 12.2.5 Příprava sekvenační reakce genu.

Pro každý PCR produkt proběhla sekvenační reakce ve forward (US1) i reverse (US2) směru. Podle tabulky 11 jsme připravili sekvenační master mix, na jednu reakci jsme použili 7 μ l master mixu a 3 μ l přečištěného PCR produktu.

Tabulka 11 - Master mix pro sekvenační reakci genu BRCA1

Reagencie	Objem (μ l)	Objem pro 2 vzorky (μ l)
H ₂ O	2,9	5,8
5x Seq. Buffer Big Dye Terminator	1,8	3,6
BigDye	0,4	0,8
US1/US2 primery	2	4
		14,2

Zdroj: vlastní

Takto připravené vzorky jsme umístili do thermocykleru a spustili sekvenační program dle následující tabulky.

Tabulka 12- Teplotní profil sekvenační reakce genu BRCA1

Cyklus	Teplota	Čas	Opakování
1	96 °C	30 s	
2	96 °C	30 s	25x
3	50 °C	15 s	25x
4	60 °C	2 min	25x
5	10 °C	∞	

Zdroj: vlastní

Po skončení sekvenační reakce jsme vzorky přečistili (postup viz kapitola 12.2.6 Purifikace sekvenačních produktů). Sekvence proběhla v genetickém analyzátoru ABI 3130 umístěném v laboratoři ÚLG FN Plzeň.

13 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

V rámci praktické části bakalářské práce jsme se nejprve zaměřili na návrh primerů a optimalizaci PCR reakce pro exony 37 a 40 genu *ATM* a exonu 3 genu *BARD1* a jejich následnou sekvenaci. V dalším kroku jsme ověřovali přítomnost patogenní varianty v exonu 7 genu *BRCA1*.

Analýza PCR produktů na agarózovém gelu prokázala, že došlo k amplifikaci téměř při všech použitých teplotách. Z praktických důvodů byly do dalších analýz vybrány produkty, u nichž docházelo k nasedání primerů při teplotě 60 °C.

Výsledky sekvenace jsme analyzovali v programu BioEdit. Tento program, kromě dalších funkcí, umožňuje porovnávat sekvence nukleotidů a odlišit případné rozdíly v jednotlivých sekvencích.

U vyšetřovaného exonu 37 genu *ATM* se naše výsledky zcela shodovaly s referenční sekvencí. Sekvenační reakce poskytovala správný produkt v obou směrech (forward i reverse). Vybraný úsek sekvence je dlouhý 218 bp.

Obrázek 3- BioEdit – výsledky sekvenace exonu 37 genu *ATM*

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
ATM_ex37_ref  GATTGTGTTGTATATTCTAGGGTGAAAAGTACTTTTGTCTCAGACTGTACTTCCATACTTGATTCATGATAATTTTACTCCAAGATACAAATGAATCATGGAG
ATM_ex37_F    .....
ATM_ex37_R    .....

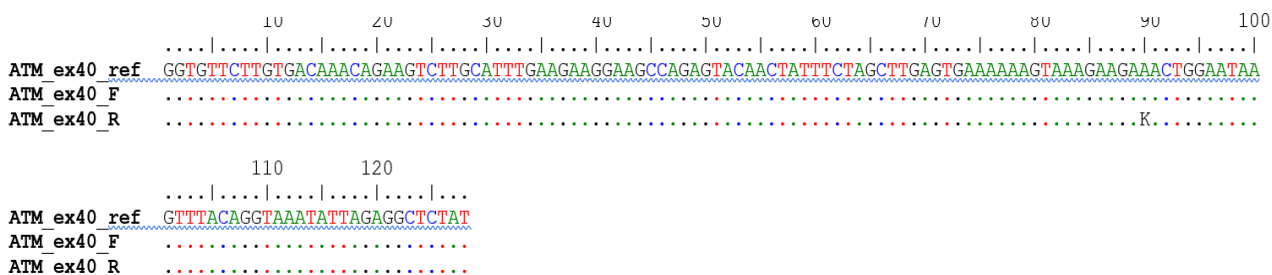
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
ATM_ex37_ref  AAATCTGCCTTCTACACATGTTTCAGGGATTTTTCACCAGTGTCTTCGACACTTCGCAACGAGCCGATCCACAACCCCTGCAAACTTGGATTGAGGT
ATM_ex37_F    .....
ATM_ex37_R    .....

      210
ATM_ex37_ref  ATTCTATTAAATTTTAA
ATM_ex37_F    .....
ATM_ex37_R    .....
```

Zdroj: vlastní

Dále jsme analyzovali exon 40 genu *ATM*. I v tomto případě se výsledná sekvence vzorku shodovala s referenční sekvencí. Analyzovaný úsek sekvence je dlouhý 128 bp. Na pozici 90 u reverse primeru se objevil sekvenační artefakt, nejednalo se o patogenní variantu či polymorfismus

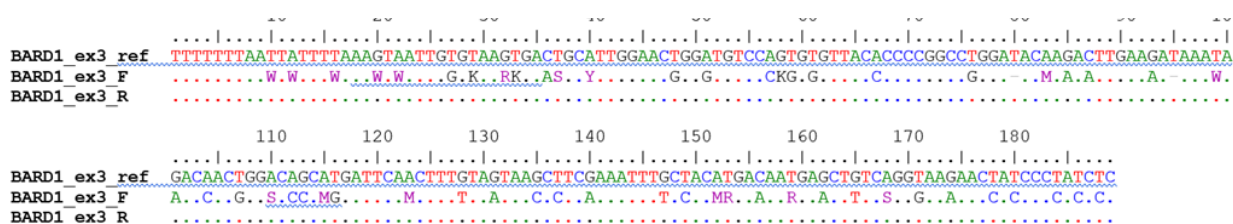
Obrázek 4 - BioEdit – výsledky sekvenace exonu 40 genu *ATM*



Zdroj: vlastní

Ve vyšetřovaném exonu 3 genu *BARD1* se s referenční sekvencí shodovala pouze sekvence v reverse směru. Ve forward směru se objevila spousta odchylek od referenční sekvence a výsledek tak nebyl hodnotitelný. Příčinou je s největší pravděpodobností homopolymerní oblast polyT v intronu před exonem 3, které se při návrhu primerů nebylo možné vyhnout. Polymeráza má s takovými místy problémy, může docházet k chybnému zařazení bází do vznikajícího amplikonu a to vede k nepřesným výsledkům sekvenování. Porovnání sekvence v reverse směru s referenční sekvencí neprokázalo přítomnost žádné patogenní varianty či polymorfismu.

Obrázek 5 - BioEdit – výsledky sekvenace exonu 3 genu *BARD1*



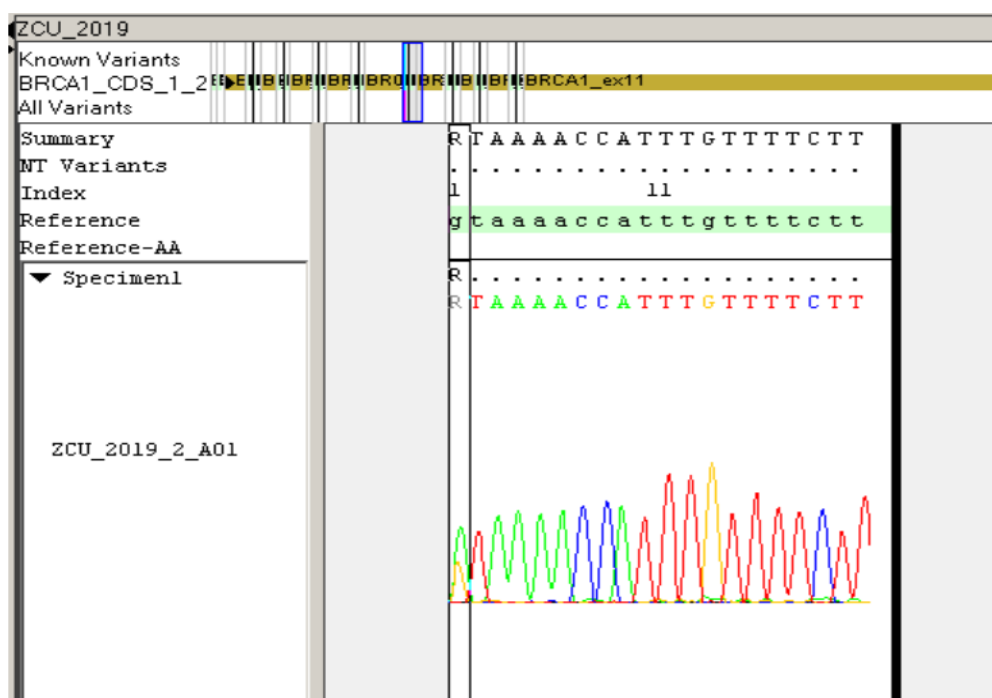
Zdroj: vlastní

Při analýze exonu 7 a přilehlých intronových oblastí genu *BRCA1* jsme se zaměřili na hledání patogenní varianty u anonymních pacientů pomocí sekvenačních metod. Výsledky jsme analyzovali v programu BioEdit a SeqScape v2.1. SeqScape v2.1 je program, ve kterém je možné vytvářet sekvenační projekty,

porovnávat vyšetřované a referenční sekvence a výsledky je možné zobrazit ve formě elektroforetogramu.

Ve vyšetřovaném vzorku ZCU_2019_2 jsme detekovali patogenní variantu. Jednalo se o bodovou záměnu guaninu za adenin v první bázi intronu. Jednalo se o změnu c.441+1G>A v heterozygotním stavu. Výsledný elektroforetogram viz obrázek 6.

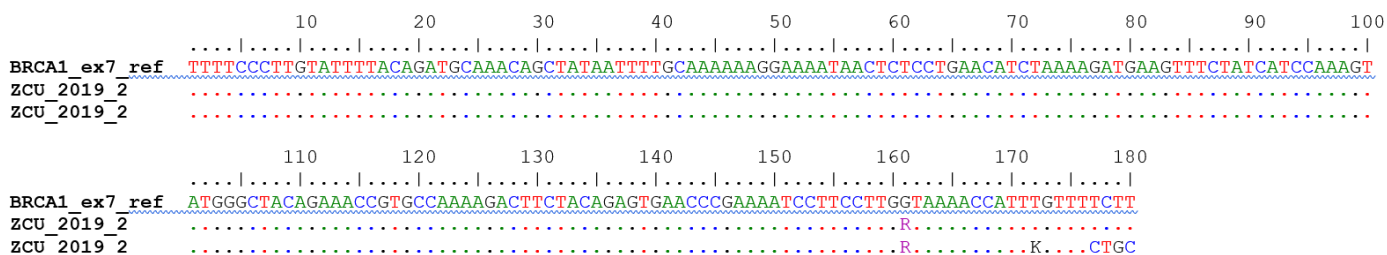
Obrázek 6 - SeqScape v2.1 - výsledky sekvenace vzorku ZCU_2019_2



Zdroj: vlastní

Tento výsledek byl patrný i v programu BioEdit, kde jsou dvě R (ve forward i reverse směru) v pozici 161, zbylé změny v reversu jsou sekvenační artefakty.

Obrázek 7 - BioEdit – výsledek sekvenace vzorku ZCU_2019_2



Zdroj: vlastní

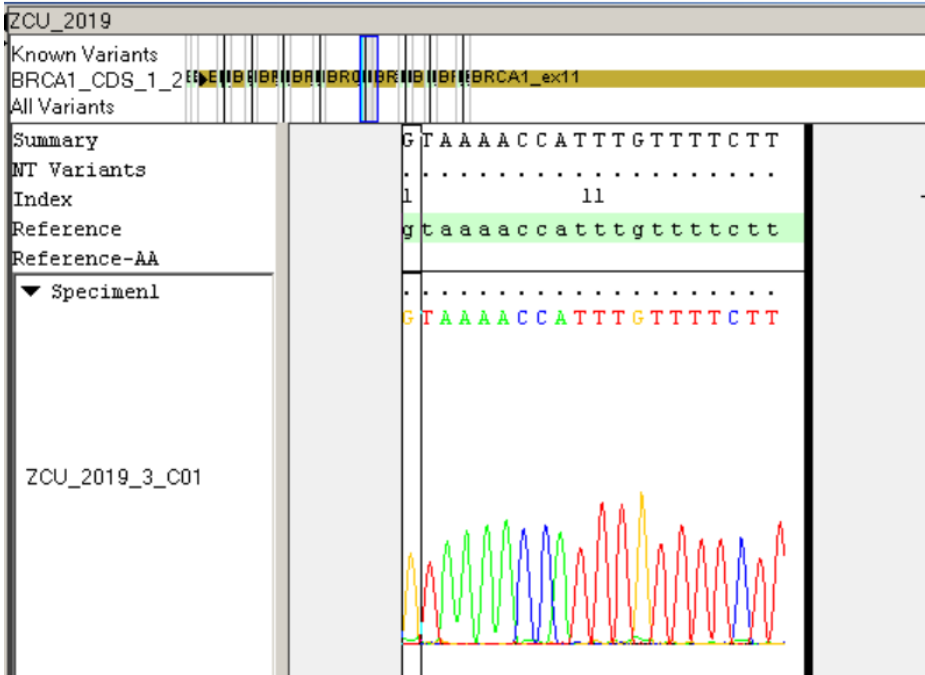
Ve vyšetřovaném vzorku ZCU_2019_3 se žádná patogenní varianta neobjevila. Analýza v programu BioEdit odhalila pouze pouze sekvenační artefakty na konci reverse sekvence. Výsledky analýzy viz obrázky 8 a 9.

Obrázek 8- BioEdit – výsledek sekvenace vzorku ZCU_2019_3



Zdroj: vlastní

Obrázek 9 - SeqScape v2.1 - výsledky sekvenace vzorku ZCU_2019_3



Zdroj: vlastní

14 DISKUZE

Sekvenování nové generace se v dnešní době stalo velmi populární metodou, která je využívána jak při diagnostice onemocnění, tak při medicínském nebo biologickém výzkumu. Je to hlavně díky tomu, že tato technologie nám umožňuje osekvenovat celý lidský genom a v porovnání se Sangerovou metodou je rychlejší a méně nákladná. Tato technologie se stala velmi využívanou v laboratorní diagnostice, především díky tomu, že dokáže osekvenovat několik tisíců až milionů sekvencí současně a můžeme sekvenovat i více pacientů najednou. Hlavně její použití v oblasti diagnostiky nádorového onemocnění je velkým přínosem. Tato metoda výrazně přispěla k molekulární charakterizaci nádorů a tomu abychom lépe chápali samotný vývoj nádorů. Sekvenování nové generace nám také odhalilo řadu doposud neznámých a nezjištěných patogenních variant, které jsou podstatou nádorových dědičných onemocnění. Díky této metodě se může včas zjistit, o jakou patogenní variantu se jedná a jaký typ nádorového onemocnění způsobí, díky tomu se mohou učinit opatření, která pomohou zabránit propuknutí onemocnění. I přes rozvoj a nesporné výhody sekvenování nové generace, je stále využívána i Sangerova metoda sekvenování, v diagnostice hereditárních nádorů především při ověřování patogenních variant detekovaných metodami NGS.

V rámci bakalářské práce jsme se zaměřili na použití sekvenačních metod a jejich význam při diagnostice hereditárních syndromů. Pro návrh primerů, optimalizaci PCR a následnou sekvenaci jsme vybrali exony 37 a 40 genu *ATM* a exon 3 genu *BARD1*. Navržené primery poskytovaly amplifikační produkt téměř při všech testovaných teplotách, s výjimkou vzorku č. 6 exonu 40 genu *ATM*, u kterého byla teplota nasedání primeru 66 °C. Tato teplota tedy již nezaručovala správné nasednutí primerů k cílové sekvenci a tvorbu produktu. Jedním z kroků při optimalizaci PCR reakce je tedy správné nastavení teploty nasedání primerů. V našem případě byly pro další analýzu použity produkty, u nichž byla teplota nasedání 60 °C.

V případě analýzy genu *ATM* poskytovaly vhodný produkt pro další analýzu sekvenační produkty v obou směrech (forward i reverse) a navržené primery jsou tedy vhodné pro rutinní použití.

U genu *BARD1* se výsledná sekvence ve forward směru neshodovala s referenční sekvencí. Problém nastal už při tvorbě primerů, kdy ve vybrané sekvenci, konkrétně v oblasti intronu těsně před exonem 3, se objevil homopolymerní úsek. To znamená, že se v této oblasti vyskytují nukleotidy téhož typu, v našem případě se jednalo o úsek polyT. *Taq* polymeráza má s takovým místem problém, jelikož po polymerizaci vybraného úseku DNA následuje disociace enzymu od templátu a nově vznikající vlákno se z templátu uvolní 3' koncem. Když se 3' konec nově vznikajícího vlákna opět váže na templát, tak může nastat situace, při které se připojí na správné místo na templátu, ale někdy dojde k tomu, že se připojí o bázi vpřed nebo vzad. To v našem případě způsobilo, že se výsledná sekvence od homopolymerní oblasti polyT neshodovala s referenční sekvencí a vznikla směs nukleotidů a výsledná sekvence nebyla pro analýzu použitelná. V případě exonu 3 genu *BARD1* je tedy v našem případě pro analýzu využitelná pouze sekvenace v reverse směru. Při návrhu primerů je tedy vhodné, pokud to charakteristika analyzované sekvenace dovolí, se homopolymerním oblastem vyhnout.

Ačkoliv technologie pokročila vpřed a došlo k rozvoji masivně paralelního sekvenování, tak pořád existují určitá omezení, která nedovolují vyšetřit pacienta se 100 % jistotou. V dnešní době existují jistá doporučení, jakými by se mohlo zabránit chybnému čtení v homopolymerním úseku, ale žádná z těchto doporučení není schopné tomu na 100 % zabránit. Ve srovnání s diplomovou prací Marie Kývalové, která upozorňuje na stejný problém s homopolymerními úseky, jsme tak narazili na limity této technologie a je důležité s nimi počítat. V dnešní době neexistuje žádné opatření, které by tomu zabránilo, avšak technologie se stále vyvíjí a věda jde vpřed, není tedy vyloučené, že se tento nedostatek v budoucnu odstraní.

Dalším úkolem bylo prokázat patogenní variantu metodou přímé sekvenace. Předmětem zkoumání byl gen *BRCA1*. Ve vzorku ZCU_2019_3 se patogenní varianta neprokázala. Ve vzorku ZCU_2019_2 se potvrdil nález patogenní varianty. Jednalo se o sestřihovou patogenní variantu v první bázi v intronu, přesný popis varianty je c.441+1G>A, v databázi ClinVar je uvedena pod identifikačním číslem rs397509172. Jedná se o bodovou záměnu, což znamená, že nastala změna pouze v jednom nukleotidu. Sestřihové patogenní varianty způsobují změny v maturované mRNA a může tak docházet k narušení struktury vzniklého proteinu. Tato varianta byla již v minulosti popsána. Ústav lékařské onkologie ve Filadelfii se

zabýval studií klíčových patogenních variant v genech *BRCA1* a *BRCA2*, které jsou podstatou dědičných nádorových onemocnění prsu a vaječníků. V této studii se zabývali i variantou c.441+1G>A, kterou klasifikovali jako potencionálně patologickou. Jedná se o variantu, která je zodpovědná za vznik dědičného karcinomu a její přítomnost může vézt ke vzniku onkologického onemocnění. Ačkoliv dnes existuje mnoho variant, které jsou identifikovány při analýzách genů *BRCA1* a *BRCA2*, tak řada z těchto genetických změn je stále klasifikována jako varianty neznámého významu. Patogenní varianty v genech *BRCA1* a *BRCA2* jsou zodpovědné za velkou část hereditárních syndromů prsu a vaječníků. Pokud se tedy objeví některá z těchto variant v rodině, je důležité, aby rodina byla preventivně sledována a po souhlasu ostatních členů, také vyšetřena na přítomnost konkrétní varianty. Nezbytnou součástí je i genetické poradenství, jak před samotným testováním, tak i k vysvětlení výsledků a seznámení s dopady testování. Doporučení by se měla řídit podle známých a publikovaných rizik mutací v klíčových genech, ale zde se musí brát v úvahu i rizika v rodinné anamnéze. Mezi primární prevenci pro vysoce rizikové geny se řadí i preventivní chirurgické zákroky, které by mohly vzniku onemocnění zabránit. Jedná se o mastektomii a profylaktickou adnexektomii, ovšem pro ženu je tento krok velmi složitý, ke každému jedinci se tedy musí přistupovat individuálně a musí se zohlednit všechna rizika.

ZÁVĚR

V bakalářské práci jsme se zaměřili na využití sekvenačních metod při vyšetření hereditárních nádoru prsu a vaječníku. Dědičná predispozice ke karcinomu prsu je podstatou 5–10 % nádoru prsu. Geny *BRCA1* a *BRCA2* se řadí mezi vysoce rizikové geny a jejich nositelé mají až 85 % jistotu, že se u nich nemoc projeví, u onemocnění vaječníku je to přibližně 20–60 %. Testování pomocí sekvenování nové generace je v dnešní době hlavní metoda, která se využívá pro diagnostiku hereditárních nádorových syndromů. Tato technologie umožňuje paralelně sekvenovat velké množství genů najednou a vytvoření komplexní genetické informace o pacientovi. Laboratoře k diagnostice využívají takzvané NGS panely, které mohou obsahovat až několik desítek či stovek genů souvisejících s daným onemocněním.

I přes rozvoj metod sekvenování nové generace je stále využívána i metoda přímého sekvenování, původně vyvinutá F. Sangerem. Využívá se v kombinaci s NGS metodami, kdy je touto metodou ověřena případná přítomnost patogenní varianty detekované metodou NGS. I když se nová technologie neustále vyvíjí, tak v diagnostice genetických změn hraje stále podstatou roli i Sangerovo sekvenování.

V rámci bakalářské práce jsme si vybrali cílové úseky DNA, které jsme chtěli osekvenovat za pomoci sekvenačních metod. Pokud se v testovaném vzorku nachází nějaká genetická změna, tak tato metoda nám jí odhalí. V případě diagnostiky dědičných predispozic karcinomů prsu a vaječníku je sekvenování velmi důležité. Umožňuje nám diagnostikovat patogenní varianty, které jsou za vznik onemocnění zodpovědné a díky tomu, se v rodinách může zamezit dalšímu rozvoji onemocnění a mohou se doporučit jistá opatření. Řada z těchto variant je již známa, ovšem existují i změny, jejichž význam doposud nebyl objasněn.

BIBLIOGRAFIE

1. **Roztočil, Aleš.** *Moderní gynekologie.* Praha : Grada, 2011. ISBN 978-80-247-2832-2.
2. **Čepický, Pavel.** *Kapitoly z diferenciální diagnostiky v gynekologii a porodnictví.* Praha : Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5604-2.
3. **Staněk, Libor, Petra, Tesařová a Gürlich, Robert.** *Moderní onkogynekologie v kazuistikách.* Praha : Current Media, 2017. ISBN 978-80-88129-27-1.
4. **Adam, Zdeněk, Vaníček, Jiří a Vorlíček, Jiří.** *Diagnostické a léčebné postupy u maligních nádorů.* Praha : Grada, 2004. ISBN 80-247-0896-5..
5. **Novotný, Jan, Vítek, Pavel a Kleibl, Zdeněk.** *Onkologie v klinické praxi: standardní přístupy v diagnostice a léčbě vybraných zhoubných nádorů.* Praha : Mladá fronta, 2016. ISBN 978-80-204-3944-4.
6. **Cibula, David a Petruželka, Luboš.** *Onkogynekologie.* Praha : Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2665-6.
7. **Abrahámová, Jitka.** *Co byste měli vědět o rakovině prsu.* Praha : Grada, 2019. ISBN 978-80-271-2055-0.
8. **Strnad, Pavel.** *Nemoci prsu v každodenní praxi.* Praha : Maxdorf, 2014. ISBN 978-80-7345-390-9.
9. **Coufal, Oldřich a Vuk, Fait.** *Chirurgická léčba karcinomu prsu.* Praha : Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3641-9.
10. **Hladíková, Zuzana.** *Diagnostika a léčba onemocnění prsu.* Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2268-8.
11. **Čihák, Radomír.** *Anatomie.* Praha : Grada, 2016. ISBN 978-80-247-4788-0.
12. **Co jsou nádory?** *www.mou.cz.* [Online] Masarykův onkologický ústav, 2019. [Citace: 5. Prosinec 2019.] <https://www.mou.cz/co-jsou-nadory/t2174>.
13. **Beránek, Martin.** *Molekulární genetiky pro bioanalytiky.* Praha : Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.

14. Sekvenování nové generace. *www.labguide.cz.* [Online] [Citace: 5. Leden 2020.] <https://labguide.cz/sekvenovani-nove-generace/>.

15. Klasické metody sekvenování. *www.labguide.cz.* [Online] [Citace: 6. Leden 2020.] <https://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/>.

16.PCR. *www.labguide.cz.*[Online][Citace:6.Leden2020.] <https://labguide.cz/metody/pcr/>.

17. Technologie sekvenování nové generace: celogenomové, celoexomové a cílené – hotspot – sekvenování . *www.prolekare.cz.* [Online] 24. září 2018. [Citace: 9. Leden 2020.]<https://www.prolekare.cz/tema/precizni-medicina/detail/technologie-sekvenovani-nove-generace-celogenomove-celoexomove-a-cilene-hotspot-sekvenovani-105628>. ISSN 1803-6597.

18. BRCA1 gene. <https://www.nlm.nih.gov/>. [Online] National Library of Medicine, říjen 2015. [Citace: 15. Prosinec 2019.] <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA1>.

19. ATM gene. <https://www.nlm.nih.gov/>. [Online] National Library of Medicine, Leden 2013. [Citace: 8. prosinec 2019.] <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATM>.

20. BRCA2 gene. <https://www.nlm.nih.gov/>. [Online] National Library of Medicine, říjen 2015. [Citace: 8. prosinec 2019.] <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA2>.

21. BARD1 gene. <https://ghr.nlm.nih.gov/>. [Online] National Library of Medicine, 3. Březen 2020. [Citace: 10. Březen 2020.] <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BARD1>.

22. Doporučení pro sledování žen se vzácnějšími genetickými příčinami nádorů prsu a ovarií. doc.MUDr.Foretová Ph.D, Lenka, a další. 32, Brno : ČLS JEP, 2019. 1802-5307.

23.<https://www.mammaprocentrum.cz/rakovina-prsu-v-cislech/>.*mammaprocentrum.*[Online] MEDICON a.s., 2018. [Citace: 15. Listopad 2019.] www.mammaprocentrum.cz.

24. Standardised primer optimisation and design specification. Mattocks, C a Ward, D. Salisbury : BMJ Publishing Group, 2006. 0022-2593.

25. Kývalová, Marie. Diplomová práce. *Multiplexní amplifikace specifických cílových sekvencí a jejich následné resekvenování za využití platformy sekvenování nové generace (next-generation sequencing, NGS), aplikace v molekulárně genetické diagnostice cystické fibrózy.* BRNO : Marie Kývalová, 2014.

26. Corporation, Agencourt Bioscience. AGENCOURT AMPure XP pro purifikaci produktů PCR. *Protokol.* Beverly : A Beckman Coulter Company. 000387v001.

27.AGENCOURT CleanSEQ Dye-Terminator Removal-přípravek pro odstranění fluorescenčně značených terminátorů. *Protokol.* Beverly : A Beckman Coulter Company. 000600v32.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 - Povolení sběru informací ve FN Plzeň.....	65
---	----

PŘÍLOHY

Příloha 1 - Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Vážená paní

Kristýna Bednaříková

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu lékařské genetiky (ÚLG) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Využití sekvenačních metod při vyšetření hereditárních nádorů prsu a vaječníků*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vedoucí zdravotní laborantka ÚLG souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně provedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené odborné praxe na ÚLG a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým **je Mgr. Tomáš Zavoral, odborný pracovník v laboratorních metodách ÚLG FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

*Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči*

*Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.. 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz
15. 11. 2019*