

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Geny podmiňující hereditární onkologická onemocnění trávicího traktu

Genes underlying hereditary oncological diseases of the digestive tract

Autoři: Eliška Smejkalová

Škola: Česko-anglické gymnázium s.r.o., Třebízského 1010, 370 06
České Budějovice 5

Kraj: Jihočeský kraj

Konzultant: Ing. Barbora Kváčová, PhD. a Mgr. Lucie Starčevská

České Budějovice, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Českých Budějovicích dne 5.3.2025

Eliška Smejkalová

Poděkování

Na tomto místě patří mé upřímné poděkování paní Ing. Barboře Kváčové, PhD., za její odborné vedení, trpělivost a neocenitelnou pomoc při psaní této práce, bez níž by její realizace nebyla možná. Mé poděkování dále směřuje Centru lékařské genetiky za poskytnutí veškerých dat nezbytných pro zpracování tématu. Zvláštní uznání patří také mé konzultantce Mgr. Lucii Starčevské za její cenné rady, konzultace a podporu, které významně přispěly ke konečné podobě této práce.

Anotace

Práce se zaměřuje na dědičné nádorové syndromy a jejich vliv na vznik nádorových onemocnění trávicího traktu. Cílem bylo nejen přiblížit principy karcinogeneze a genetické predispozice, ale také analyzovat konkrétní mutace predispozičních genů prostřednictvím moderních laboratorních metod. Teoretická část poskytuje ucelený přehled dědičných nádorových syndromů, jejich příčin a dědičných mechanismů, včetně praktického významu genetického testování a poradenství. Praktická část zahrnuje zpracování reálných anonymizovaných dat získaných z molekulárně genetických analýz, jako jsou Sangerovo sekvenování a NGS, a jejich následnou interpretaci podle mezinárodních standardů. Práce propojuje teoretické znalosti s praktickými zkušenostmi a přináší cenný vhled do významu genetického výzkumu v klinické praxi, přičemž zároveň poukazuje na význam prevence a povědomí o rizikových faktorech v populaci.

Klíčová slova

gen; tumor (nádor); dědičnost (heredita); trávicí trakt; testování

Annotation

The thesis focuses on hereditary cancer syndromes and their role in the development of gastrointestinal tract malignancies. Its aim was to explore the principles of carcinogenesis and genetic predisposition, as well as to analyse specific mutations in predisposition genes using modern laboratory methods. The theoretical part provides a comprehensive overview of hereditary cancer syndromes, their causes, inheritance mechanisms, and the importance of genetic testing and counselling in clinical practice. The practical section includes the processing of anonymized real-world data obtained from molecular genetic analyses, such as Sanger sequencing and NGS, followed by their interpretation according to international standards. By combining theoretical insights with practical applications, this work highlights the critical role of genetic research in oncology and underscores the importance of prevention and awareness of risk factors within the general population.

Keywords

gene; tumour; inheritance; digestive tract; screening

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Nádorová onemocnění.....	9
2.1.1. Přehled nádorových onemocnění	9
2.1.2. Vznik zhoubných nádorů	10
2.1.2.1. Zhoubné nádorové bujení.....	10
2.1.2.2. Nádorové buňky	10
2.1.2.3. Klíčové geny v procesu vzniku nádoru	10
2.1.2.3.1. Protoonkogeny	10
2.1.2.3.2. Tumor-supresorové geny.....	11
2.1.2.4. Chromozomální translokace.....	11
2.1.2.5. Imunitní systém a nádory	12
2.1.2.6. Základní klasifikace nádorů	12
2.1.2.6.1. Karcinomy	12
2.1.2.6.2. Sarkomy	12
2.1.2.6.3. Germinální nádory.....	13
2.1.2.6.4. Zhoubné nádory z nervové tkáně	13
2.1.3. Šíření zhoubných nádorů.....	14
2.1.3.1. Metastatická preference.....	14
2.1.4. Etiologie a rizikové faktory vzniku nádoru.....	15
2.1.4.1. Faktory vnější – chemické, biologické a fyzikální.....	16
2.1.4.2. Faktory vnitřní (genetické).....	16
2.1.5. Rozdělení nádorových onemocnění podle původu	17
2.1.5.1. Sporadické nádory	17
2.1.5.2. Familiární nádory	17
2.1.5.3. Hereditární nádory.....	17
2.2. Hereditární nádorová onemocnění	18
2.2.1. Principy genetické predispozice k nádorovým onemocněním	18
2.2.1.1. Geny signálních drah.....	18
2.2.1.1.1. Charakteristické znaky buněk při procesu malignizace	19
2.2.2. Dědičnost nádorových syndromů.....	21
2.2.2.1. Autozomálně dominantní dědičnost.....	21
2.2.2.2. Autozomálně recesivní dědičnost.....	23

2.2.3.	Knudsonova teorie dvou zásahů.....	24
2.3.	Molekulárně-genetická diagnostika hereditárních nádorových onemocnění.....	24
2.3.1.	PCR	25
2.3.2.	Sangerovo sekvenování.....	26
2.3.3.	MLPA.....	27
2.3.4.	NGS.....	28
2.3.4.1.	Postup sekvenování NGS	28
2.4.	Hereditární onkologické syndromy trávicího traktu	31
2.4.1.	Nepolypózní syndromy	31
2.4.1.1.	Lynchův syndrom.....	31
2.4.1.1.1.	Predispoziční geny Lynchova syndromu	31
2.4.2.	Polypózní syndromy.....	33
2.4.2.1.	MUTYH – asociovaná polypóza (MAP)	33
2.4.2.1.1.	Predispoziční gen MUTYH – asociované polypózy	33
2.4.2.2.	Familiární adenomatózní polypóza	33
2.4.2.2.1.	Predispoziční gen familiární adenomatózní polypózy	34
2.4.2.3.	Hamartogenní polypózní syndromy	34
2.4.2.3.1.	Predispoziční geny hamartogenních polypózních syndromů.....	34
2.4.3.	Difúzní karcinom žaludku	35
2.4.3.1.	Predispoziční gen k difúznímu karcinomu žaludku	35
2.4.4.	Hereditární pankreatitida.....	36
2.4.4.1.	Predispoziční geny k hereditární pankreatitidě	36
2.4.5.	Ostatní geny podílející se na vzniku karcinomů trávicího traktu.....	36
2.5.	Genetické poradenství a jak dostat prevenci do většího povědomí lidí	38
2.5.1.	Historický vývoj genetického poradenství.....	38
2.5.2.	Právní a etické zásady genetického poradenství	39
2.5.3.	Proces genetického poradenství	39
2.5.4.	Evaluační výsledků genetického poradenství.....	40
3.	Materiál a metody.....	41
3.1.	Zdroj dat	41
3.2.	Odběr a izolace genetického materiálu	44
3.3.	Mutační analýza testovaných genů	44
3.3.1.	Příprava NGS knihoven	44
3.3.2.	Illumina sekvenování	44
3.3.3.	Bioinformatické zpracování získaných dat	45

3.3.4.	Výběr genů spojovaných s dědičnou predispozicí k nádorům trávicího traktu	46
3.4.	Ověřování nalezených variant	47
3.4.1.	Ověřování Sangerovo sekvenováním	47
3.4.2.	Ověřování metodou MLPA	48
4.	Výsledky a diskuze	49
5.	Závěr	59
6.	Použitá literatura	60
7.	Seznam obrázků	68
8.	Seznam tabulek a grafů	69

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou po onemocnění oběhové soustavy nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích, stejně tak i v České republice a jejich incidence v populaci pořád stoupá. Naději však přináší zásadní pokroky v molekulárním výzkumu, které byly v posledních desetiletích rychle implementovány do klinické praxe prostřednictvím nových diagnostických a léčebných metod. Zhoubná nádorová onemocnění představují nejen závažnou zdravotní, společenskou a ekonomickou zátěž, ale jsou především osobní i rodinnou tragédií. Vznik nádoru je velmi individuální, komplikovaný a dlouhodobý proces, který ovlivňuje řada negenetických i genetických rizikových faktorů.

Hlavním cílem mé práce bylo popsat problematiku a testování dědičných nádorových syndromů a vyhodnotit výsledky mutační analýzy predispozičních genů karcinomu trávicího traktu.

V teoretické části práce jsem se zaměřila na vysvětlení procesu vzniku nádoru – karcinogenezi a jeho příčin, na rozdělení onkologických onemocnění a na popis jednotlivých dědičných nádorových syndromů se zaměřením na dědičné dispozice vzniku karcinomů trávicího traktu. Nejen u hereditárních nádorů tohoto typu detailně proberu autozomálně dominantní a autozomálně recesivní dědičnost. V rámci této části práce se zmíním také o Knudsonově teorii dvou zásahů, jež vysvětluje, jak genetické mutace přispívají k rozvoji rakoviny. A v neposlední řadě jsem věnovala pozornost i genetickému testování a poradenství, které hraje klíčovou roli v objasnění dědičných příčin vzniku nádoru.

V praktické části jsem popsala principy metod využívaných k mutační analýze genů zodpovědných za vznik nádorového onemocnění a vyhodnotila výsledná data získaná testováním rizikových pacientů Centra lékařské genetiky s.r.o. Zde bylo zásadní seznámit se s principy a postupy hodnocení získaných variant v testovaných genech, jejich klasifikací a zápisem dle The Human Genome Variation Society (HGVS) nomenklatury. Všechna data jsem analyzovala v anonymizované formě, pod číselnými kódy, tak, aby byla dodržena zákonná povinnost na ochranu osobních dat a splněna povinnost ochrany citlivých údajů zdravotnickým zařízením.

Hlavním pramenem mé práce byla odborná publikace autorského kolektivu vedeného Lenkou Foretovou, Evou Macháčkovou a Renatou Gaillyovou – Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi, jejímž předmětem bylo přinést přehledné informace o dědičných nádorech různého typu, které mohou využít všichni lékaři různých oborů medicíny.

Věřím, že moje práce bude přínosem v představení této problematiky mladé generaci a impulsem k zamyšlení se nad faktory, které mohou vést k rozvoji nádorového onemocnění.

2. Teoretická část

2.1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění, často zmiňovaná pod pojmem rakovina, představují jednu z nejzávažnějších zdravotních hrozeb současné společnosti. Jedná se o onemocnění, které je způsobeno z naší vlastní tkáně. Jeho vznik je velmi komplexní a komplikovaný proces provázený genetickými změnami buněk. Bez léčby vede ve většině případů ke smrti, proto je časná diagnóza stěžejní. Výzkum v této oblasti je velmi důležitý a jeho výsledky jsou rychle zaváděny do klinické praxe a pomáhají identifikovat osoby se zvýšeným rizikem ještě před vznikem samotného nádoru [1].

Rakovina či zhoubný nádor? Dva pojmy označující stejnou diagnózu, avšak vnímají to tak všichni? Pan doktor Žaloudík ve své knize *Vyhněte se rakovině aneb prevence zhoubných nádorů pro každého* popisuje své setkání s pacientkou, kde narazil na podobný případ. „Pane doktore, tak co jsem to tam měla?“, ptala se ho pacientka po operaci. „Měla jste tam malý zhoubný nádor,“ odpověděl jí. A pacientka nakonec na to, „No tak to jsem si oddechla, zaplať pánbůh, že to nebyla rakovina.“ [2] Z tohoto rozhovoru vyplývá, že ne pro všechny lidi mohou tyto dva názvy znamenat totéž a že slovo rakovina přináší větší obavy než pojem zhoubný nádor. Nicméně touto tematikou se zabývat v mé práci nehodlám.

2.1.1. Přehled nádorových onemocnění

Tabulka 1: Přehled nádorových onemocnění.

Kategorie	Vybrané typy rakoviny
související s AIDS	lymfom, Kaposiho sarkom
CNS	primární CNS lymfom, neuroblastom
gynekologické	rakovina děložního hrdla, ovariální rakovina
hematologické	leukémie, lymfom, myelom
gastrointestinální	rakovina tlustého střeva, žaludku, jícnu, ...
genitourinární	rakovina močového měchýře, prostatická rakovina
hlava a krk	rakovina ústní dutiny, nasofaryngeální rakovina
respirační/torakální	rakovina plic, maligní mezoteliom
kožní	melanom, Kaposiho sarkom
neurologické	mozkový nádor, astrocytom
muskuloskeletální	osteosarkom, Ewingův sarkom
oči	intraokulární melanom, retinoblastom
neuroendokrinní	neuroendokrinní tumor, pheochromocytom
jiné	myelodysplastické syndromy

(Zdroj: National Cancer Institute, *Cancer by Body Location*, <https://www.cancer.gov/types/by-body-location>)

2.1.2. Vznik zhoubných nádorů

Za zdravou buňku považujeme tu buňku, jež má odpovídající strukturu a tvar, plní svou funkci, tedy se dělí na buňky dceřiné a reaguje na podněty z okolí. Pokud však dojde při replikaci DNA (deoxyribonukleové kyseliny) k náhodné změně, vzniku mutace, může se stát tato buňka buňkou citlivější a příležitostně se nekontrolovatelně dělit (proliferovat). Z dceřiných buněk se tak stane buňka rezistentní ke vnějším signálům a vykazuje znaky malignity (zhoubnosti) [1].

2.1.2.1. Zhoubné nádorové bujení

Současné názory označují zhoubné nádorové bujení jako onemocnění, které představuje trvalou poruchu genetického kódu buněk. Tento typ bujení může vzniknout v jakékoli tkáni či orgánu a je výsledkem procesu známého jako zhoubná přeměna buněk. Tato přeměna znamená, že buňka se odchyluje od svého původního účelu v organismu a začíná se chovat nezávisle, upřednostňujíc vlastní prospěch, což se projevuje již zmiňovanou nadměrnou proliferací. Růst těchto buněk narušuje funkce organismu, neboť se šíří a využívá jeho zdroje, čímž poškozuje jeho normální činnosti. Nádorové buňky sice disponují schopností neomezeného dělení, ale jsou na svém hostiteli závislé. V důsledku toho může zhoubný nádor vést k postupnému vyčerpání organismu a jeho smrti [2].

2.1.2.2. Nádorové buňky

Vznik zhoubných nádorů nezpůsobuje pouze jeden typ nádorových buněk. Jen část projevuje svou vysokou mitotickou aktivitu, další přežívá v nedostatku živin či špatném zásobení kyslíkem a jiné zase v klidovém režimu a čekají na nějaký stimul, aby se „probudily“. Některé nádorové buňky se prosazují méně, některé více, ale u všech můžeme mluvit o tzv. klonální selekci, kdy se projeví bohužel zpravidla ty životaschopnější a agresivnější buňky [2].

2.1.2.3. Klíčové geny v procesu vzniku nádoru

Existují však dvě skupiny genů hrající hlavní roli ve vzniku nádoru. Jsou jimi protoonkogeny a tumor-supresorové geny. Tyto geny řídí životní cyklus buňky, tj. sled dějů, při kterých se buňka zvětšuje a dělí. Je-li však narušena jejich struktura nebo funkce podporují vznik a vývoj nádoru [1].

2.1.2.3.1. Protoonkogeny

Protoonkogeny jsou geny podporující růst. Pokud dojde k mutaci nebo aktivaci těchto genů, mohou se změnit na karcinogenní onkogeny, které způsobují nadměrné množení buněk. Mutace často vede k tomu, že protoonkogeny produkují nadměrné množství růstového stimulačního proteinu nebo jeho trvale aktivní formu [1, 37].

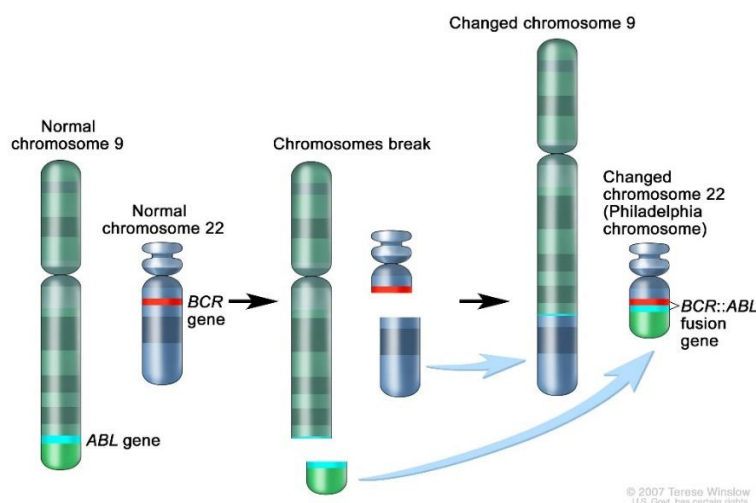
2.1.2.3.2. Tumor-supresorové geny

Na druhé straně tumor-supresorové geny, které dělají pravý opak než protoonkogeny. Supresorový gen je typ genu, jehož hlavní funkcí je potlačovat růst buněk a regulovat buněčný cyklus. Tyto geny obvykle kódují proteiny, které brání nekontrolovanému dělení buněk a pomáhají opravovat poškozenou DNA. Když dojde k mutaci v supresorovém genu, jeho funkce se ztratí, což může vést k neomezenému růstu buněk a rozvoji rakoviny [1, 23].

2.1.2.4. Chromozomální translokace

V neposlední řadě je také nutno mluvit o chromozomálních translokacích. Chromozomální translokace jsou genetické změny, při kterých se část jednoho chromozomu přemístí na chromozom nehomologní (tj. chromozom, který není v páru), případně na jinou pozici téhož chromozomu [38]. Tyto změny mají vážné důsledky pro buněčnou funkci a mohou přispívat ke vzniku nádorových onemocnění. V případě, že translokace způsobí vznik nového fúzního genu nebo změnu umístění regulátorů genů, může dojít k neřízené aktivaci určitých genů, což vede k rakovinnému růstu buněk.

Známým příkladem je translokace mezi chromozomy 9 a 22, jež vytváří Philadelphia chromozom (obrázek 1) a spojuje geny BCR a ABL, což vede k produkci proteinu podporujícího nekontrolovatelný růst buněk, často spojovaného s chronickou myeloidní leukémií (CML) [4].



Obrázek 1: Filadelfský chromozom (Ph chromozom) je abnormální chromozom vznikající, když se části chromozomů 9 a 22 odlomí a vymění si místa. Gen ABL z chromozomu 9 se spojí s genem BCR na chromozomu 22, čímž vznikne fúzní gen BCR::ABL. Změněný chromozom 22, který nese tento fúzní gen, je pak označován jako Filadelfský chromozom.

(Zdroj: National Cancer Institute, Philadelphia chromosome, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/philadelphia-chromosome>)

2.1.2.5. Imunitní systém a nádory

Imunitní systém hraje klíčovou roli v rozpoznání cizorodých a pozměněných buněk a v jejich eliminaci. Buňky imunitního systému přítomné v nádoru mají schopnost rozpoznat určité antigenní odlišnosti mezi nádorovou a zdravou tkání. Tyto buňky, jako jsou T-lymfocyty, NK buňky a makrofágy, se snaží napadnout nádorové buňky, ale i přes tuto identifikaci nejsou schopny účinně zastavit jejich růst. Důvodem je, že nádorové buňky se často vyvíjejí tak, aby se vyhnuly imunitní odpovědi, například produkcí látek, které oslabují činnost imunitních buněk. Navíc prostředí kolem nádoru může negativně ovlivnit schopnost bílých krvinek fungovat, což ztěžuje jejich úsilí o eliminaci nádoru. Proto i když imunitní systém rozpozná přítomnost nádoru, nedokáže ho účinně zastavit [2, 17, 18].

2.1.2.6. Základní klasifikace nádorů

Nádory můžeme dělit podle míry nebezpečí na maligní a benigní, kde u maligních nádorů se buňky vracejí do embryonálního stádia, vykazují různé stupně zralosti, infiltrují se do okolních tkání a krevní nebo lymfatickou cestou se dostávají do vzdálených míst, kde tvoří sekundární nádory – metastáze. Zatímco benigní nádory připomínají zralou tkáň, ale buňky se neúměrně namnoží. Jsou ostře ohraničeny od okolní tkáně [1].

Dále můžeme nádory rozlišovat podle tkáně, kde vznikají, tedy na karcinomy, sarkomy, germinální nádory a zhoubné nádory z nervové tkáně (obrázek 2).

2.1.2.6.1. Karcinomy

Karcinom je nejčastější typ rakoviny vznikající z buněk slizničních výstelek dutých orgánů. Tyto výstelky najdeme v soustavě dýchací, trávicí, dále ve žlučníku a v močových a pohlavních cestách. Může se však zformovat také ze žlázových buněk svým nahromaděním, jež tvoří tzv. parenchymatózní orgány a žlázy. K nim patří mimo jiné slinivka břišní, plíce, ledviny, játra, slinné žlázy a štítná žláza. Nesmíme ovšem zapomenout na žlázovou složku prsu, tedy na mléčné žlázy nebo na žlázy prostaty [2].

2.1.2.6.2. Sarkomy

Za sarkomy považujeme ty zhoubné nádory, které vycházejí z pojivových tkání, tedy z buněk svaloviny, vaziva, chrupavky, kloubní výstelky či kosti. Kostní sarkomy nejsou nejčastějším nádorovým ložiskem v kostech (ty jsou spíše vzácné), ale jsou jimi metastázy karcinomů pocházející především z rakoviny prostaty, prsu, plic nebo ledvin [39].

Jejich název pochází slova *sarx* neboli maso, protože na řezu pod mikroskopem vypadá právě jako rybí maso. Neplatí to ale ve 100 %. Existuje mnoho druhů sarkomů. Některé připomínají

právě rybí maso, další mohou být křehké až rosolovité, jiné zase tuhé či houbovité, tvořené velmi nestejnorodou tkání nebo naplněné krví. Ve skutečnosti představují asi jedno procento všech zhoubných nádorů, což je oproti karcinomům stonásobně méně.

Lze je najít kdekoli v těle, často jsou v dutině břišní a mívají až váhu několika kilogramů [2].

2.1.2.6.3. Germinální nádory

Tento typ nádoru pochází ze zárodečných tkání, jež se nachází u žen ve vaječnících a u mužů ve varlatech. Nemusí se objevovat pouze v těchto pohlavních orgánech. Poté mluvíme o tzv. extragonadálních germinálních nádorech. Je tomu tak, protože v průběhu vývoje člověka se tato zárodečná tkáň posouvá a vyžívá v ony pohlavní žlázy (gonády) ze zadní části břišní dutiny podél páteře.

Germinální nádory se vyskytují spíše v mladším věku a jsou velmi agresivní a rychle se šíří. Naději však přináší fakt, že jsou velmi citlivé na chemoterapii, a tak je možno je vyléčit i ve velmi pokročilém stádiu. Jako u sarkomů je jich stokrát méně než karcinomů [2].

2.1.2.6.4. Zhoubné nádory z nervové tkáně

Posledním typem zhoubných nádorů podle tkáně, ve které vznikají, jsou nádory z nervové tkáně. Tyto nádory se objevují jak v mozku, tak v nervových gangliích, především v okolí páteře. Mozkové nádory představují asi 1-2 procenta všech zhoubných nádorů a registrujeme jich asi 700 za rok. Bohužel se jedná o onemocnění velmi zřídka vyléčitelné. Je to hlavně díky špatnému umístění, protože jeho výskyt je v těsné kostěné schránce, kde každý nárůst nádoru znamená další tlak na lebku.

Jak již bylo řečeno u karcinomů, nádory nevznikají pouze z jednoho typu tkáně. Ve většině případů totiž nejde o již zmiňovanou nervovou tkáň, ale o podpůrné buňky mozkové tkáně, které nevedou přímo nervové vzruchy. Tyto buňky však hrají zásadní roli v normálním fungování mozku a bez nich by mozek nemohl efektivně pracovat [2].

Výchozí tkáň		Zralé benigní buňky (nezhoubné)	Nezralé maligní buňky (zhoubné)
epitel	povrchový	papilom	karcinom
	žlázový	adenom	adenokarcinom
Pojivo	kolagenní	fibrom	fibrosarkom
	tukové	lipom	liposarkom
	chrupavka	chondrom	chondrosarkom
	kost	osteom	osteosarkom
	Sval	myom	myosarkom
	Cévní	angiom	angiosarkom
Krvetvorná lymfatická		mononukleóza?	leukemie lymfom, myelom
Nervová	centrální	gliom	glioblastom
	periferní	ganglioneurom paragangliom	neuroblastom maligní paragangliom
Zárodečná		gonadoblastom	seminom dysgerminom
		teratom zralý	teratom nezralý

Obrázek 2: Základní klasifikace nádorů

(Zdroj: Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, *Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy*, https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html)

2.1.3. Šíření zhoubných nádorů

Rakovinné buňky se v těle šíří v několika krocích. Nejprve rostou do okolní zdravé tkáně a mohou ji invadovat. Následně se přesouvají skrze stěny sousedních lymfatických uzlin nebo krevních cév. Poté putují lymfatickým systémem a krevním oběhem do různých částí těla. Když dorazí na vzdálené místo, zastaví se v malých krevních cévách, proniknou do jejich stěn a dostanou se do okolní tkáně. Tam pokračují v růstu, až se vytvoří malý nádor. Tento proces také podněcuje vznik nových krevních cév, které zajišťují potřebnou zásobu krve pro další růst metastatického nádoru (obrázek 3) [40].

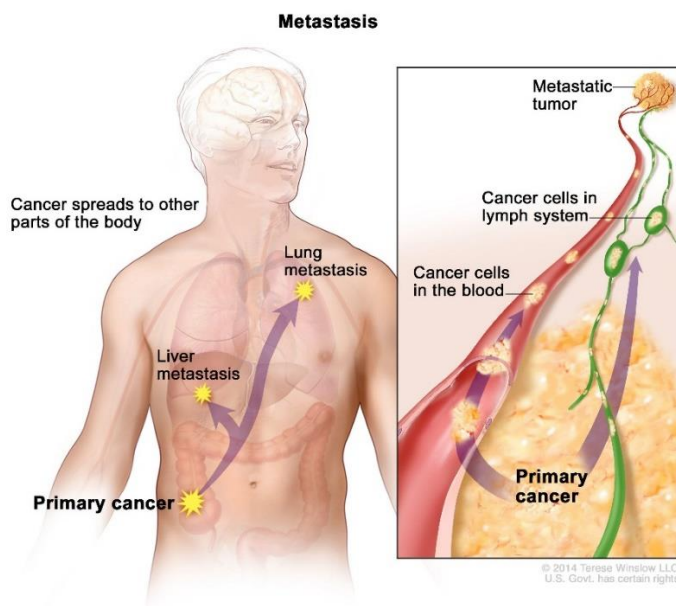
I když většina šířících se rakovinných buněk během této cesty zaniká, za příznivých podmínek mají některé schopnost tvořit nové nádory v jiných částech těla. Navíc mohou metastatické rakovinné buňky zůstat v inaktivním stavu na vzdálených místech po mnoho let, než se případně znovu začnou množit [5].

2.1.3.1. Metastatická preference

Zhoubný nádor se označuje jako takový především pro svou schopnost šířit se do okolních tkání a orgánů, z nichž vzešel. Tento typ rakoviny je klasifikován jako metastazující (metastáze). U mnoha typů rakoviny je rovněž pojmenován – rakovina ve stadiu IV (4). Naopak za nezhoubné nádory považujeme ty, jež rostou pouze v té oblasti, kde vznikly, i když se někdy nacházejí na místech, kde mohou způsobit tlak na jiné tkáně či orgány. Za typický příklad můžeme považovat dutinu lebeční [2].

Při různých vyšetřeních mohou lékaři poznat a zjistit, zda mají metastatické nádorové buňky stejné vlastnosti jako buňky tzv. primárního nádoru, a ne jako buňky v místě, kde se metastatický nádor nachází. To znamená, že pokud má pacient rakovinu žaludku, která se rozšíří do střev, bude tato rakovina považována za metastatickou rakovinu žaludku, protože primárně vznikla právě v této oblasti. Bohužel se v některých případech pacienti nedozví primární původ své rakoviny. Tento stav je pojmenován CUP, tedy Cancer of Unknown Primary [5].

Nejčastěji se nádory tvoří v játrech, plicích, kostní dřeni, mozku, případně na pohrudnici či pobřišnici, ale výjimečně v ledvinách. Je tomu tak, protože i když ledvinami protéká pětina krevního objemu a tyto buňky tak mají prostor se v hojném množství zachytit, prostředí v ledvinách jim moc nevyhovuje. Naopak v podstatně menších nadledvinách se nádory mohou vyskytovat častěji. Tomuto výběru prostředí se říká metastatická preference [2].



Obrázek 3: Metastáze a jak se šíří tělem

(Zdroj: National Cancer Institute, *Metastatic Cancer: When Cancer Spreads*, <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>)

2.1.4. Etiologie a rizikové faktory vzniku nádoru

Nejvýznamnější skupinou rizik v etiologii nádorů jsou až v 80-90 % vnější vlivy. Jedná se převážně o faktory životního stylu, které může jednotlivec ovlivnit. Tyto vnější faktory jsou velmi komplexní a jejich skutečný význam je možné určit tzv. populačním atributivním rizikem, které demonstruje poměr nádorů, jejichž vznik lze přičíst vlivu konkrétní expozice nebo charakteristiky. Zahrnuje jak informaci o výskytu dané expozice v populaci, tak i tzv. relativní riziko (RR), tedy ukazatel vystihující vztah mezi expozicí rizikovému faktoru a zdravotním následkem (obrázek 4). Může odhadovat poměr nádorů v populaci, kterým by se

dalo zabránit, pokud by byla expozice redukována či dokonce eliminována [6]. Mezi hlavní ovlivnitelné rizikové faktory pro vznik nádorů patří kouření, obezita, nadměrná konzumace alkoholu a nevhodná strava [6, 41].

Faktor	Podíl na nádorové mortalitě (%)
tabák	30
strava a výživa včetně obezity	35
alkohol	5
nízká pohybová aktivita	5
infekce	5
profesionální expozice	3
reprodukční faktory	3
ionizující a UV záření	2
znečištění životního prostředí	2
lékařské procedury	1

Obrázek 4: Podíl nádorové mortality (v rozvinutých zemích) přisuzovaný vlivu specifických faktorů nebo skupině faktorů.

(Zdroj: Foretová, Macháčková a kolektiv, *Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi*, 2022)

2.1.4.1. Faktory vnější – chemické, biologické a fyzikální

Tabákový kouř je silně karcinogenní a zvyšuje riziko nádorů v různých tkáních (obrázek 4). Incidence nádorů plic a průdušek se sice od roku 1997 snižuje, ale je stále třetím nejčastějším nádorovým onemocněním mezi muži a ženami. Dokonce i rakovina slinivky břišní a kolorekta, pro mě důležitá v této práci, může vzniknout díky tomuto zlovyku [42]. Výživa hraje rovněž důležitou roli. Například strava bohatá na červené maso zvyšuje riziko kolorektálních nádorů, zatímco konzumace ovoce a zeleniny ho snižuje. A v neposlední řadě také alkohol, který představuje zásadní faktor pro nádory celého trávicího traktu.

Biologickým faktorem jsou infekční agens (choroboplodný zárodek), jako jsou viry HPV (*Human papilloma virus*), *Helicobacter pylori* nebo viry hepatitidy B a C, které jsou spojeny s rozvojem specifických druhů nádorů, například karcinomu děložního hrdla nebo jater. Chemické látky včetně některých chemoterapeutik mohou vyvolat sekundární nádory. A fyzikální expozice – UV záření a ionizující radiace zvyšují riziko nádorů kůže a dalších malignit [6].

2.1.4.2. Faktory vnitřní (genetické)

V návaznosti na předchozí biologické, chemické, fyzikální a ovlivnitelné faktory je důležité se nyní zaměřit právě na ty genetické, jež jsou klíčové v mé práci. Genetické změny jsou základem vzniku nádorů, protože ovlivňují důležité buněčné funkce. Růst a dělení buněk, stejně jako

reparační mechanismy DNA. Mutace mohou být dědičné, pokud jsou přeneseny ze zárodečných buněk rodičů, nebo mohou vzniknout během života jako důsledek somatických mutací. Tyto změny mohou vést ke ztrátě kontroly nad buněčnými procesy a podpořit růst nádoru. Kromě mutací mohou genetické faktory zahrnovat epigenetické změny (metylace DNA), které ovlivňují expresi genů a hrají roli v diferenciaci buněk. Kombinace genetických predispozic s environmentálními vlivy a životním stylem může výrazně ovlivnit riziko vzniku rakoviny [6].

2.1.5. Rozdělení nádorových onemocnění podle původu

2.1.5.1. Sporadické nádory

U pacientů trpících rakovinou lze také zjistit, jaký má rakovina původ. Přibližně v 70 % případů v populaci se jedná o nádorové onemocnění, jež vzniklo bez dalších případů onemocnění v rodině neboli sporadicky. Důvodů pro tento sporadický výskyt nádorů je mnoho, ale většinou se jedná o kombinaci nevhodné stravy, vnějšího prostředí, stárnutí organismu, ale především díky náhodným jevům v metabolických procesech buňky a kumulaci somatických mutací v buňce [6,7].

2.1.5.2. Familiární nádory

Zhruba 15–25 % případů rakoviny spadá do kategorie familiární formy. Některé běžné typy, jako je rakovina prsu, vaječníků, tlustého střeva a prostaty, se mohou vyskytovat u více členů rodiny, ale to ještě neznamená, že mají výhradně dědičné příčiny. Může se stát, že i když se u rodinných příslušníků objeví stejný typ rakoviny, u některých propukne až v pozdějším věku. I když se familiární rakovina shromažďuje v rodině, zdá se, že ji nezpůsobuje změna jednoho specifického genu. Spíše se předpokládá, že je výsledkem různých faktorů. Kombinace několika genů a dalších vlivů, jako je strava a fyzická aktivita, výrazně zvyšuje riziko vzniku rakoviny [6,7].

2.1.5.3. Hereditární nádory

A zbývajících 5–10 % pacientů má genetické neboli hereditární predispozice k nádorovým onemocněním. Hereditární nádorové syndromy jsou charakterizovány hromaděním specifických maligních nádorů v několika generacích, jejich výskytem v mladém věku a častou přítomností vícečetných primárních nádorů. Hlavní příčinou těchto syndromů je zárodečná mutace v jednom z predispozičních genů, která významně zvyšuje riziko rozvoje určitého typu nádoru. Mutace je přítomna ve všech buňkách jedince a zvyšuje pravděpodobnost výskytu nádorů až 50násobně. Tyto syndromy jsou fenotypově velmi různorodé. Jedna mutace může vést k různým syndromům, zatímco mutace v různých genech mohou způsobit podobné projevy [6,7].

2.2. Hereditární nádorová onemocnění

2.2.1. Principy genetické predispozice k nádorovým onemocněním

Jak již bylo zmíněno výše, nádorové onemocnění je velmi komplexní a složitou skutečností, jež je vždy zapříčiněno genetickým poškozením buňky. Jinými slovy, nádorové onemocnění vzniká v somatické buňce organismu, která prochází sérií mutačních změn. Mezi ně mimo jiné patří již zmiňované protoonkogeny (geny podporující růst) a supresorové geny (geny potlačující proliferaci buněk). Dalšími mutačními změnami mohou projít i geny reparačních drah, které napomáhají buňce „opravovat“ mutace po poškození DNA. A v neposlední řadě také geny signálních drah, jimiž se bude zabývat následující podkapitola [6].

2.2.1.1. Geny signálních drah

Genetické změny v nádorových buňkách jsou vždy spojené s porušením signálních drah, kdy regulační mechanismy přestávají mít nad nimi kontrolu. Buněčná signalizace umožňuje komunikaci buněk s prostředím a řídí procesy jako je růst, diferenciace nebo buněčnou smrt [43]. Klíčový princip této signalizace spočívá v tom, že buňky přijímají signály z okolí pomocí receptorů. Aktivace těchto receptorů umožňuje přenos signálu z povrchu buňky k efektorovým složkám uvnitř. Receptory mají vazebná místa specifická pro určité signální molekuly neboli ligandy, kam patří například růstové faktory nebo adhezivní molekuly.

Buňky v různých tkáních mohou mít podobné receptory pro identické ligandy, ale odpověď na signál se může v různých tkáních lišit. Z funkčního hlediska existují tři hlavní typy membránových receptorů: iontové kanály, receptory sprzęžené s G-proteiny a enzymatické receptory.

Signální dráhy jsou zásadní pro fyziologické funkce buněk, ale mutace v těchto drahách často vedou k nekontrolovanému buněčnému růstu, což je typické pro nádorové buňky. Ve většině případů jde o somatické mutace vedoucí nádorům somatického typu. Mezi často mutované geny patří *EGFR* (receptor epidermálního růstového faktoru), *Ras* a *PIK3CA*, které ovlivňují signály spojené s růstem buněk a buněčným cyklem.

K nádorové transformaci mohou přispívat i mutace, které inaktivují negativní regulátory signálních drah, jako je *APC* nebo *TP53*. Tyto geny obvykle regulují zastavení růstu při poškození DNA, takže jejich inaktivace umožňuje buňkám růst i s genetickými chybami [6].

2.2.1.1.1. Charakteristické znaky buněk při procesu malignizace

Během let 2000-2011 Hanahan a Weinberg definovali deset charakteristických znaků, které buňky získávají, když se z nich stávají buňky maligní.

Soběstačnost – růst bez podpory růstových signálů

Buňky v našem těle pracují ve vzájemné koordinaci, neustále spolu komunikují a ovlivňují se. Buněčný cyklus je pečlivě kontrolován prostřednictvím mitogenních signálů, které často zahrnují růstové faktory z okolního prostředí. Tyto signály přijímají receptory na povrchu buňky, odkud jsou dále přenášeny signálními drahami do jádra, kde aktivují transkripci genů potřebných k zahájení proliferace. Na rozdíl od běžných buněk však nádorové buňky nepotřebují vnější růstové faktory. Dokáží obejít regulační mechanismy buď tím, že produkují vlastní růstové signály, nebo narušením receptorů a signálních drah, což jim umožňuje neustálou stimulaci k dělení.

Necitlivost k signálům zastavujícím dělení

Buněčný cyklus obsahuje několik klíčových kontrolních mechanismů, které zajišťují správný průběh dělení a stabilitu genetického materiálu dceřiných buněk. Kontrolní bod na rozhraní fází G1 a S zastavuje cyklus v případě, že je DNA poškozena, aby se zabránilo její replikaci během syntetické fáze. Kontrolní bod mezi fázemi G2 a M prověřuje replikovanou DNA a brání zahájení mitózy, dokud není replikace dokončena a opravy chyb provedeny. Nádorové buňky se stávají necitlivými vůči signálům, které obvykle zastavují buněčný cyklus, což způsobuje, že se dělí rychleji. Tento proces vede ke kumulaci genetických chyb a zvyšuje jejich schopnost proliferace.

Invazivita

Invazivita, tedy schopnost metastázovat, často vzniká v důsledku narušení funkcí adhezních molekul a poškození vazeb na extracelulární matrix a cytoskelet. Adhezní interakce jsou zásadní nejen pro propojení buněk mezi sebou, ale také pro přenos signálů, které ovlivňují různé buněčné odpovědi, včetně regulace buněčného cyklu, imunitní odpovědi, procesu „rozhodnutí“ buněk, čím budou (diferenciace) a indukce programované buněčné smrti. Mezi hlavní adhezní molekuly patří selektiny, integriny, kadheriny a imunoglobuliny. Mutace v genech, které tyto adhezivní molekuly produkují, mohou narušit soudržnost nádorových buněk a usnadnit jejich uvolnění z primárního nádoru, což vede k šíření do okolních oblastí.

Nesmrtelnost – nekonečná dělení

Somatické buňky, které dosáhly diferenciace, procházejí během svého života jen omezeným počtem buněčných cyklů, což je dáno takzvanými molekulárními hodinami. Tyto buňky mají své životnosti řízené telomerami, což jsou nekódující sekvence umístěné na konci chromozomů, které se při každém dělení zkracují. Jakmile buňky dosáhnou maximálního počtu

cyklů, vstupují do stavu nazývaného senescence, kdy se ocitají v nevratné G1 fázi a nemohou se vrátit do aktivního cyklu. V této fázi zůstávají buňky s minimální metabolickou aktivitou a nízkou spotřebou živin. Nádorové buňky mechanismy způsobující senescenci, jako je například proces stárnutí, při kterém se vyčerpají možnosti dělení, obcházejí a mohou se dělit neomezeně, přestože v nich dochází k akumulaci mutací způsobených nekontrolovaným dělením.

Zajištění přísunu živin (angiogeneze)

Angiogeneze je proces, který umožňuje růst nových krevních cév a zajišťuje nádorům přístup k živinám. Rychle rostoucí nádor by bez dostatečného přísunu živin trpěl a mohl by odumřít. Tento proces je stimulován nedostatkem kyslíku (hypoxií) a probíhá nekoordinovaně, což vede k vytvoření abnormální cévní sítě. Tato síť může způsobovat časté krvácení nebo vznik krevních sraženin.

Apoptóza

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je proces, který je řízen specifickými geny a signálními dráhami a který vede k sebeustrukci poškozených buněk. Během tohoto procesu se buňky zmenšují, chromatin kondenzuje a fragmentují se na apoptická tělíska, jež jsou pohlcována imunitním systémem. Apoptóza hraje klíčovou roli ve správném vývoji organismu a v odstraňování buněk ohrožujících jeho celistvost.

Narušení energetického metabolismu v nádorových buňkách

Nádorové buňky často získávají energii jiným způsobem než „normální buňky“. Bylo zaznamenáno, že u nádorových buněk dochází k aerobní glykolýze, což se označuje jako Warburgův efekt. Tento jev vede k narušení Krebsova cyklu a umožňuje nádorovým buňkám vyrovnat se s vyššími metabolickými nároky, které vznikají v důsledku jejich rychlé proliferace.

Vychytralost nad imunitním systémem

Imunitní systém hraje klíčovou roli v rozpoznávání a eliminaci cizorodých abnormálních buněk. Již v 50. letech 20. století bylo prokázáno, že imunitní systém dokáže identifikovat nádorové buňky díky přítomnosti specifických nádorových antigenů. Tyto antigeny slouží jako signály pro imunitní dohled nad buněčnými změnami v organismu. Nádorové buňky však mohou uniknout detekci imunitním systémem buď ztrátou těchto antigenů na svém povrchu, nebo vyvoláním imunosuprese, což oslabuje imunitní odpověď.

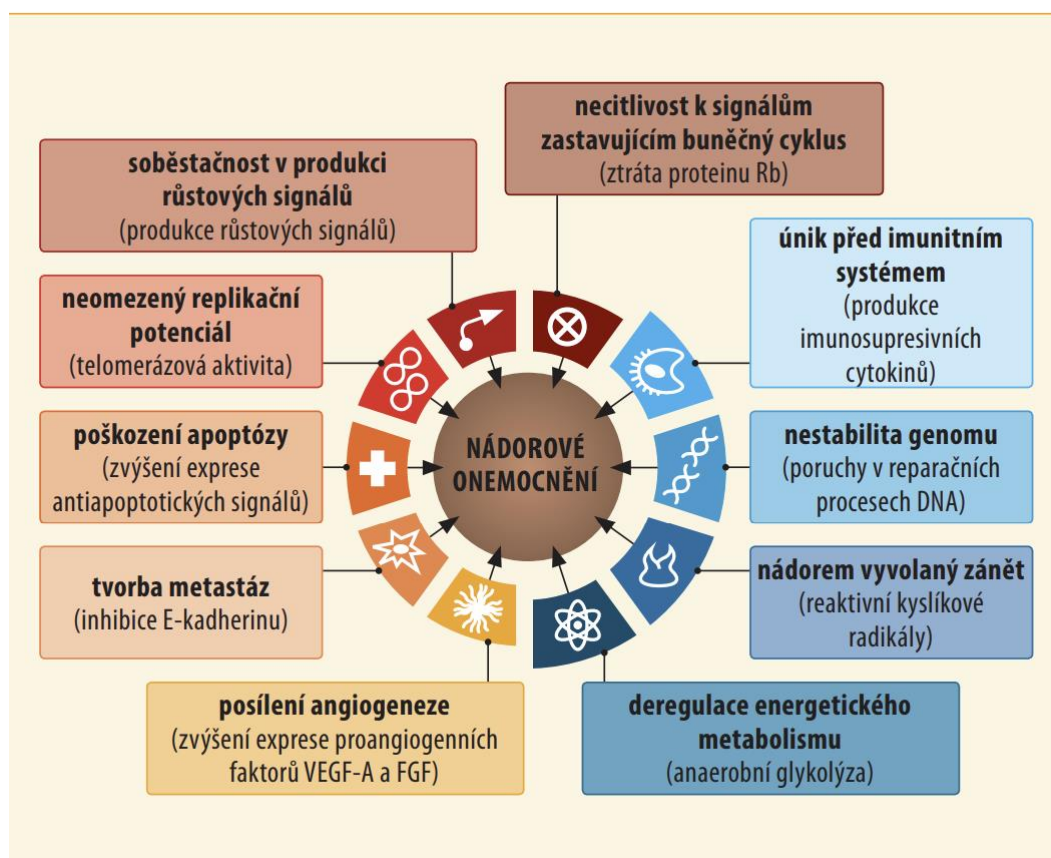
Nestabilita genomu

Stabilita genomu buněk je zajišťována různými mechanismy, které umožňují identifikaci a opravu poškozené DNA. V případech závažného poškození mohou tyto mechanismy vyvolat senescenci nebo apoptózu. Naproti tomu nádorové buňky často nemají funkční reparační dráhy a vyhýbají se tak kontrolním mechanismům během buněčného cyklu. Mutace v genech

zodpovědných za opravy DNA vedou k hromadění mutací a destabilizaci genomu. Mnoho dědičných nádorových syndromů vzniká právě vlivem germinálních mutací v těchto genech.

Zánět

Zánětlivé procesy v okolí nádorových buněk mohou přispět k rozvoji rakoviny. Chronický zánět je spojen s rizikem vzniku nádorových onemocnění a u některých typů nádorů může dokonce předcházet jejich vzniku. Zánět se často vyvíjí v reakci na nádorové změny a může stimulovat proliferaci, angiogenezi a migraci buněk, zatímco zároveň oslabuje imunitní odpověď [6,8].



Obrázek 5: Schéma znázorňující procesy vedoucí ke vzniku maligního nádoru.

(Zdroj: Büchler, T. a kolektiv, *Obecná onkologie*, <https://eshop.maxdorf.cz/user/documents/upload/data/dl/Obecná%20onkologie.pdf>)

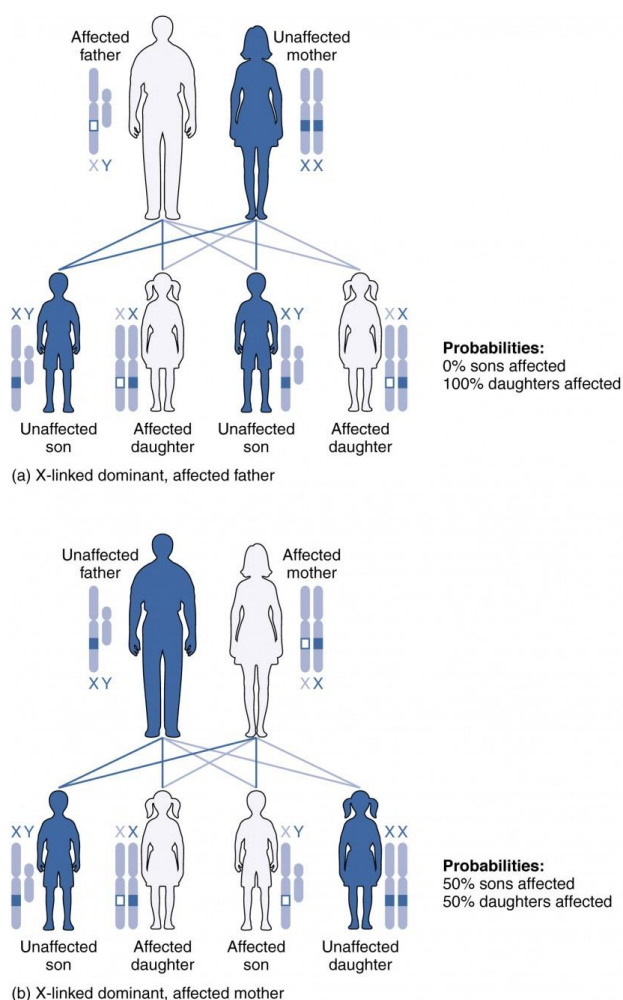
2.2.2. Dědičnost nádorových syndromů

2.2.2.1. Autozomálně dominantní dědičnost

Autozomálně dominantní dědičnost se vyznačuje tím, že pouze jedna kopie mutovaného genu je potřebná k vyvolání fenotypového projevu onemocnění (obrázek 6). To znamená, že jedinci s jednou mutovanou alelou a jednou normální alelou budou vykazovat příznaky onemocnění,

zatímco jedinci s oběma normálními alelami budou zdraví. Většina metabolických poruch, které jsou považovány za autozomálně dominantní, však bývá složitější než jednoduché monogenní rysy. Projevy těchto poruch mohou mít široké spektrum, od mírných až po těžké formy, včetně těch, které mohou být prenatalně fatální. Kromě genetických faktorů mohou být projevy onemocnění ovlivněny také vnějšími faktory.

Skutečná autozomálně dominantní dědičnost je vzácná. Vyskytuje se většinou v dobře regulovaných biosyntetických drahách, kde i malé změny v koncentraci metabolitů mohou mít významný vliv na funkci organismu. Některé poruchy, jako například erythropoetická protoporfyrie, mohou vykazovat pseudodominantní dědičnost, což znamená, že se projevují podobně jako dominantní, ale ve skutečnosti se jedná o recesivní rysy, které jsou důsledkem běžných polymorfismů v populaci. Pro autozomálně dominantní poruchy je tedy důležité zvážit, že i když mutace mohou být klasifikovány jako dominantní, projevy mohou být variabilní v závislosti na dalších genetických a environmentálních faktorech [9].



Obrázek 6: Autozomálně dominantní dědičnost: Dědičné vzory vázané na chromozom X: Graf vzorů dědičnosti X-vázané dominantní poruchy se liší v závislosti na tom, zda (a) je postižen otec, nebo (b) matka.

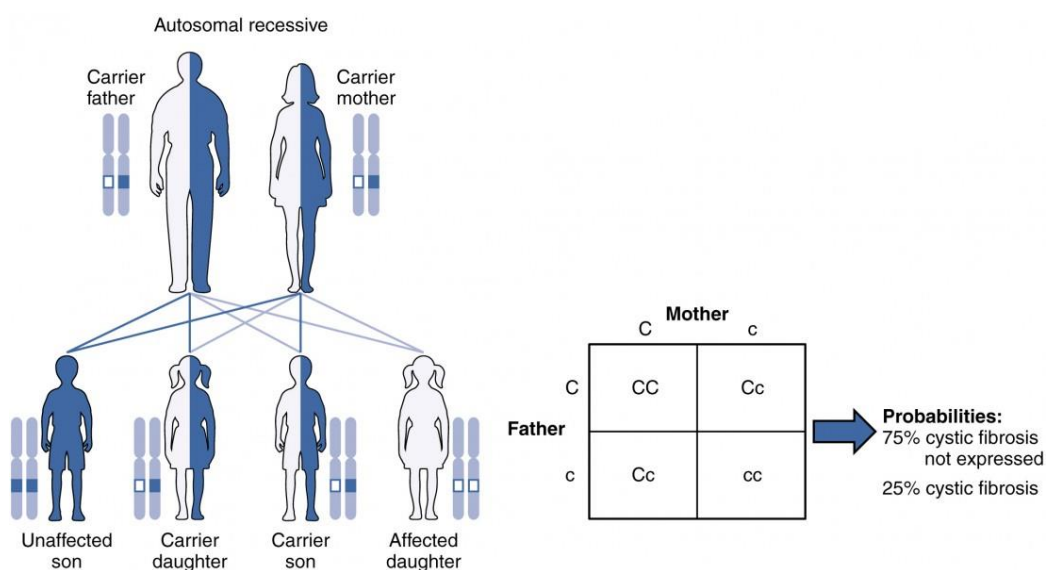
(Zdroj: Rice University, *Anatomy and Physiology 2e*, [https://assets.openstax.org/oscms-prodcms/media/documents/Anatomy and Physiology 2e - WEB_c9nD9QL.pdf](https://assets.openstax.org/oscms-prodcms/media/documents/Anatomy_and_Physiology_2e_-_WEB_c9nD9QL.pdf))

2.2.2.2. Autozomálně recesivní dědičnost

Autozomálně recesivní dědičnost nastává, když je pro projev onemocnění nutné mít dvě kopie mutovaného genu, jednu od každého rodiče (obrázek 7). Jedinci s jednou mutovanou alelou obvykle nevykazují příznaky onemocnění, což znamená, že jsou nosiči, ale zůstávají zdraví. Tento typ dědičnosti je u mnoha metabolických poruch častější a je typický pro stavy, které vyžadují absenci určitého enzymu nebo proteinu pro vznik klinického obrazu.

V některých případech se projevy autozomálně recesivních poruch mohou lišit v závislosti na různých mutacích v daném genu. Například stejný fenotyp může být výsledkem různých genových variant, což činí hodnocení variability expresivity složitější. Dále je důležité si uvědomit, že i když se některé poruchy zdají být variabilní, jejich autozomálně recesivní dědičnost je obvykle dobře definována.

Pochopení dědičnosti autozomálně recesivních poruch je zásadní pro genetické poradenství, protože většina z těchto onemocnění se dědí podle jednoduchých principů Mendelismu, což usnadňuje predikci rizika pro další generace [9].



Obrázek 7: Autozomálně recesivní dědičnost. Dědičný vzor autozomálně recesivní poruchy u dvou rodičů nositelů odráží pravděpodobnost 3:1 pro projev u potomků.

(Zdroj: Rice University, *Anatomy and Physiology 2e*, https://assets.openstax.org/oscms-prodcms/media/documents/Anatomy_and_Physiology_2e_-_WEB_c9nD9QL.pdf)

2.2.3. Knudsonova teorie dvou zásahů

Knudsonova teorie dvou zásahů, formulovaná v roce 1971, představuje klíčový příspěvek k porozumění tumorových supresorových genů a syndromů predisponujícím k nádorům. Alfred G. Knudson touto teorií poprvé vysvětlil mechanismus dědičného vzniku nádorů na příkladu retinoblastomu (typ rakoviny obvykle se vyvíjející v sítnici oka). I když byly dědičné rysy rakoviny uznávány již před vznikem moderních molekulárně biologických technik, informace o specifických mutacích, které by mohly hrát roli v karcinogenezi, byly v té době stále nedostupné.

Knudson, využívající statistické metody, vyvinul hypotézu dvou zásahů, která vycházela z analýzy pravděpodobnosti výskytu bilaterálního retinoblastomu v závislosti na potřebě jednoho nebo dvou zásahů. Tato hypotéza naznačila, že mutace iniciující nádory mají recesivní charakter, což objasnilo způsob dědičnosti u familiárních případů rakoviny. Pokud jsou obě alely genu RB1 mutovány, protein pRb, jenž působí jako tumorový supresor a reguluje proliferaci buněk, není přítomen, což vede k rozvoji retinoblastomu.

Teorie dále vysvětluje vysokou pravděpodobnost vzniku nádorů v přítomnosti germinální mutace, což může vést k výskytu více nádorových ložisek již v dětství. V případě dědičných forem rakoviny stačí pouze jedna mutace na obou alelách, aby došlo k malignímu zvratu. Mutační zásahy mohou zahrnovat bodové mutace, delece celého lokusu genu (pozice, kterou na chromozomu zaujímá jeden nebo více genů), nebo metylační mechanismy, které potlačují expresi genu. Na rozdíl od toho sporadické formy vyžadují minimálně dva mutační zásahy, přičemž rozvoj onemocnění nastává až po inaktivaci obou alel v somatických buňkách.

Identifikace tumorových supresorových genů a koncept ztráty heterozygotnosti (LOH) byly důsledkem Knudsonova přístupu, a to otevřelo cestu pro další zkoumání v oblasti onkologie. V roce 1986 byla poprvé molekulárně klonována tumor supresorový gen RB1, což dále potvrzuje význam Knudsonovy teorie v oblasti onkologického výzkumu. Tato teorie zůstává zásadní pro pochopení mechanismů nádorového vzniku a pokračuje v inspiraci vědců po celém světě [6, 10, 19].

2.3. Molekulárně-genetická diagnostika hereditárních nádorových onemocnění

Molekulárně-genetické (často nazývané molgen) metody zaznamenaly během poslední dekády zásadní pokrok. V roce 1953 James Watson a Francis Crick objevili strukturu deoxyribonukleové kyseliny ve formě dvoušroubovice, což vedlo k výraznému posunu v genetickém výzkumu. Následně byla v roce 1977 představena Sangerova metoda sekvenování DNA, která umožnila detailní analýzu lidského genomu. Technologie PCR,

vyvinutá v roce 1983, pak umožnila rychlé a efektivní zpracování genetických vzorků. To se ještě urychlilo spojením s kapilární elektroforézou a fluorescenčními značkami. Pokročilé přístroje dnes dokážou analyzovat až 96 vzorků najednou. Zavedení sekvenování nové generace (NGS) znamenalo další zrychlení a zlevnění analýz, což se využívá v diagnostice i výzkumu složitých genetických poruch, včetně rakoviny. Přesto však NGS generuje velké objemy dat, jejichž interpretace může být náročná a zavedení do praxe obtížné.

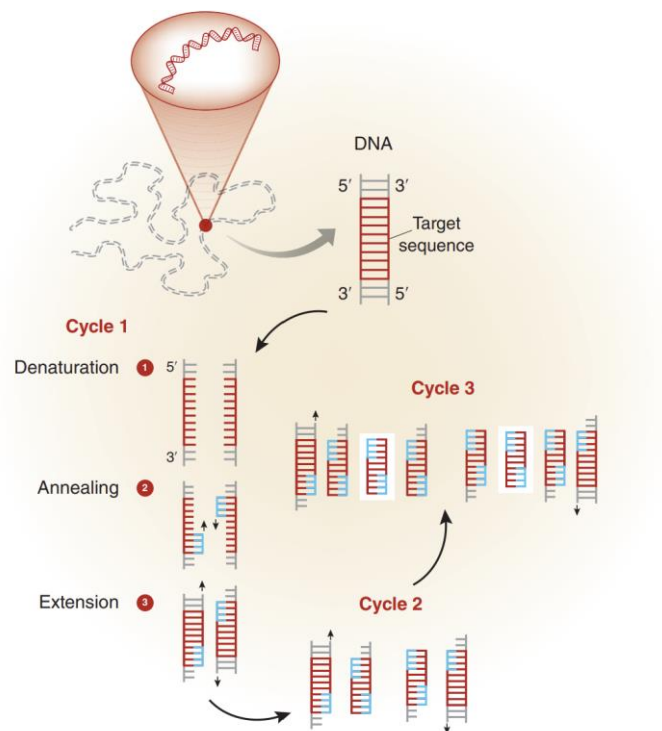
Molekulárně-genetická vyšetření začínají výběrem biologického materiálu, který se použije pro analýzu. Volba materiálu a typ detekovaných mutací závisí na konkrétním vyšetření potřebném pro daného pacienta. Je zásadní rozlišit, zda jde o první vyšetření s cílem najít dosud neznámou mutaci u osoby s podezřením na nádorový syndrom, nebo o potvrzení konkrétní již známé mutace. Pokud se potvrdí germinální mutace, doporučuje se její ověření na dalším vzorku pacienta, ideálně pomocí alternativní metody. Pro interpretaci výsledků je klíčová znalost funkčních důsledků mutací v analyzovaném genu. Laboratorní zpráva pak obsahuje přesný popis mutace, její klinický význam, odhad rizik a případná doporučení pro další testování [6,13].

2.3.1. PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je zásadní technikou v molekulární biologii, která umožňuje rychlou a efektivní amplifikaci specifických fragmentů DNA. Tato metoda se využívá k mnohonásobnému namnožení vybraného úseku DNA a zakládá se na kombinaci několika klíčových komponentů: templátové DNA, primerů, nukleotidů a enzymu DNA polymerázy. DNA polymeráza hraje zásadní roli tím, že spojuje jednotlivé nukleotidy, což umožňuje vytváření nového DNA řetězce.

Primery, což jsou krátké DNA fragmenty, se vážou na cílovou DNA a určují, který úsek bude amplifikován. V průběhu PCR se směs těchto složek umístí do zkumavek nebo 96-well desek a vloží se do přístroje nazývaného termocykler. Tento přístroj provádí cykly amplifikace DNA, které se skládají ze tří základních kroků: denaturace, annealing a prodlužování (obrázek 8).

V prvním kroku se teplota zvyšuje, což způsobí oddělení dvoušroubovice DNA na jednotlivá vlákna. Následně se teplota snižuje, aby se primery mohly navázat na specifické sekvence DNA. Poté se teplota opět zvyšuje, což umožňuje DNA polymeráze přidávat nukleotidy složené z nukleových bází, jako jsou adenin (A), guanin (G), cytosin (C) a thymín (T), čímž se vytvářejí nové DNA řetězce. Tento proces se opakuje, což vede k exponenciálnímu nárůstu kopií DNA; z jedné molekuly je možné získat až 2^n kopií po n cyklech.



Obrázek 8: Schématické znázornění principu polymerázové řetězové reakce.

(Zdroj: Journal of Investigate Dermatology, Polymerase Chain Reaction, <https://scihub.se/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23399825/>)

PCR se dále modifikuje různými způsoby, například pomocí real-time PCR, která umožňuje kvantitativní sledování DNA během amplifikace. Další variantou je alelově specifická PCR, jež se zaměřuje na detekci konkrétních mutací. Pokud je analýza potřebná z RNA, je nejprve nutné přepsat mRNA (messenger) na cDNA (complementary) pomocí reverzní transkriptázy, což pak umožňuje provést amplifikaci (RT-PCR) [6, 13].

2.3.2. Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování je považováno za referenční metodu pro identifikaci mutací a od svého vzniku hraje klíčovou roli v DNA sekvenování. Tato technika určuje přesnou sekvenci nukleotidů v DNA, přičemž základním materiálem je produkt PCR. Sangerova metoda využívá asymetrickou PCR, kde se syntéza DNA iniciuje pomocí jediného primeru, který se váže na cílové fragmenty.

V reakční směsi se kromě běžných deoxynukleosidtrifosfátů (dNTPs) nacházejí také fluorescenčně značené dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTPs), jež fungují jako terminátory syntézy. Tím vzniká směs jednořetězcových fragmentů DNA, které se liší délkou o jeden nukleotid a jsou označeny podle použitého ddNTP. Tyto fragmenty jsou poté analyzovány chromatograficky.

I když je Sangerovo sekvenování stále uznáváno jako zlatý standard, naráží na určitá omezení. Mezi hlavní nevýhody patří potřeba gelů pro separaci fragmentů, což omezuje možnosti analýzy větších sekvencí, a nízký počet vzorků, které lze zpracovat současně. Dále je metoda nákladná, náchylná k chybám a její schopnost detekovat nízké hladiny mutací není dostatečná. Přesto zůstává Sangerovo sekvenování cenným nástrojem pro sekvenaci menších genů a identifikaci specifických mutací [6,14].

2.3.3. MLPA

Metoda MLPA (multiplex ligation dependent probe amplification) je moderní technika, která se velmi osvědčila v klinické diagnostice. Byla poprvé zavedena v roce 2002 a rychle se stala populární pro detekci změn v počtu kopií specifických sekvencí DNA (copy number variation - CNV). Tento přístup je obzvláště užitečný pro geny, kde dochází k intragenovým přestavbám, jež mohou vyvolávat onemocnění, a také k potvrzení výsledků získaných pomocí analýzy CNV technikou NGS v rámci rodinných vyšetření.

Principem MLPA je hybridizace speciálně navržených sond k cílovým sekvencím, obvykle exonům analyzovaných genů. V rámci jedné reakce lze sledovat až 60 různých úseků DNA. Každá cílová sekvence je cílem dvou sousedících sond, jejichž spojení (ligace) je klíčové pro amplifikaci. Na rozdíl od tradiční multiplexní PCR, která vyžaduje více primerů, MLPA využívá pouze jeden pár díky univerzálním sekvencím na koncích sond. Vzniklé PCR produkty se liší délkou v závislosti na cílových sekvencích a následně se analyzují pomocí kapilární elektroforézy.

Tato technika je schopna identifikovat delece a duplikace, které by mohly být obtížně rozpoznatelné standardními PCR metodami, protože mohou přesahovat amplifikované fragmenty a vést k namnožení pouze normálních alel. Porovnáním elektroforeogramů a měřením výšky jednotlivých vrcholů lze určit, které sekvence mají odlišný počet kopií v genomové DNA.

Jednou z výhod MLPA je, že vyžaduje pouze malé množství DNA a je technicky nenáročná. Nicméně MLPA neumožňuje identifikaci konkrétních míst zlomu, což vedlo k použití oligonukleotidových mikročipů pro komparativní genomovou hybridizaci (aCGH), které poskytují přesnější určení hranic deletovaných nebo duplikovaných oblastí.

Další možností je digitální MLPA, která kombinuje MLPA a NGS analýzu pomocí sekvenčních platforem, čímž umožňuje kvantifikaci až 1000 různých cílových sekvencí v jedné reakci [6, 15].

2.3.4. NGS

Technologie sekvenování nové generace (NGS) představuje revoluci v molekulární genetice a klinické diagnostice, díky své schopnosti rychle a efektivně analyzovat rozsáhlé úseky DNA. Zatímco tradiční genetické metody, jako Sangerovo sekvenování nebo PCR, se zaměřovaly na konkrétní a relativně malé oblasti genomu a vyžadovaly časově náročné postupy, NGS umožňuje analyzovat velké množství genetických informací od různých pacientů současně. Například u pacientů s rakovinou mohou mít nádory více mutací a tradiční metody vyžadují provedení několika testů pro různé mutace, což zvyšuje potřebu tkáně. S využitím NGS lze tyto cíle zkoumat v jednom testu, což šetří vzorky tkáně a poskytuje výsledky desítek nebo stovek DNA cílů z jednoho vyšetření. Tento přístup výrazně zkracuje čas potřebný pro genetickou analýzu a umožňuje identifikaci mutací v predispozičních genech spojených s nádorovými onemocněními během dnů až týdnů, místo měsíců či let.

V oblasti dědičných nádorových onemocnění se využívají specializované panely genů, které jsou navrženy tak, aby cíleně detekovaly mutace v genech predispozice k těmto nemocem. Tyto panely zahrnují známé predispoziční geny, jako BRCA1 a BRCA2, které jsou spojeny s vysokým rizikem karcinomu prsu a vaječníků, nebo geny spojené s Lynchovým syndromem, zvyšujícím riziko kolorektálního karcinomu. V České republice je například k dispozici panel CZE CANCA (CZEch CANcer paNel for Clinical Application), který zahrnuje 226 genů spojených s různými dominantními i recesivními syndromy u dospělých, což umožňuje komplexní diagnostiku u pacientů s rodinnou anamnézou nádorových onemocnění. Tento panel je součástí konzorcičního projektu a přispívá do anonymizované databáze, která pomáhá zlepšit pochopení genetických variant specifických pro českou populaci.

Vedle genových panelů se u pokročilých případů využívají metody jako celogenomové sekvenování (WGS) a sekvenování exonů (WES). WES se zaměřuje na sekvenování exonů, tedy těch částí genomu, které kódují proteiny. Exony tvoří pouze asi 2 % celého genomu, ale obsahují přibližně 85 % známých mutací způsobujících choroby, což činí tuto metodu efektivní a ekonomickou při hledání mutací spojených s konkrétními fenotypy. Naopak WGS sekvenuje celý genom, včetně nekódujících oblastí, které mohou obsahovat důležité regulační prvky ovlivňující expresi genů a vznik onemocnění. Díky WGS je možné zachytit genetické varianty, které nejsou zahrnuty v běžných panelech nebo exonech, což je užitečné zejména u pacientů s nejasnou diagnózou, kdy standardní testy nenabídlý odpověď [6].

2.3.4.1. Postup sekvenování NGS

Izolace DNA

Příprava vzorku pro next generation sequencing (NGS) je mnohastupňovým procesem zahrnující v první řadě přípravou templátu. Nejdříve se tedy musí izolovat DNA z biologického vzorku, kterým může zahrnovat krev, tkáň nebo jiné buňky. V některých případech může být

místo DNA izolována RNA, jež je následně reverzně přepsána na cDNA (komplementární DNA), aby mohla být sekvenována.

Fragmentace DNA

Izolovaná DNA je poté fragmentována na menší části. Tato fragmentace spočívá v rozkládání nukleových kyselin prováděná fyzikálními (ultrasonikátorem) či chemickými metodami (enzymaticky) za účelem vzniku úseků o určité velikosti, vhodné pro sekvenaci. Tento děj umožňuje, aby sekvenční technologie četly DNA po částech a následně je sestavily dohromady.

Příprava sekvenační knihovny

Každý fragment DNA je poté připraven do tzv. sekvenační knihovny. Tento krok zahrnuje přidání adaptérů a indexů ke každému fragmentu DNA. Adaptéry slouží jako startovní body pro sekvenaci, zatímco indexy umožňují rozeznání vzorků od různých pacientů, a tak lze provádět analýzu více vzorků v jednom testování.

Amplifikace knihovny

V některých případech se knihovna DNA amplifikuje, tedy mnohonásobně zkopíruje. To zajišťuje, že při sekvenaci bude dostatečné množství materiálu pro přesné čtení každého fragmentu. Amplifikace může probíhat pomocí PCR, která zdvojuje fragmenty DNA.

Sekvenování

Fragmenty DNA jsou nyní připraveny pro samotnou sekvenaci, která probíhá na speciálních sekvenačních přístrojích. Například platformy Illumina používají metodu SBS = sequencing-by-synthesis, kde jsou jednotlivé báze sekvenovány pomocí fluorescence (obrázek 9). Každý přidáný nukleotid emituje signál, jež je detekován a zaznamenán, což vede k přečtení sekvence bází ve fragmentech DNA.

Detekce a čtení

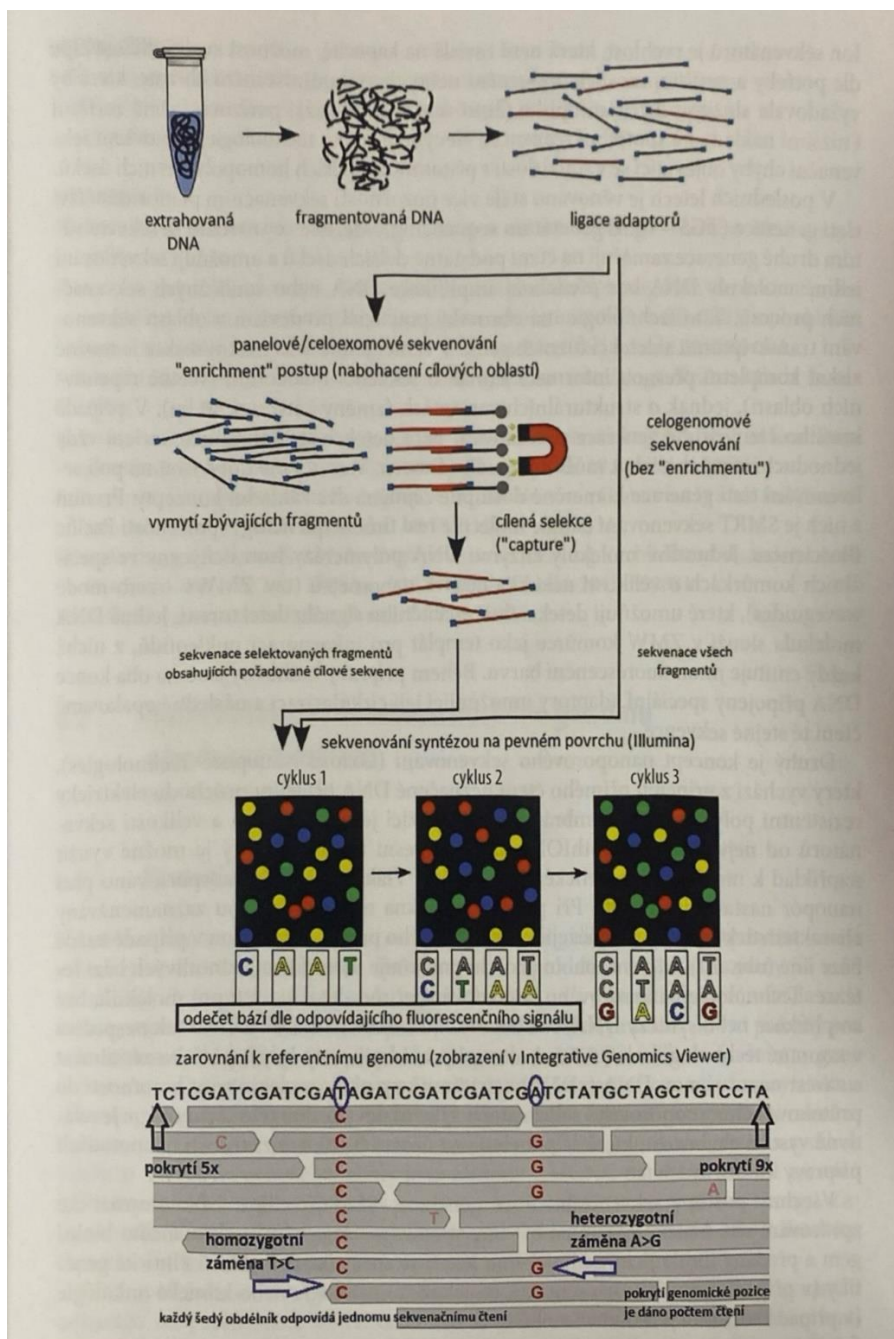
Jakmile sekvenátor dokončí čtení úseků, je výsledkem obrovské množství dat ve formě krátkých sekvencí (tzv. reads). Tyto sekvence jsou zaznamenány a ukládány, obvykle ve formě souborů, obsahující genetickou informaci získanou ze vzorku.

Bioinformatická analýza

Výsledné sekvence je nutné analyzovat. Provádí se to pomocí bioinformatických nástrojů a softwaru. Během této fáze se jednotlivé fragmenty sekvencí zarovnají na referenční genom (obrázek 9), aby bylo možné sestavit celkový obraz DNA. Bioinformatická analýza také identifikuje případné mutace, varianty a jiné genetické změny, které mohou mít význam pro klinickou diagnostiku nebo výzkum.

Interpretace výsledků

Závěrem je nutné získaná data interpretovat. To zahrnuje hodnocení nalezených genetických variant, identifikaci potenciálně patogenních mutací a zhodnocení jejich významu ve vztahu k danému onemocnění nebo predispozici. Tento krok obvykle provádějí specialisté na genetiku a molekulární biologii, kteří výsledky prezentují v kontextu klinického obrazu pacienta [6].



Obrázek 9: Postup sekvenování nové generace (NGS).

(Zdroj: Foretová, Macháčková a kolektiv, *Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi*, 2022)

2.4. Hereditární onkologické syndromy trávicího traktu

Karcinomy trávicího traktu jsou v České republice jedny z nejčastějších zhoubných nádorů. Po rakovině prostaty a prsu se jedná o nejběžnější typ karcinomu právě na našem území. Většinou jde o karcinomy sporadické, tedy vzniklé v důsledku náhlých změn v somatické buňce. Geny podmiňující nádory trávicího traktu jsou velmi často tumor-supresorové. Pokud se v jedné kopii tumor-supresorového genu v každé tělní buňce vyskytne zárodečná mutace, výrazně se zvyšuje riziko, že náhodná mutace v druhé kopii genu povede ke ztrátě jeho funkce, což může umožnit nebo urychlit vznik rakoviny. Tento mechanismus vysvětluje, proč se u osob s genetickou predispozicí často vyvíjejí nádory v mladším věku a po většinu případů jsou i vícečetné [6].

2.4.1. Nopolypózní syndromy

2.4.1.1. Lynchův syndrom

Lynchův syndrom, též nazývaný jako hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), je autozomálně dominantní dědičné onemocnění, které je klinicky spojeno se zvýšenou predispozicí k rozvoji karcinomů kolorekta, endometria a dalších orgánů. Toto onemocnění zvyšuje riziko vzniku těchto nádorů ve srovnání s běžnou populací. Z molekulárně-genetického hlediska je charakterizováno přítomností patogenních variant v genech odpovědných za opravu chyb v DNA (MMR geny) – konkrétně *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, nebo delecí v genu *EPCAM*.

Typicky se projevuje vznikem maligních nádorů v mladším věku, přičemž nádory mohou být synchronní (současné) nebo metachronní (vznikající postupně). Nádory typické pro Lynchův syndrom se bohužel často vyskytují i u přímých příbuzných.

Mezi nejčastější nádory spojené s Lynchovým syndromem patří karcinomy kolorekta, endometria, vaječníků, žaludku, tenkého střeva, ledvin, močových cest (včetně močového měchýře a pánviček), slinivky břišní, žlučových cest, mozku, prostaty a kůže. Riziko rozvoje těchto nádorů je u nositelů syndromu výrazně vyšší [6, 24, 25, 26].

2.4.1.1.1. Predispoziční geny Lynchova syndromu

MLH1

Gen *MLH1* (MutL homolog 1) je tumor-supresorový gen lokalizovaný na chromozomu 3 v oblasti 3p22.2. Velikost genu *MLH1* je 57497bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 2271bp. Gen zahrnuje 19 exonů a kóduje protein o 756 aminokyselinách. Vznikající protein

MLH1 se podílí na rozpoznání a opravě replikačních chyb v krátkých repetitivních sekvencích DNA v jádře [28].

MSH2

Gen *MSH2* (MutS homolog 2) je lokalizován na druhém chromozomu v oblasti 2p21-p16.3. Velikost genu *MSH2* je 80162bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 2805bp. Gen obsahuje 16 exonů a kóduje protein o 934 aminokyselinách [28], který je klíčový pro opravu DNA a vyhledává tak chyby vzniklé během replikace DNA při přípravě na dělení buňky. Tento protein tvoří dimer s proteiny MSH6 nebo MSH3, identifikuje místa s chybami a spolu s dalším komplexem MLH1-PMS2 zajišťuje opravu odstraněním nesprávného úseku DNA a jeho nahrazením správnou sekvencí [27].

MSH6

Gen *MSH6* (MutS homolog 6) je lokalizován na druhém chromozomu v oblasti 2p16.3. Velikost genu *MSH6* je 23872bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 4083bp. Gen obsahuje 10 exonů a kóduje protein o 1360 aminokyselinách [28], který je zásadní pro opravu DNA tím, že ve spolupráci s proteinem MSH2 vytváří dimer identifikující chyby vzniklé při replikaci DNA. Tento dimer spolupracuje s dalšími proteiny, jako je MLH1-PMS2, aby odstranil nesprávné úseky DNA a nahradil je správnou sekvencí, což řadí MSH6 mezi geny pro opravu nesprávného párování (MMR) [27].

PMS2

Gen *PMS2* (PMS1 homolog 2, mismatch repair system component) je tumor-supresorový gen lokalizovaný na chromozomu 7 v oblasti 7p22.1. Velikost genu *PMS2* je 35868bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 2589bp. Gen zahrnuje 15 exonů a kóduje protein o 862 aminokyselinách [28]. Vznikající protein je zapojen do proteinového komplexu, který se uplatňuje při opravách vzniklých během replikace DNA chybným párováním nukleotidů (mismatch repair proces reparace DNA) [27].

EPCAM

Gen *EPCAM* (epithelial cell adhesion molecule) je lokalizován na druhém chromozomu v oblasti 2p21. Velikost genu *EPCAM* je 17881bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 945bp. Gen obsahuje 9 exonů a kóduje protein o 314 aminokyselinách [28]. Gen *EPCAM* poskytuje instrukce pro výrobu proteinu, který pomáhá epiteliálním buňkám držet se navzájem a podílí se na přenosu signálů z okolí do buněčného jádra. Tento protein, známý jako EpCAM, reguluje různé buněčné procesy, včetně růstu, zralosti a pohybu, což je důležité pro správný vývoj buněk a tkání [27].

2.4.2. Polypózní syndromy

2.4.2.1. *MUTYH* – asociovaná polypóza (MAP)

MUTYH – asociovaná polypóza (MAP) je autozomálně recesivně dědičná porucha způsobená bialelickými mutacemi v genu *MUTYH*. Tento syndrom je charakterizován vznikem adenomatózních a serrátových polypů (abnormálních výrůstků na sliznicích, zejména v gastrointestinálním traktu). Polypů může být pár, několik desítek až dokonce i několik stovek. Osoby s MAP mají zvýšené riziko vzniku gastrointestinálních polypů a rakoviny tlustého střeva (CRC), přičemž přibližně 60 % pacientů má CRC při prvním vyšetření. Průměrný věk diagnózy je 45 let.

Prevalence MAP je relativně nízká, přibližně 1 z 30 000 osob. Nositelé monoalelických mutací genu *MUTYH* mají dvojnásobné riziko vzniku rakoviny tlustého střeva (CRC) [6, 29].

2.4.2.1.1. Predispoziční gen *MUTYH* – asociované polypózy

MUTYH

Gen *MUTYH* (mutY DNA glycosylase) je lokalizován na prvním chromozomu v oblasti 1p34.1. Velikost genu *MUTYH* je 11229bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 1650bp. Gen zahrnuje 16 exonů a kóduje protein o 549 aminokyselinách [28]. Díky tomu vzniká enzym MYH glycosylázu, jež se podílí na opravě DNA tím, že opravuje chyby vzniklé při replikaci DNA. Tento enzym koriguje specifické chyby, kdy guanin, který je normálně párován s cytosinem, místo toho páruje s adenin, čímž brání hromadění mutací, které by mohly vést k tvorbě nádorů, a provádí opravy známé jako oprava excize bází [27].

2.4.2.2. Familiární adenomatózní polypóza

FAP (familial adenomatous polyposis) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění způsobené mutacemi v genu *APC*, které vede k tvorbě stovek polypů v tlustém střevě. Bez léčby se u pacientů obvykle vyvine rakovina tlustého střeva. Existuje i mírnější forma FAP, která je charakterizována menším počtem polypů a pozdějším nástupem onemocnění. Polypy mohou vznikat i v jiných částech trávicího traktu, například ve dvanáctníku.

Toto onemocnění je způsobeno u méně než 1 % kolorektálních karcinomů v celosvětové populaci, avšak riziko malignity je pro neléčeného člověka, trpícího tímto onemocněním, téměř fatální (často do 50 let věku jedince) [6, 30].

2.4.2.2.1. Predispoziční gen familiární adenomatózní polypózy

APC

Gen *APC* (APC regulator of WNT signaling pathway) je lokalizován na chromozomu 5 v oblasti 5q22.2. Velikost genu *APC* je 138735bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 8532bp. Gen zahrnuje 16 exonů a kóduje protein o 2843 aminokyselinách [28]. Tento protein APC působí jako nádorový supresor regulující buněčné dělení, přilnavost a pohyb, a zajišťuje správný počet chromozomů po dělení. Spolupracuje také s beta-kenininem, jež ovlivňuje genovou expresi, buněčný růst a diferenciaci, přičemž APC reguluje rozklad beta-kenininu, když již není potřeba [27].

2.4.2.3. Hamartogenní polypózní syndromy

Hamartogenní polypózní syndromy jsou genetická onemocnění charakterizovaná vznikem polypů v trávicím traktu. Mezi ně patří Peutz-Jeghersův syndrom, který je spojen s mutacemi v genu *STK11* a charakterizuje se hamartomovými polypy a pigmentovými skvrnami na sliznicích. Syndrom juvenilní polypózy je způsoben mutacemi v genech *SMAD4* a vede k tvorbě juvenilních polypů v trávicím traktu. PTEN hamartomózní tumorový syndrom vzniká mutacemi v genu *PTEN* a je spojen se vznikem různých nádorů a polypů, přičemž pacienti mají zvýšené riziko rakoviny prsu, dělohy a dalších orgánů [6].

2.4.2.3.1. Predispoziční geny hamartogenních polypózních syndromů

STK11

Gen *STK11* (serine/threonine kinase 11) je lokalizován na devatenáctém chromozomu v oblasti 19p13.3. Velikost genu je 22637bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 1302bp. Gen zahrnuje 10 exonů a kóduje protein o 433 aminokyselinách [28] a také enzym serin/threonin kinázu 11, která působí jako nádorový supresor bránící nekontrolovanému růstu buněk. Tento enzym reguluje polarizaci buněk, jejich energetické využití, programovanou buněčnou smrt (apoptózu) a je nezbytný pro normální vývoj před narozením [27].

SMAD4

Gen *SMAD4* (SMAD family member 4) je lokalizován na chromozomu 18 v oblasti 18q21.2. Velikost genu je 54830bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 1659bp. Gen zahrnuje 12 exonů a kóduje protein o 552 aminokyselinách [28]. Tento protein je zapojený do přenosu signálů z povrchu buňky do jádra prostřednictvím dráhy TGF- β , která ovlivňuje genovou aktivitu a produkci proteinů. Protein *SMAD4* působí jako transkripční faktor a nádorový supresor, čímž reguluje buněčný růst, dělení a vývoj mnoha tělesných systémů [27].

PTEN

Gen *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) je lokalizován na desátém chromozomu v oblasti 10q23.31. Velikost genu je 108492bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 1212bp. Gen zahrnuje 9 exonů a kóduje protein o 403 aminokyselinách [28], díky němuž vzniká enzym působící jako nádorový supresor, jež reguluje buněčné dělení, přilnavost, migraci buněk a spouští apoptózu. Tento enzym, fungující jako fosfatáza, také podporuje stabilitu genetické informace a brání vzniku nádorů [27].

Je sice predispozičním genem hamman-riordanova syndromu, avšak žádný záchyt nebyl nalezen u vybraných pacientů.

2.4.3. Difúzní karcinom žaludku

Hereditární difúzní karcinom žaludku (HDGC) je genetická predispozice k rozvoji málo diferencovaného adenokarcinomu žaludku. Tento typ nádoru vzniká ztrátou E-kadherinu, což vede k růstu jednotlivých nádorových buněk, které infiltrují žaludeční stěnu bez tvorby solidních nádorových mas. Onemocnění se často projevuje před 40. rokem života jedince, přičemž jeho příznaky jsou na začátku nespecifické a mohou být přehlíženy. Jak nemoc postupuje, objevují se bolesti břicha, problémy s polykáním, ztráta chuti k jídlu a hubnutí. V pokročilých stádiích může nádor metastázovat a způsobit další komplikace, jako je žloutenka či nadměrný nárůst jater (hepatomegalie). Včasná diagnostika zlepšuje prognózu, zatímco v pozdějších fázích je přežití omezené. U nosičů mutace genu *CDH1* je kromě rakoviny žaludku zvýšené riziko jiných typů karcinomů, mezi něž patří i lobulární karcinom prsu [6, 31].

2.4.3.1. Predispoziční gen k difúznímu karcinomu žaludku

CDH1

Gen *CDH1* (cadherin 1) je lokalizován na chromozomu 16 v oblasti 16q22.1. Velikost genu je 98250bp, z toho kódující oblast zaujímá 2649bp. Gen obsahuje 16 exonů a kóduje protein o 882 aminokyselinách [28]. Tento protein E-kadherin je klíčový pro přilnavost epitelových buněk a tvorbu organizovaných tkání. Spolu s p120-kateninem, reguluje buněčnou signalizaci, růst, pohyb, vývoj a také působí jako nádorový supresor bránící nekontrolovanému dělení buněk [27].

2.4.4. Hereditární pankreatitida

Hereditární pankreatitida (HP) je genetická forma chronické pankreatitidy, která je častou příčinou tohoto onemocnění u dětí. Projevy mohou začít v raném věku, obvykle v dětství, a v 80 % případů se nemoc nejprve projevuje opakovanými záchvaty akutní pankreatitidy, které se postupně zkracují. Tyto záchvaty mohou mít různé formy, od mírných bolestí až po vážné komplikace, jako je nekróza nebo pseudocysty. Jak nemoc postupuje, dochází k chronickým problémům, jako jsou bolesti břicha, ztráta chuti k jídlu a poruchy trávení. Vzhledem k tomu, že symptomy HP jsou podobné jiným typům pankreatitidy, je důležitá přesná diagnostika, která zahrnuje genetické testy, aby bylo možné zajistit odpovídající sledování a prevenci vzniku dalších komplikací. Diagnóza dědičné pankreatitidy (HP) bývá často opožděná, protože mnoho pacientů je původně považováno za idiopatické, dokud není detekována genetická mutace. Pokud mutace není nalezena, může být HP diagnostikována na základě rodinné anamnézy, pokud je pankreatitida opakovaně diagnostikována u několika příbuzných napříč generacemi [6, 32].

2.4.4.1. Predispoziční geny k hereditární pankreatitidě

PRSS1

Gen *PRSS1* (serine protease 1) je lokalizován na sedmém chromozomu v oblasti 7q34. Velikost genu je 3601bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 744bp. Gen obsahuje 5 exonů a kóduje protein o 247 aminokyselinách [28] a enzym kationtový trypsinogen, jež se tvoří ve slinivce a podílí se na trávení bílkovin aktivací v aktivní formu trypsinu. Trypsin nejen štěpí bílkoviny na aminokyseliny, ale také aktivuje další trávicí enzymy, přičemž jeho stabilita závisí na vazbě s molekulou vápníku [27].

SPINK1

Gen *SPINK1* (serine peptidase inhibitor Kazal type 1) je lokalizován na chromozomu 5 v oblasti 5q32. Velikost genu je 7090bp, z toho kódující oblast zaujímá 240bp. Gen obsahuje 5 exonů a kóduje protein o 79 aminokyselinách [28]. Tento protein funguje jako inhibitor trypsinu, enzymu, jenž je vylučován pankreatickými buňkami do pankreatické šťávy. Předpokládá se, že jeho hlavní funkcí je prevence předčasné aktivace zymogenů v pankreatu a pankreatických vývodech katalyzované trypsinem [27].

2.4.5. Ostatní geny podílející se na vzniku karcinomů trávicího traktu

Karcinogeneze trávicího traktu není pouze výsledkem vlivu již zmíněných genů, ale na tomto procesu se podílejí i jiné geny, jako například *ATM*, *BLM*, *CHEK2*, *POLE* a *SDHB*.

Mutace genu *POLE* zvyšují riziko kolorektálního karcinomu a jsou spojeny s dědičnou polypózou, kdy pacienti mají často desítky až stovky adenomů v tlustém střevě. Kromě toho mohou tyto mutace vést k nádorům i v dalších orgánech, jako jsou pankreas, vaječníky, endometrium a mozek. Bialelické mutace v genu *BLM* způsobují vzácný Bloomův syndrom, který je spojen s vyšším rizikem lymfoidních malignit v dětství a gastrointestinálních nebo ledvinových nádorů v dospělosti. Mutace genu *SDHB* jsou častěji spojeny s paragangliomy v oblasti břišní pánve a hlavy a krku a mají nižší riziko vzniku pheochromocytomu ve srovnání s mutacemi v genu *SDHD*. Gen *ATM*, jako středně penetrantní nádorový predispoziční gen, zvyšuje riziko několika typů nádorů, včetně karcinomu slinivky břišní a kolorektálního karcinomu. Stejně tak gen *CHEK2*, u jehož nosičů se zvyšuje riziko karcinomu trávicího traktu, včetně karcinomu slinivky břišní a kolorektálního karcinomu [33, 34, 35, 36].

ATM

Gen *ATM* (ATM serine/threonine kinase) je lokalizován na jedenáctém chromozomu v oblasti 11q22.3. Velikost genu je 146268bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 9171bp. Gen obsahuje 63 exonů a kóduje protein o 3056 aminokyselinách [28], jež reguluje buněčný růst, dělení a hraje klíčovou roli v rozpoznávání a opravě poškozené DNA. Tento protein zajišťuje stabilitu genetické informace aktivací enzymů opravujících DNA, což je zásadní pro prevenci rakoviny [27].

BLM

Gen *BLM* (BLM RecQ like helicase) je lokalizován na chromozomu 15 v oblasti 15q26.1. Velikost genu je 98135bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 4254bp. Gen obsahuje 22 exonů a kóduje protein z rodiny RecQ helikáz o 1417 aminokyselinách [28]. Tento protein rozplétá dvojistou šroubovici DNA, což je klíčové pro replikaci a opravu DNA. Dále pomáhá udržovat stabilitu DNA tím, že omezuje nadměrné výměny mezi sesterskými chromatidami a chrání genetickou integritu během dělení buněk [27].

CHEK2

Gen *CHEK2* (checkpoint kinase 2) je lokalizován na chromozomu 22 v oblasti 22q12.1. Velikost genu je 54078bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 1632bp. Gen obsahuje 15 exonů a kóduje protein o 543 aminokyselinách [28], který je regulátorem buněčného cyklu a potenciálním tumor-supresorem. Protein *CHEK2* je aktivován v reakci na poškození DNA a blokády replikace, kde zastavuje buněčný cyklus a stabilizuje tumor-supresor p53, což vede k zastavení cyklu v G1 fázi [27].

POLE

Gen *POLE* (DNA polymerase epsilon, catalytic subunit) je lokalizován na dvanáctém chromozomu v oblasti 12q24.33. Velikost genu je 63763bp, z toho kódující oblast zaujímá

délku 6861bp. Gen obsahuje 49 exonů a kóduje protein o 2286 aminokyselinách [28]. Zároveň kóduje katalytickou podjednotku DNA polymerázy epsilon, enzymu, který hraje klíčovou roli v replikaci chromozomální DNA a opravách DNA [27].

SDHB

Gen *SDHB* (succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B, catalytic subunit) je lokalizován na prvním chromozomu v oblasti 1p36.13. Velikost genu je 35449bp, z toho kódující oblast zaujímá délku 843bp. Gen obsahuje 8 exonů a kóduje protein o 280 aminokyselinách [28]. Zároveň železo-sírnou podjednotku enzymového komplexu sukcinátdehydrogenázy (SDH), který hraje klíčovou roli v mitochondriích a metabolickém cyklu kyseliny citrónové [27].

2.5. Genetické poradenství a jak dostat prevenci do většího povědomí lidí

2.5.1. Historický vývoj genetického poradenství

Genetické poradenství (dále GP) se vyvíjelo od konce 19. století, kdy se objevil první model nazývaný **eugenický**. Eugenika, odvozená z řeckého „dobře narozený“, měla za cíl zkvalitnění lidských vlastností v populaci a eliminaci těch nežádoucích. Tento přístup, navržený anglickým vědcem Francisem Galtonem v roce 1885, vedl v praxi k velmi problematickým zásahům, například k nuceným sterilizacím, regulaci sňatků a nátlakům na „vylepšení“ lidské rasy. Ve 20. století získala eugenika zpočátku velkou podporu; v USA a Velké Británii totiž vznikly instituce, které propagovaly zjednodušené genetické principy, přičemž tvrdily, že kriminalita či mentální postižení lze omezit odstraněním „nežádoucích“ genů z populace. Tyto praktiky vyústily ve vytvoření zákonů v nacistickém Německu (1933), které podporovaly násilné omezování reprodukce, sterilizace a „chovné programy“ pro produkci „čistých“ potomků. Takové důsledky zapříčinily silný odpor od vědecké komunity a v čele s genetickým vědcem Penrosem vedlo k tomu, že byla eugenika z oblasti genetického poradenství zakázána.

Postupně se objevovaly nové metody GP. Jednou z nich byl i **preventivní** neboli **lékařský model**, jež se soustředil na vědecké rozpoznávání a prevenci genetických onemocnění. Lékařská genetika se rozvinula jako klinický obor až v 50. letech a začala být součástí lékařských fakult a nemocnic. Předcházela ji práce zoologů a botaniků, kteří poprvé rozpoznali, že genetika má pro člověka zásadní význam. A tak postupně vznikaly první oddělení lékařské genetiky, která se zaměřovala na přesnou diagnostiku a poskytování poradenství pacientům s genetickými riziky.

Nakonec se prosadil **psychologický model**, jež kladl důraz na psychologickou podporu rodin zasažených genetickými problémy a respektování jejich autonomie při rozhodování. Tento model představuje humanitní přístup k GP zaměřený na psychologické zvládání emočních dopadů genetických diagnóz a na proces truchlení a adaptace v rodině [16].

2.5.2. Právní a etické zásady genetického poradenství

Etické zásady GP, jak je doporučuje Světová zdravotnická organizace (WHO), vyžadují, aby bylo poradenství nedirektivní, tedy aby poskytovalo klientům objektivní a přesné informace, které jim umožní svobodně se rozhodnout. Mezi zásady patří respekt k autonomii jednotlivce a rodiny, ochrana důvěrnosti informací a závazek poskytnout klientům pravdivé a úplné informace. Současné GP klade důraz na ochranu rodin před neoprávněnými zásahy ze strany zaměstnavatelů, pojišťoven a jiných třetích stran. Genetické poradenství má také morální odpovědnost vůči rodinným příslušníkům klientů, kteří mohou mít rovněž genetická rizika. To může pomoci snižovat riziko přenosu genetických problémů na další generace.

Důraz na etiku pramení i z obav o možný návrat eugenických praktik. Například čínský zákon o zdraví matek a dětí z roku 1994 ukládá povinnost doporučovat potrat v případě závažných dědičných vad nebo omezovat sňatky u osob s genetickými poruchami. Tento typ eugeniky vzbudil mezinárodní kritiku a podnítil větší důraz na etické zásady v GP, které chrání individuální svobodu a práva [16].

2.5.3. Proces genetického poradenství

Proces genetického poradenství je složitý a dynamický, zahrnující více fází, které by měly být prováděny kontinuálně, aby se zajistila komplexní péče o rodiny. Tento proces se zaměřuje nejen na technické aspekty diagnostiky, ale i na lidskou stránku, která je pro rodiče často zdrojem emocí a nejistoty, zejména pokud jde o děti narozené s genetickými problémy.

První fáze genetického poradenství se soustředí na definici a potvrzení diagnózy. Když jsou jednotlivci nebo rodiny doporučeni na genetickou konzultaci, mohou zažívat pocity strachu, nejistoty nebo zmatení. Genetický poradce by měl nejprve zhodnotit, jak dobře jsou tito jednotlivci obeznámeni s důvody doporučení a jaké jsou jejich emocionální reakce na situaci. V této fázi je kladen důraz na empatii a citlivý přístup, aby poradce mohl efektivně komunikovat s rodinou, která čelí nejistotě ohledně genetického zdraví. Diagnóza genetického onemocnění může vyvolat širokou škálu emocí, včetně šoku, popření, smutku nebo úzkosti. Poradce by měl pomoci rodinám orientovat se v těchto emocích a poskytnout jim jasné informace o tom, co lze očekávat v dalším postupu, čímž se zmírňuje jejich nejistota.

Druhá fáze poradenství se zaměřuje na výpočet genetického rizika. Na základě diagnózy je určena příčina genetické poruchy, která může mít genetický, environmentální nebo multifaktoriální původ. Pokud je příčina genetická, odborníci specifikují typ poruchy

(chromozomová nebo genová) a stanovují riziko, že dané onemocnění se může opakovat u dalších členů rodiny. Tato fáze je klíčová pro pochopení pravděpodobnosti vzniku daného onemocnění u dalších generací, což rodinám pomůže lépe se rozhodnout o dalším postupu.

Ve třetí fázi přichází na řadu komunikace. Jakmile je diagnóza potvrzena a riziko stanoveno, genetický poradce by měl jasně a citlivě vysvětlit, co bylo zjištěno, jaké jsou příčiny genetické poruchy a jaké jsou šance na opakování tohoto stavu v rodině. Způsob a míra komunikace by měla být přizpůsobena individuálním potřebám rodiny.

Čtvrtá fáze se zaměřuje na rozhodnutí a akce. Po potvrzení diagnózy a stanovení rizik budou jednotlivci nebo rodiny muset učinit řadu důležitých rozhodnutí týkajících se péče o vlastní zdraví, reprodukčních možností nebo dalších genetických testů. Během této fáze by měl poradce podporovat rodiny v procesu rozhodování, pomáhat jim zvažovat různé možnosti a následky těchto rozhodnutí. Rodiče nebo jedinci mohou procházet nejednoznačnými pocity a poradce by měl být nápomocný při vyjasňování těchto pocitů a poskytnout jim prostor k tomu, aby se na základě informací a emocí rozhodli co nejlépe.

Pátá fáze se zaměřuje na dlouhodobou podporu a sledování. Genetické poradenství by nemělo končit jednorázovou konzultací. Jednotlivci a rodiny, které čelí genetickým problémům, potřebují trvalou podporu, aby zvládli jak zdravotní, tak mentální následky genetických poruch. Genetické služby by měly poskytovat dlouhodobý dohled nad rodinnými situacemi, což zahrnuje nejen aktuální poradenství, ale i pravidelnou podporu a monitorování vývoje. Tato fáze je nezbytná pro prevenci opakování problémů a zajištění adekvátní péče v průběhu času.

2.5.4. Evaluace výsledků genetického poradenství

Výzkum výsledků genetického poradenství je dlouhodobým tématem, které se začalo intenzivněji zkoumat již v 70. a 80. letech 20. století. V té době se výzkumníci soustředili na analýzu dopadů GP v různých zdravotnických zařízeních po celém světě, přičemž se často potýkali s metodologickými výzvami a kritickými názory na výsledky. V posledních letech však došlo k obnovení zájmu o tento výzkum, zejména v kontextu genů podmiňujících rakovinu.

Jedním z významných výzkumů zaměřujících se na hodnocení genetického poradenství, byla studie provedená Pina-Netem a Peteanem ve veřejné nemocnici v Brazílii. Tato studie přinesla výsledky, jež byly velmi podobné výsledkům v jiných zemích a identifikovala několik klíčových faktorů týkajících se genetického poradenství.

- **Nedostatečné povědomí o službách:** Většina rodin (74 %) nebyla informována o typu služby, kterou jim GP poskytne, než byly odeslány do daných zařízení.
- **Porozumění poskytnutým informacím:** Zhruba polovině účastníků se dostalo porozumění z poskytnutých informací, přičemž více než třetina rodin nevěděla konkrétní číselné riziko recidivy, ačkoli většina účastníků byla schopna říci, zda je toto riziko vysoké či nízké.

- **Rozhodování o dětech:** Významná část párů (64,4 %) se rozhodla nemít děti, a to bez ohledu na riziko případných genetických problémů.
- **Ukončení těhotenství:** Páry s vyšším rizikem genetických poruch častěji zvažovaly ukončení těhotenství než páry s nižším rizikem, přičemž muži byli k tomuto rozhodnutí otevřenější než ženy.
- **Míra porodnosti:** Z předchozích faktů plyne také to, že míra porodnosti u těchto rodin je velmi nízká, přesněji z 36 rodin se narodí asi tak pět dětí (míra 0,13).
- **Recidiva genetických poruch:** U rodin s vysokým rizikem se genetické poruchy opakovaly u 44 % jejich dětí, zatímco u rodin s nízkým rizikem se recidiva nevyskytla.

[16]

3. Materiál a metody

3.1. Zdroj dat

Ve své středoškolské práci jsem zpracovala výsledná anonymizovaná data získaná v laboratoři Centra lékařské genetiky s.r.o. (dále CLG) z vyšetření mutační analýzy genů asociujících k hereditárním nádorovým onemocněním s převažující predispozicí k nádorům prsu, ovaríí a dělohy a nádorům gastrointestinálního traktu. Pacienti indikovaní pro toto vyšetření absolvovali genetickou konzultaci s klinickým genetikem, který na základě zhodnocení osobní a rodinné anamnézy pacientovi doporučil genetické testování. Pacient po získání všech informací o vyšetření a jeho důležitosti podepsal Informovaný souhlas s vyšetřením. Na základě tohoto souhlasu byla pacientům odebrána periferní krev, jež byla zpracována v molekulárně genetické laboratoři CLG.

Data pro praktickou část práce byla získána mutační analýzou 65 genů v rámci panelu ONKO solution metodou masivně paralelního sekvenování (tabulka 2). ONKO solution panel je založený na principu metody cíleného obohacení (Target Enrichment s využitím exon proximálních sond) a vytvořeným ve spolupráci s firmou Agilent Technologies/Altium International s.r.o. Sekvenační panel umožňuje analýzu zárodečných (germinálních) mutací v hlavních predispozičních genech, u kterých byla jasně prokázána asociace s nádorovou hereditou, a i v genech asociovaných ke zvýšenému riziku, u nichž asociace s nádorovými onemocněními je méně známá.

Do výsledků jsou zahrnuta data 1116 indikovaných pacientů z Jihočeského, Plzeňského kraje a kraje Vysočina získaná v letech 2022 až 2024.

Tabulka 2: Seznam analyzovaných genů, jejich lokalizace, referenční sekvence a OMIM kód.

Gen	Oficiální název	Lokalizace	Referenční sekvence transkriptu	OMIM kód
<i>APC</i>	APC regulator of WNT signaling pathway	5q22.2	NM_000038	611731
<i>ATM</i>	ATM serine/threonine kinase	11q22.3	NM_000051	607585
<i>BAP1</i>	BRCA1 associated deubiquitinase 1	3p21.1	NM_004656	603089
<i>BARD1</i>	BRCA1 associated RING domain 1	2q35	NM_000465	601593
<i>BLM</i>	BLM RecQ like helicase	15q26.1	NM_000057	604610
<i>BMPRI1A</i>	bone morphogenetic protein receptor type 1A	10q23.2	NM_004329	601299
<i>BRCA1</i>	BRCA1 DNA repair associated	17q21.31	NM_007294	113705
<i>BRCA2</i>	BRCA2 DNA repair associated	13q13.1	NM_000059	600185
<i>BRIP1</i>	BRCA1 interacting DNA helicase 1	17q23.2	NM_032043	605882
<i>CDH1</i>	cadherin 1	16q22.1	NM_004360	192090
<i>CDK4</i>	cyclin dependent kinase 4	12q14.1	NM_000075	123829
<i>CDKN2A</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 2A	9p21.3	NM_000077	600160
<i>CDKN2B</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 2B	9p21.3	NM_004936	600431
<i>EPCAM</i>	epithelial cell adhesion molecule	2p21	NM_002354	185535
<i>ERCC2</i>	ERCC excision repair 2, TFIIH core complex helicase subunit	19q13.32	NM_000400	126340
<i>ERCC3</i>	ERCC excision repair 3, TFIIH core complex helicase subunit	2q14.3	NM_000122	133510
<i>ABRAXAS1</i>	abraxas 1, BRCA1 A complex subunit	4q21.23	NM_139076	611143
<i>FANCC</i>	FA complementation group C	9q22.32	NM_000136	613899
<i>FANCM</i>	FA complementation group M	14q21.2	NM_020937	609644
<i>FH</i>	fumarate hydratase	1q43	NM_000143	136850
<i>FLCN</i>	folliculin	17p11.2	NM_144997	607273
<i>HOXB13</i>	homeobox B13	17q21.32	NM_006361	604607
<i>CHEK2</i>	checkpoint kinase 2	22q12.1	NM_007194	604373
<i>KIT</i>	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	4q12	NM_000222	164920
<i>MEN1</i>	menin 1	11q13.1	NM_130799	613733
<i>MET</i>	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	7q31.2	NM_001127500	164860
<i>MLH1</i>	mutL homolog 1	3p22.2	NM_000249	120436
<i>MLH3</i>	mutL homolog 3	14q24.3	NM_001040108	604395
<i>MRE (MRE11A)</i>	MRE11 homolog, double strand break repair nuclease	11q21	NM_005591	600814
<i>MSH2</i>	mutS homolog 2	2p21-p16.3	NM_000251	609309
<i>MSH6</i>	mutS homolog 6	2p16.3	NM_000179	600678
<i>MUTYH</i>	mutY DNA glycosylase	1p34.1	NM_001128425	604933
<i>NBN</i>	nibrin	8q21.3	NM_002485	602667
<i>NF1</i>	neurofibromin 1	17q11.2	NM_000267	613113
<i>NF2</i>	neurofibromin 2, moesin-ezrin-radixin like (MERLIN) tumor suppressor	22q12.2	NM_000268	607379

<i>PALB2</i>	partner and localizer of BRCA2	16p12.2	NM_024675	610355
<i>PIK3CA</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	3q26.32	NM_006218	171834
<i>PMS2</i>	PMS1 homolog 2, mismatch repair system component	7p22.1	NM_000535	600259
<i>POLD1</i>	DNA polymerase delta 1, catalytic subunit	19q13.33	NM_002691	174761
<i>POLE</i>	DNA polymerase epsilon, catalytic subunit	12q24.33	NM_006231	174762
<i>PRKARIA</i>	protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha	17q24.2	NM_002734/ NM_212471	188830
<i>PRSS1</i>	serine protease 1	7q34	NM_002769	276000
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog	10q23.31	NM_000314	158350
<i>PTCH1</i>	patched 1	9q22.32	NM_000264	601309
<i>RAD50</i>	RAD50 double strand break repair protein	5q31.1	NM_005732	604040
<i>RAD51C</i>	RAD51 paralog C	17q22	NM_058216	602774
<i>RAD51D</i>	RAD51 paralog D	17q12	NM_002878/NM_001142571	602954
<i>RB1</i>	RB transcriptional corepressor 1	13q14.2	NM_000321	614041
<i>RECQL</i>	RecQ like helicase	12p12.1	NM_002907	600537
<i>RECQL4</i>	RecQ like helicase 4	8q24.3	NM_004260	603780
<i>RET</i>	ret proto-oncogene	10q11.21	NM_020975	164761
<i>SDHB</i>	succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B	1p36.13	NM_003000	185470
<i>SLX4</i>	SLX4 structure-specific endonuclease subunit	16p13.3	NM_032444	613278
<i>SMAD4</i>	SMAD family member 4	18q21.2	NM_005359	600993
<i>SMARCB1</i>	SWI/SNF related BAF chromatin remodeling complex subunit B1	22q11.23	NM_003073	601607
<i>SPINK1</i>	serine peptidase inhibitor Kazal type 1	5q32	NM_003122	167790
<i>STK11</i>	serine/threonine kinase 11	19p13.3	NM_000455	602216
<i>SUFU</i>	SUFU negative regulator of hedgehog signaling	10q24.32	NM_016169	607035
<i>TP53</i>	tumor protein p53	17p13.1	NM_000546	191170
<i>TSC1</i>	TSC complex subunit 1	9q34.13	NM_000368	605284
<i>TSC2</i>	TSC complex subunit 2	16p13.3	NM_000548	191092
<i>VHL</i>	von Hippel-Lindau tumor suppressor	3p25.3	NM_000551	608537
<i>WRN</i>	WRN RecQ like helicase	8p12	NM_000553	277700
<i>WT1</i>	WT1 transcription factor	11p13	NM_024426	607102
<i>XRCC2</i>	X-ray repair cross complementing 2	7q36.1	NM_005431	600375

OMIM kód – identifikační číslo v databázi Online Mendelian Inheritance in Man, která katalogizuje genetické poruchy a jejich příčiny.

(Zdroj: NCBI The National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

OMIM: An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders <https://omim.org/>)

3.2. Odběr a izolace genetického materiálu

Indikovaným pacientům bylo v ambulantní části CLG odebráno 2 ml periferní žilní krve do zkumavek s protisrážlivým činidlem určených k izolaci DNA. Odebraná krev byla uchovávána při teplotě 4–9 °C do jejího zpracování. DNA byla izolována magnetickým izolátorem MagCoreSUPER dle instrukcí výrobce (RBC Bioscience, Tchaj-wan). Koncentrace vzorků DNA byla měřena na fluorometru Invitrogen™ Qubit 4 pomocí kitu Invitrogen™ Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Vyizolovaná gDNA (genomová DNA) byla až do dalšího zpracování uchovávána při teplotě -20 °C.

3.3. Mutační analýza testovaných genů

3.3.1. Příprava NGS knihoven

Sekvenační knihovny genomové DNA (gDNA) byly připraveny pomocí SureSelect XT Low Input Reagent kitu (Agilent, USA) s využitím exon proximálních sond SureSelect Custom Tier2 0.5 – 2.9 Mb (Agilent, USA) dle protokolu výrobce. Vzorky gDNA o vstupním množství 100ng byly enzymaticky fragmentovány na fragmenty o velikosti 150–200bp. Konce získaných fragmentů DNA byly enzymaticky opraveny (End-repair) a opatřeny adeninovým zbytkem (A-tailing). V následujícím kroku byly k fragmentům připojeny univerzální adaptory (ligace) a unikátní indexy (PCR), díky nimž lze analyzovat více knihoven najednou. Knihovny byly přečištěny pomocí magnetických kuliček AMPure XP Beads (Beckman Coulter Life Sciences, USA) a kvantifikovány Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Velikostní složení knihoven bylo zjištěno kapilární elektroforézou na přístroji Fragment Analyzer (Agilent, USA). V každém experimentu bylo zpracovááno 48 vzorků/knihoven, které byly na základě výsledné koncentrace a délky smíchány/poolovány do 4 poolů po 12 knihovnách. Pooly byly hybridizovány se SureSelect próbami, přečištěny Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetickými kuličkami (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), promývány, amplifikovány a přečištěny AMPure XP Beads magnetickými kuličkami (Beckman Coulter Life Sciences, USA). Koncentrace a délka knihoven byla stanovena pomocí Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) a přístrojem Fragment Analyzer (Agilent, USA).

3.3.2. Illumina sekvenování

Sekvenování získaných knihoven bylo provedeno vysokokapacitním stolním sekvenátorem NextSeq 550 (Illumina, USA) technologií sekvenace syntézou (SBS – sequencing by synthesis) dle instrukcí výrobce. K sekvenaci ekvimolární směsi poolů knihoven byl použit sekvenační reagenční kit NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5, který umožňoval pair-end sekvenování s produkcí čtení 2x150bp. K ověření správného průběhu sekvenování byla použita standardní referenční DNA PhiX Control v3 (Illumina, USA).

Po dokončení sekvenace byla provedena kontrola základních parametrů kvality sekvenace: Cluster Density ($\leq 230 \text{ k/mm}^2$), Cluster PF ($>75 \%$), Phasing/Prephasing ($<0,5 \%$).

3.3.3. Bioinformatické zpracování získaných dat

Po dokončení sekvenace byly vygenerovány soubory ve formátu *fastq* (8 *fastq* souborů pro každý vzorek/knihovnu). Roztřídění sekvenačních dat k jednotlivým 48 vzorkům/knihovnám proběhlo na základě unikátních sekvencí (indexů) použitých během jejich přípravy.

Fastq soubory byly poté nahrány do cloudového nástroje Varsome Clinical (Saphetor, SA, Švýcarsko), který slouží k mapování získaných dat na referenční genom, a dále k detekci, vizualizaci, filtrování a anotaci nalezených variant [20].

Získaná data byla mapována na referenční genom Human GRCh37/hg19. Software Varsome Clinical detekoval a filtroval varianty dle nastavených pravidel CLG laboratoře. V rámci panelu ONKO solution byly hodnoceny varianty, jejichž pokrytí (coverage) byla $>20x$ a Variant Fraction $>15 \%$ (VF). Reportovány byly změny, které se nacházejí v kódujících sekvencích (exonech) testovaných genů a v jejich přilehlých intronových oblastech ve vzdálenosti $\pm 10bp$. Použitá metoda detekovala jednonukleotidové záměny (SNV – single nucleotide variant), krátké inserce a/nebo delece (InDels), velké intragenové delece/duplikace (CNV – copy number variation).

Nalezené varianty byly klasifikovány na základě doporučení American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG; tabulka 3) a interpretovány s využitím informací z klinických databází (např. ClinVar, OMIM, HGMD aj.), z literatury a predikčních programů. Interpretovány byly varianty nejasného klinického významu (třída 3), pravděpodobně patogenní varianty (třída 4) a varianty patogenní (třída 5). Interpretace výsledků a nálezů byla prováděna s ohledem na současné znalosti a vědomosti v oblasti lékařské genetiky. Laboratoř si vždy vyhrazuje právo provést revize klasifikací nálezů či interpretací výsledků v závislosti na pokroku ve výzkumu a s ohledem na nově získané a upřesňující znalosti v dané problematice [21].

Na tomto místě musím zdůraznit, že zkoumání vzorků tak, jak je popisuji, je vysoce kvalifikovanou činností, k níž je třeba vysokoškolského vzdělání v oboru lékařské genetiky, protože jsem informace o postupu zkoumání vzorků převzala od CLG.

Tabulka 3: Klasifikace variant dle American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG).

Třída	Pravděpodobnost patogenity	Biologický význam
Třída 1	< 0,1 %	Benigní
Třída 2	0,1 – 9,9 %	Pravděpodobně benigní
Třída 3	10 – 89,9 %	Varianta neznámého dopadu (VUS)
Třída 4	90 – 99,9 %	Pravděpodobně patogenní
Třída 5	> 99,9 %	Patogenní

(Zdroj: ACMG - <https://www.acgs.uk.com/media/12533/uk-practice-guidelines-for-variant-classification-v12-2024.pdf> a Klinická onkologie, Klasifikace zárodečných variant identifikovaných při genetickém vyšetření nádorové predispozice – konsenzus konsorcia CZECA - <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/527/6268.pdf>)

3.3.4. Výběr genů spojovaných s dědičnou predispozicí k nádorům trávicího traktu

Pro zpracování této práce byly vybrány geny z ONKO solution panelu, u nichž byla prokázána nezpochybnitelná či jasná spojitost s hereditárními nádorovými onemocněními trávicího traktu. Výběr analyzovaných genů shrnuje tabulka 4 [22].

Tabulka 4: Výběr analyzovaných genů, jejich asociace k nádorovému onemocnění a klasifikace reportovaných variant.

Geny	Nádorové onemocnění			Reportované varianty
	K/R	Ž	S	
APC	•			3, 4, 5
ATM	•		•	
CDH1		•		
CHEK2	•		•	
EPCAM	•			
MLH1	•			
MSH2	•			
MSH6	•			
MUTYH	•			
PMS2	•			
SMAD4	•			
PTEN	•			
PRSS1			•	
SPINK1			•	
STK11	•	•	•	
Geny	Nádorové onemocnění			Reportované varianty
	K/R	Ž	S	
BLM	•			4, 5

POLE	•			
SDHB		•		

Pozn. K/R – kolon a rektum; Ž – žaludek; S – slinivka; 3 - varianta nejasného klinického významu (třída 3), 4 - pravděpodobně patogenní varianta (třída 4); 5 - patogenní varianta (třída 5).

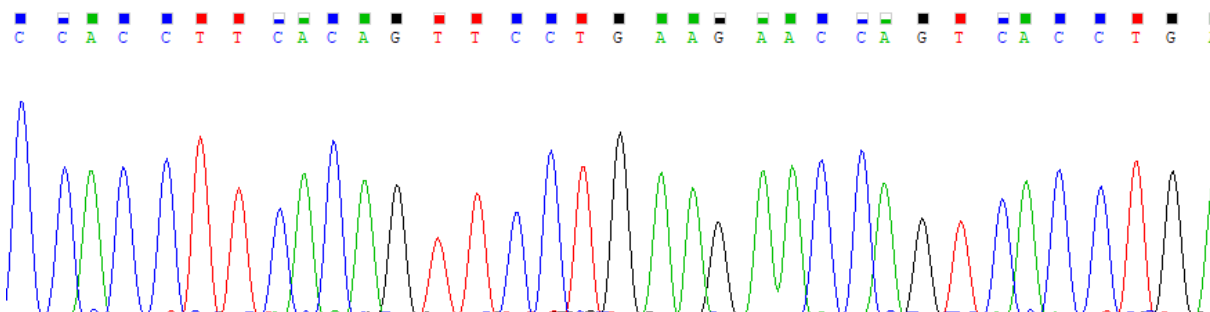
(Zdroj: Klinická onkologie, CZE CANCA: CZEch CAncer paNel for Clinical Application – návrh a příprava cíleného sekvenčního panelu pro identifikaci nádorové predispozice u rizikových osob v České republice.)

3.4. Ověřování nalezených variant

3.4.1. Ověřování Sangerovo sekvenováním

Jednonukleotidové záměny a krátké inserce a/nebo delece nalezené v genech, u kterých jsou reportovány varianty klasifikace 3, 4 a 5, jsou ověřovány pomocí metody Sangerova sekvenování. Ověřování nalezených variant probíhá z gDNA izolované z periferní žilní krve z druhého nezávislého odběru.

Sekvence primerů byly převzaty od výrobce Thermo Fisher Scientific Inc. (USA) a syntetizovány u Generi Biotech s.r.o. (ČR). Vzorek gDNA byl amplifikován použitím Plain PP Master Mix (Top-Bio s.r.o., ČR) za následujících podmínek: počáteční denaturace 94 °C/1min; program 30-ti cyklů zahrnující denaturaci 94 °C/30s - annealing teplotu dle použitých primerů/30s – extenzi 72 °C/1min; konečná extenze 72 °C/7min; zchlazení na 4 °C. PCR produkty byly přečištěny pomocí ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) dle postupu výrobce. Sekvenční reakce byla připravena kitem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) a přečištěna Agencourt CleanSEQ kitem (Beckman Coulter Life Sciences, USA). Produkty byly sekvenovány na přístroji ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Výsledné sekvence byly porovnávány s referenčními sekvencemi genů (tabulka 2).

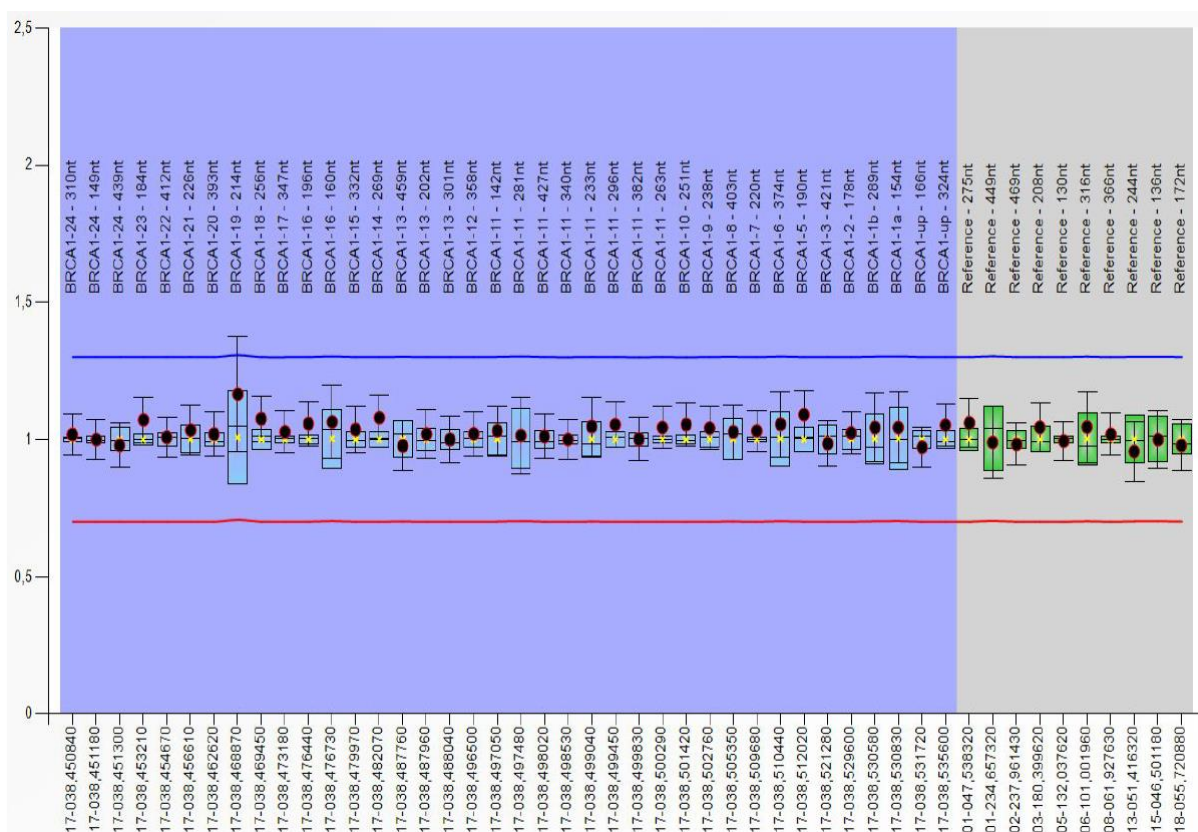


Obrázek 10: Ilustrační obrázek Sangerova sekvenování

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

3.4.2. Ověřování metodou MLPA

Metodou MLPA jsou ověřovány velké intragenové delece/duplikace dle postupu výrobce (MRC Holland, Netherlands). Používány jsou soupravy SALSA MLPA se specifickými problémy, které jsou zacíleny převážně na kódující úseky analyzovaných genů. Výsledná data jsou vizualizována a analyzována softwarem Coffalyser.Net (MRC Holland, Netherlands).



Obrázek 11: Ilustrační obrázek MLPA, konkrétně pro gen BRCA1 (kit SALSA MLPA BRCA1 P002)

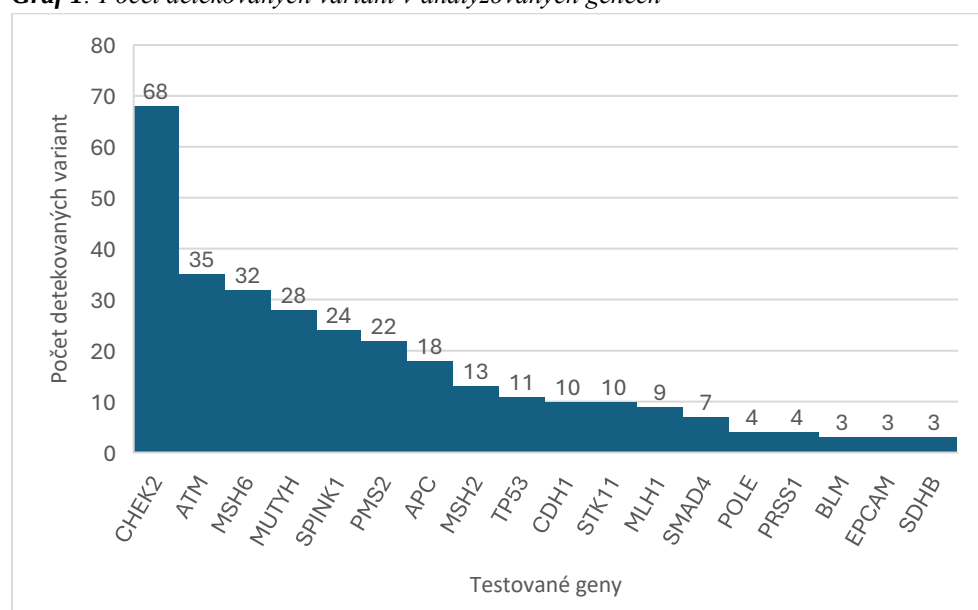
(Zdroj: MG laboratoř CLG)

4. Výsledky a diskuze

V rámci mé středoškolské práce byla zpracována anonymizovaná data získaná masivně paralelním sekvenováním 18 genů asociujících s hereditárními nádorovými onemocněními trávicího traktu (tabulka 4). Data byla získána vyšetřením souboru pacientů, kteří byli na základě zhodnocení jejich osobní a rodinné anamnézy posláni ke genetickému vyšetření nádorové predispozice. Vyšetřovaný soubor pacientů tvořily vzorky od 1116 pacientů zahrnující 229 mužů a 887 žen. U 269 pacientů výsledky vyšetření odhalily nosičství zárodečných variant, které mohou být spojovány s vyšším rizikem vzniku nádorového onemocnění. Z tohoto souboru pacientů bylo z důvodu pozitivní osobní anamnézy indikováno 73 pacientů. Ostatních 196 pacientů bylo testováno na základě pozitivní rodinné zátěže.

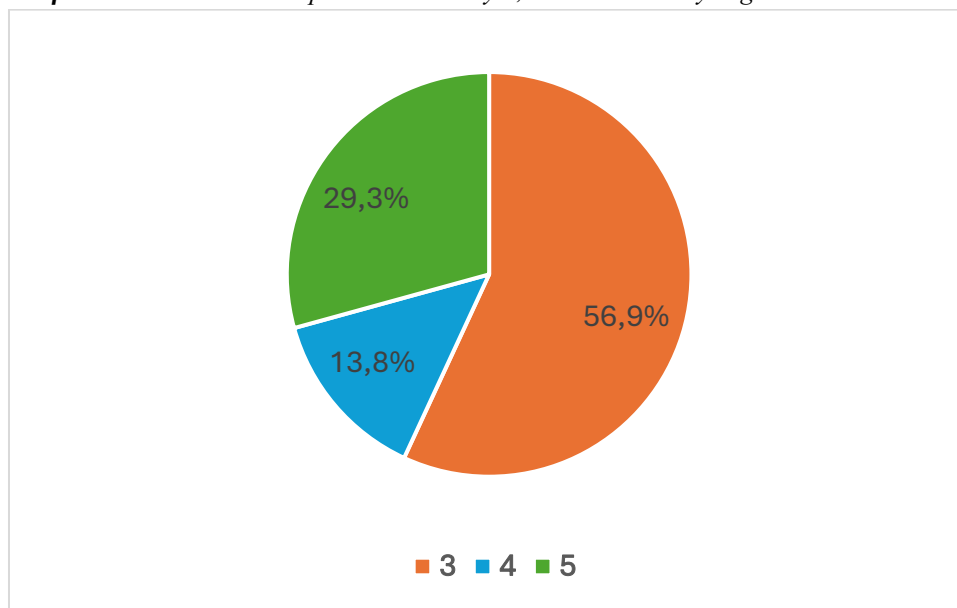
Mutační analýza zachytila v rámci testování 18 genů 304 variant u 269 pacientů (24,1 %), z toho u 236 pacientů byla zachycena pouze jedna varianta, u 31 pacientů dvě varianty a u dvou pacientů tři varianty. Z těchto nalezených variant bylo 303 v heterozygotním stavu a jedna ve stavu homozygotním. Grafické znázornění počtu nalezených variant v testovaných genech je zdokumentováno v grafu 1.

Graf 1: Počet detekovaných variant v analyzovaných genech



Nejvíce nalezených variant bylo zachyceno v genu *CHEK2*, což koresponduje s údaji Caswell-Jin (2018), který uvádí, že nejvyšší zastoupení variant je v bělošské populaci evropského původu [44]. Naopak v genu *PTEN* nebyla nalezena žádná varianta. Procentuální zastoupení jednotlivých kategorií nalezených variant klasifikovaných dle jejich klinického dopadu na pacienta je uvedeno v grafu 2.

Graf 2: Procentuální zastoupení variant třídy 3, 4 a 5 v testovaných genech



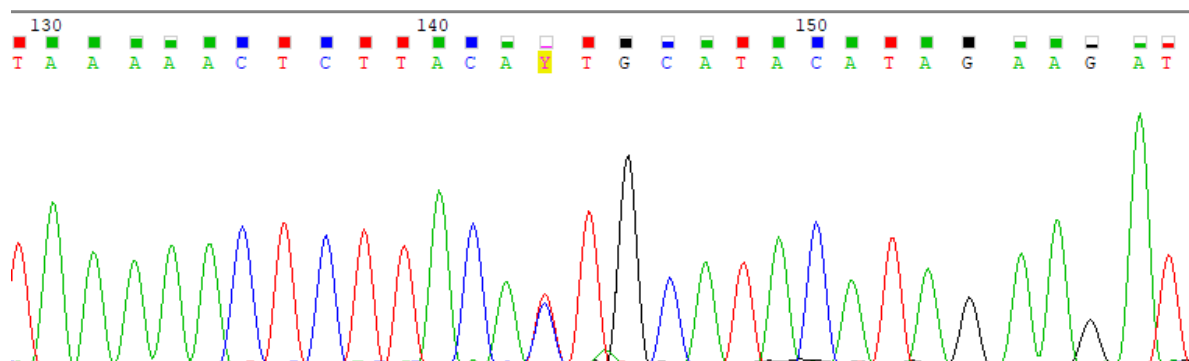
U 50 mužů bylo zachyceno 28 (56 %) variant s klinickým dopadem na pacienta (třída 4 a 5) a 109 (49,8 %) u 219 žen. Zastoupení klinicky významných variant, které zvyšují riziko rozvoje nádorového onemocnění bylo u žen a u mužů srovnatelné i přes to, že o vyšetření zažádalo a bylo indikováno méně mužů.

Ve skupině genů, kde byly interpretovány varianty tříd 3, 4, a 5 (tabulka 4), bylo zachyceno 173 variant nejasného klinického významu (třída 3), 40 pravděpodobně patogenních variant (třída 4) a 81 patogenních variant třídy 5.

V rámci třídy 3 není v současnosti znám prokazatelný klinický dopad na pacienta, a proto jsou interpretovány dle daných aktuálních skutečností a informací. Varianty je možné s odstupem času přehodnotit a na základě nových skutečností může dojít ke změně jejich klasifikace, resp. interpretaci. V genech *APC*, *CDH1*, *EPCAM*, *MSH2*, *SMAD4* a *STK11* byly nalezeny pouze varianty třídy 3, přičemž nejvíce v genech *ATM* (27/15,6 %) a *MSH6* (26/15,0 %).

Ve skupině genů interpretovaných jako třída 4 bylo nejvíce variant zastoupeno v genu *CHEK2* (37 z celkových 40 variant/92,5 %), a to z důvodu výskytu varianty c.470T>C (p.Ile157Thr) v heterozygotním stavu (obrázek 12). Toto zjištění koresponduje s nálezy Pohlreich (2012) a Kleibl (2008) [45, 46]. Tato varianta způsobuje záměnu aminokyseliny isoleucinu za threonin na pozici 157. Dle dostupné literatury, varianta c.470T>C postihující vysoce důležitou oblast (FHA doménu) *CHEK2* genu vede ke vzniku proteinu se sníženou schopností reagovat na poškození DNA vlivem redukované vazby na další proteiny reparačních drah [46, 47]. Výsledky funkčních studií jsou u této varianty však rozporuplné. Některé charakterizují tuto variantu jako funkční [48, 49], jiné prokázaly sníženou interakci s vazebnými partnery p53 a *BRCA1* [50, 51, 52], zhoršenou oligomerizaci *CHEK2* se sníženou autofosforylací [53]

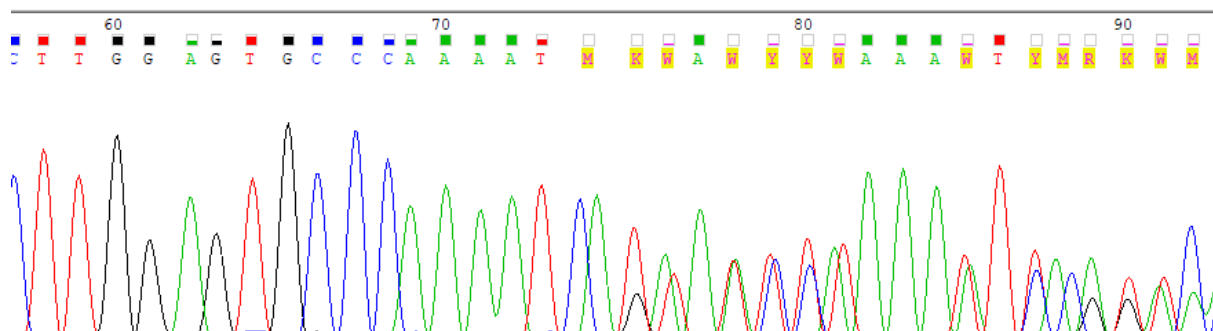
a sníženou aktivitou enzymu [54]. Případové kontrolní studie uvádějí, že se jedná o změnu s nízkou penetrancí zvyšující riziko vzniku nádorového onemocnění prsu, ovarií, endokrinních žláz a kolorektálního karcinomu oproti běžné populaci 1,5-4,5× [55, 56, 57, 58].



Obrázek 12: *CHEK2 c.470T>C/p.Ile157Thr (HGVS nomenklatura), HET, forward sekvence*

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

Nejvíce variant třídy 5 bylo zachyceno u pacientů v genech *CHEK2*, *MUTYH* a *SPINK1* (tabulka 5). V genu *CHEK2* byla zachycena varianta c.1100del (p.Thr367MetfsTer15), která je v evropské populaci považována za nejčastěji se vyskytující (obrázek 13) [58]. V našem souboru se vyskytovala u 4 pacientů. Delece způsobuje předčasné zastavení translace *CHEK2* proteinu a tento zkrácený protein ztrácí svou kinázovou aktivitu [59, 60]. Tato varianta je spojována nejen s karcinomy prsu, ovarií, prostaty, ale i s karcinomy kolorekta [61, 62] a zvyšuje riziko nádorové predispozice oproti běžné populaci 2× [63].



Obrázek 13: *CHEK2 c.1100del/p.Thr367MetfsTer15 (HGVS nomenklatura), HET, revers sekvence*

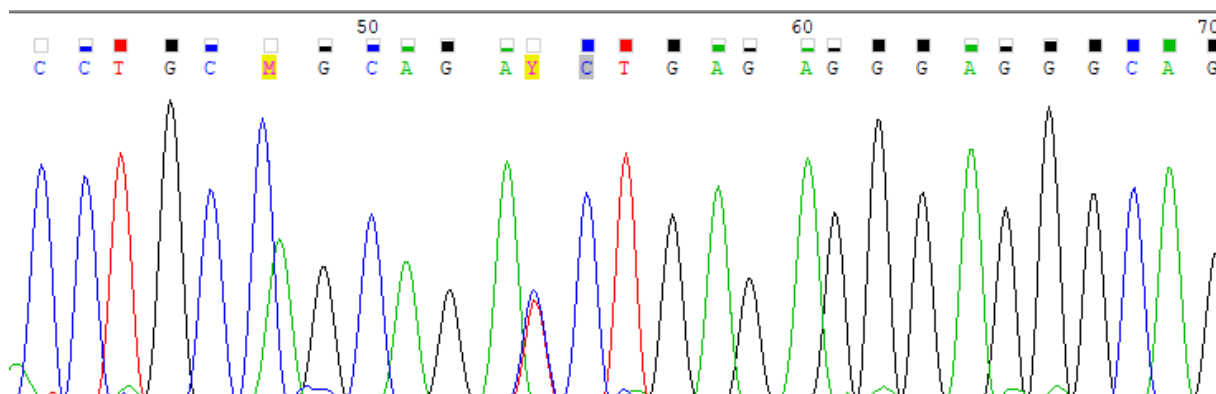
(Zdroj: MG laboratoř CLG)

Tabulka 5: Počty nalezených variant třídy 4 a 5 v testovaných genech.

Klasifikace variant	Gen	Varianta	Proteinový zápis	dbSNP databáze rs ID	Počet pacientů
Třída 4 pravděpodobně patogenní	CHEK2	c.1160C>A	p.Thr387Asn	rs5877780168	1
	CHEK2	c.433C>T	p.Arg145Trp	rs137853007	1
	CHEK2	c.470T>C	p.Ile157Thr	rs17879961	33
	CHEK2	c.846+4_846+7delAGTA		rs764884641	2
	MLH1	c.170_181del	p.Lys57_Gln60del	rs1575395286	1
	MUTYH	c.348+10C>T		rs369242529	1
	POLE	c.1503_1504del	p.Cys501Ter	rs762636894	1
	POLE	c.4654_4655del	p.Thr1552LeufsTer8	rs1555222708	1
	PRSS1	c.256C>T	p.Gln86Ter	rs146398318	1
	TP53	c.760A>G	p.Ile254Val	rs746601313	6
Třída 5 patogenní	ATM	c.3802del	p.Val1268Ter	rs587779834	1
	ATM	c.3850del	p.Thr1284GlnfsTer9	rs876660865	1
	ATM	c.4451del	p.Met148ArgfsTer15	rs1555099760	1
	ATM	c.7010_7065dup	p.Ile2356ValfsTer2	rs1555120985	1
	ATM	c.7327C>T	p.Arg2443Ter	rs121434220	1
	ATM	c.7630_2A>C		rs587779866	2
	ATM	c.9021dup	p.Arg3008ThrfsTer55	rs876660235	1
	BLM	c.1642C>T	p.Gln548Ter	rs200389141	3
	CHEK2	c.1100del	p.Thr367MetfsTer15	rs555607708	4
	CHEK2	c.1283C>T	p.Ser428Phe	rs137853011	1
	CHEK2	c.277del	p.Trp93GlyfsTer17	rs786203458	2
	CHEK2	c.444+1G>A		rs121908698	1
	CHEK2	delece exonů 1 až 15			1
	CHEK2	delece exonů 9 a 10			7
	MSH6	c.1190_1191del	p.Tyr397CysfsTer3	rs63750439	1
	MSH6	c.3261dup	p.Phe1088LeufsTer5	rs267608078	4
	MSH6	c.752_753insC	p.Ser252IlefsTer4		1
	MUTYH	c.1147delC	p.Ala385ProfsTer23	rs587778536	3
	MUTYH	c.1187G>A	p.Gly396Asp	rs36053993	13
	MUTYH	c.1437_1439del	p.Glu480del	rs587778541	1
	MUTYH	c.536A>G	p.Tyr179Cys	rs34612342	3
	MUTYH	c.933+3A>C		rs587780751	2
	PMS2	c.2186_2187del	p.Leu729GlnfsTer6	rs587779335	6
	POLE	c.51dup	p.Glu18ArgfsTer6	rs2136051965	2
	SDHB	c.725G>A	p.Arg242His	rs74315368	3
	SPINK1	c.101A>G	p.Asn34Ser	rs17107315	21
	SPINK1	c.194+2T>C		rs148954387	1
	TP53	c.742C>T	p.Arg248Trp	rs121912651	1

V genu *MUTYH* byla nejvíce zastoupena varianta c.1187G>A (p.Gly396Asp), u 12 pacientů v heterozygotním stavu (obrázek 14) a u jednoho v homozygotním. Tato varianta způsobuje záměnu aminokyseliny glycin za kyselinu asparagovou. Tato substituce způsobuje narušení funkce proteinu [64, 65]. Varianta způsobuje narušení enzymatické aktivity vznikajícího proteinu [66] a je nejčastěji se vyskytující u nemocných s karcinomem kolorekta či adenomatózních polypóz. Pacienti, kteří nesou pouze jednu *MUTYH* mutaci (heterozygoti) mají mírně zvýšené riziko pro rozvoj kolorektálního karcinomu oproti běžné populaci (2-3×), narozdíl od nosičů dvou *MUTYH* mutací (homozygoti; až 100×). Mutace v *MUTYH* genu v homozygotní neboli v bialelické formě jsou příčinou autozomálně recesivní *MUTYH*-asociované polypózy charakterizované vznikem kolorektálních adenomů (s variabilním počtem 3-100 adenomových polypů) s možnou následnou progresí do kolorektálního karcinomu [67]. Pacientovi, který je nosičem této varianty v homozygotním stavu byla na základě tohoto zjištění

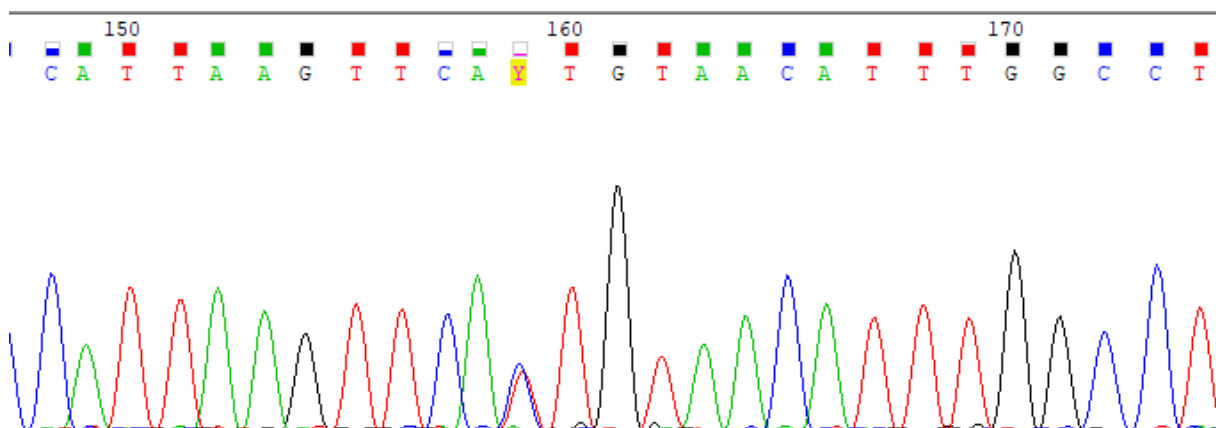
potvrzena *MUTYH*-asociovaná polypóza (MAP). Klinický genetik tomuto pacientovi doporučil sledování u onkologa a gastroenterologa a sestavil plán preventivních vyšetření.



Obrázek 14: *MUTYH* c.1187G>A/p.Gly396Asp (HGVS nomenklatura), HET, revers sekvence

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

Varianta v genu *SPINK1* c.101A>G (p.Asn34Ser), která byla nalezena u 21 pacientů v heterozygotním stavu (obrázek 15) způsobuje záměnu asparaginu za serin na pozici 34. Tato varianta je lokalizována v Kazal like doméně kódujícího proteinu [68]. I když řada experimentálních studií neprokázala její negativní vliv na známou funkci proteinu *SPINK1*, je tato záměna spojována s vyšším rizikem recidivující akutní pankreatitidy a s rizikem rozvoje chronické pankreatitidy [69, 70]. V řadě studií byl publikován její patogenní dopad u pacientů v homozygotním stavu nebo ve složeném heterozygotním s další patogenní variantou v *SPINK1* genu [70, 71].



Obrázek 15: *SPINK1* c.101A>G/p.Asn34Ser (HGVS nomenklatura), HET, revers sekvence

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

Sekvenační analýzou byla u jednoho pacienta detekována patogenní varianta c.752_753insC (p.Ser252IlefsTer4, heterozygotní stav) v *MSH6* genu (obrázek 16), která doposud nebyla reportována v literatuře a není uvedena ani v dostupných databázích. Tato změna způsobuje posun čtecího rámce a vznik stop kodonu. Varianta je vzhledem ke svému důsledku

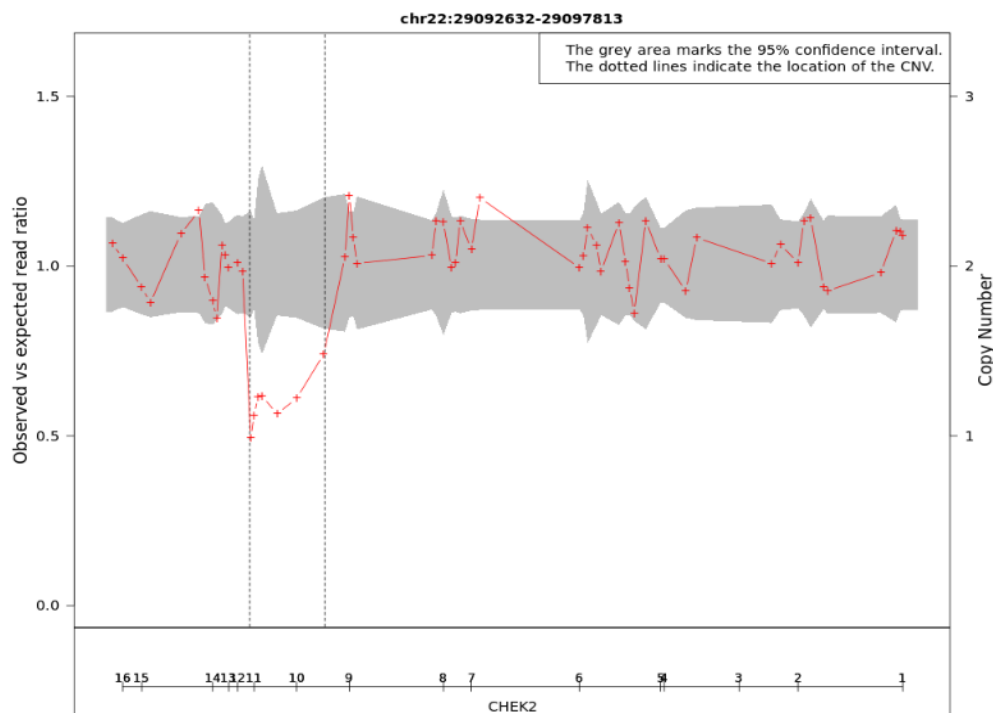
[illegible]

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

Box plot showing the distribution of the number of reads for various BRCA2 variants. The y-axis represents the number of reads, ranging from 0 to 2.5. The x-axis lists the variants. The plot is divided into two sections: a blue section for variants with a read depth of 240nt and an orange section for variants with a read depth of 480nt. Each variant has a box plot showing the median, quartiles, and outliers. A red horizontal line is drawn at approximately 0.75 reads, and a blue horizontal line is drawn at approximately 1.3 reads.

Variant	Read Depth (nt)	Approx. Median Reads
BRCA2-1p - 240nt	240	1.0
BRCA2-1 - 130nt	240	0.9
BRCA2-1 - 154nt	240	1.0
BRCA2-2 - 172nt	240	0.9
BRCA2-3 (WT) lineA1 - 238nt	240	1.0
BRCA2-3 - 420nt	240	0.9
BRCA2-4 - 202nt	240	1.0
BRCA2-5 - 321nt	240	1.0
BRCA2-6 - 356nt	240	1.0
BRCA2-7 - 200nt	240	0.9
BRCA2-8 - 454nt	240	0.9
BRCA2-9 - 232nt	240	1.0
BRCA2-10 - 250nt	240	1.0
BRCA2-10 - 220nt	240	1.0
BRCA2-10 - 391nt	240	1.0
BRCA2-11 - 285nt	240	0.9
BRCA2-11 - 142nt	240	1.0
BRCA2-11 - 166nt	240	1.0
BRCA2-11 - 190nt	240	1.0
BRCA2-11 - 481nt	240	1.0
BRCA2-11 - 283nt	240	1.0
BRCA2-12 - 337nt	240	1.0
BRCA2-13 - 313nt	240	1.0
BRCA2-14 - 150nt	240	0.9
BRCA2-15 - 418nt	240	0.9
BRCA2-16 - 346nt	240	1.0
BRCA2-17 - 354nt	240	1.0
BRCA2-18 - 231nt	240	0.9
BRCA2-19 - 139nt	240	1.0
BRCA2-20 - 400nt	240	1.0
BRCA2-21 - 373nt	240	1.0
BRCA2-22 - 184nt	240	1.0
BRCA2-23 - 186nt	240	1.0
BRCA2-24 - 445nt	240	0.9
BRCA2-25 - 226nt	240	1.0
BRCA2-26 - 472nt	240	1.0
BRCA2-27 - 295nt	240	1.0
BRCA2-27 - 328nt	240	1.0
BRCA2-27 - 275nt	240	1.0
NBP1L1-3 - 462nt	240	0.9
C-HEK2-1 - 271nt	480	1.0
C-HEK2-3 - 409nt	480	1.0
C-HEK2-1 (MUT) 1100delC - 480nt	480	0.4
Reference - 304nt	480	1.0
Reference - 178nt	480	1.0
Reference - 130nt	480	0.8
Reference - 214nt	480	1.0
Reference - 500nt	480	1.0
Reference - 257nt	480	1.0
Reference - 436nt	480	1.0
Reference - 382nt	480	1.0

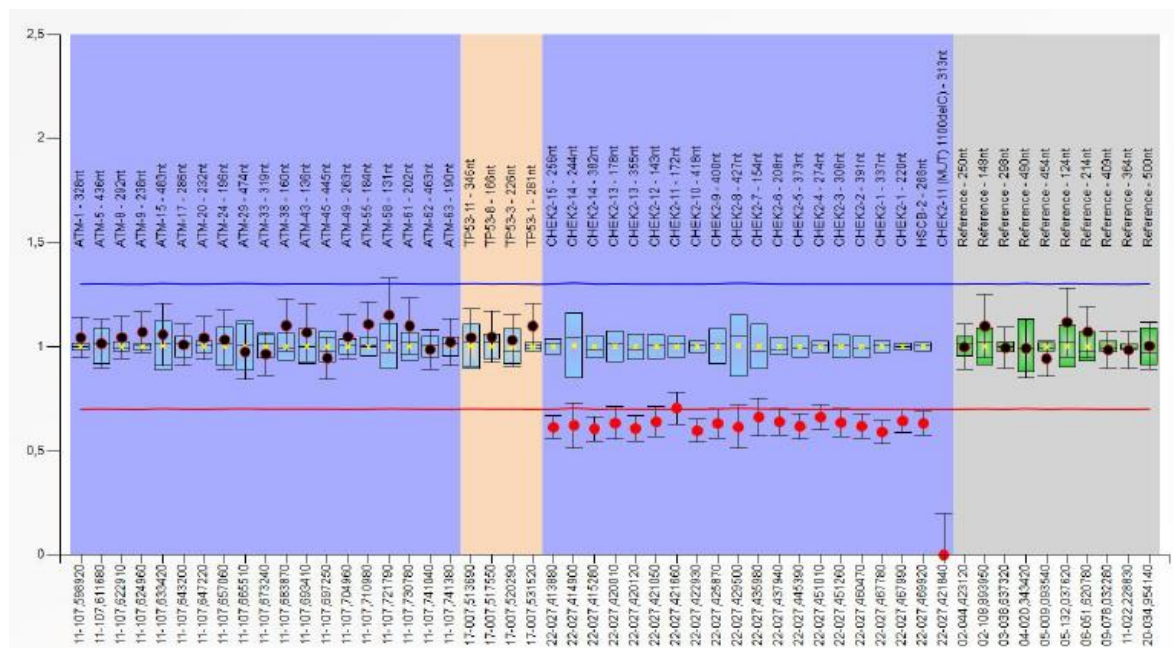
(Zdroj: MG laboratoř CLG)



Obrázek 18: Delece exonů 9, 10 v genu *CHEK2*, *HET* (NGS CNV analýza)

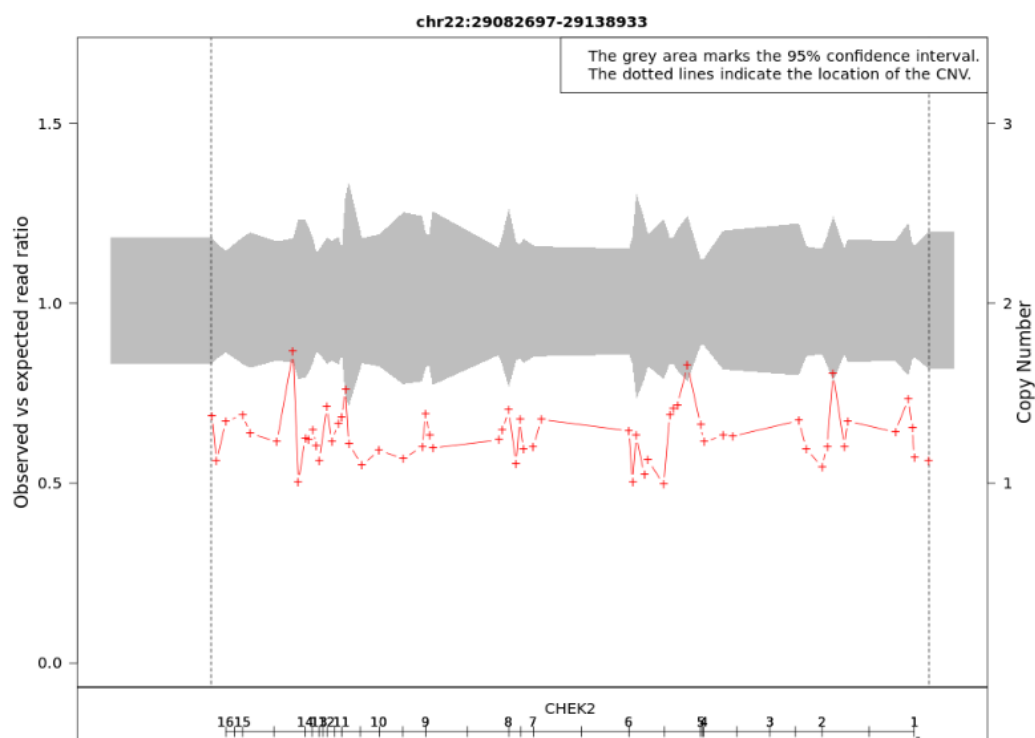
(Zdroj: MG laboratoř CLG)

Rovněž byla u jednoho pacienta detekována intragenová delece exonů 1 až 15 v *CHEK2* genu v heterozygotním stavu (obrázek 19 a 20). Delece zahrnuje celou kódující sekvenci *CHEK2* genu. Tato konkrétní delece nebyla doposud publikována, ovšem obdobně rozsáhlé delece jsou popsány v literatuře jako změny s patogenním dopadem [54, 73, 74].



Obrázek 19: Delece exonů 1 až 15 v genu *CHEK2*, *HET* (SALSA MLPA *CHEK2* P190)

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

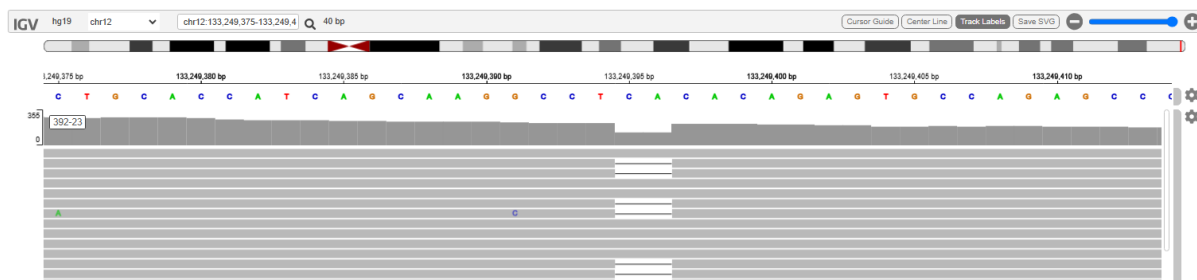


Obrázek 20: Delece exonů 1 až 15 v genu *CHEK2*, *HET* (NGS CNV analýza)

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

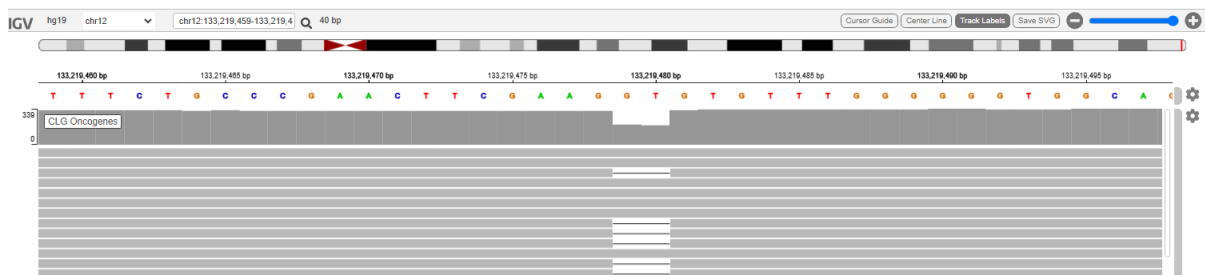
Ve skupině genů, kde byly interpretovány varianty tříd 4 a 5 (tabulka 4) byly zachyceny u 10 pacientů dvě pravděpodobně patogenní varianty a osm variant patogenních (tabulka 5).

V genu *POLE* byly zjištěny varianty c.1503_1504del (p.Cys501Ter) (obrázek 21) a c.4654_4655del (p.Thr1552LeufsTer8) (obrázek 22) v heterozygotním stavu. Obě varianty způsobují alternativní sestřih proteinu delecí dvou bází, díky které dochází ke vzniku předčasného terminačního kodonu. Varianty neleží v exonukleázové doméně proteinu *POLE*, jejíž poškození je v literatuře spojováno se zvýšeným rizikem vzniku kolorektálních nádorů a nádorů endometria [75, 76, 77]. Tyto konkrétní varianty nebyly doposud publikovány v literatuře, avšak Garmez (2022) potvrdil patogenitu nalezených variant lokalizovaných mimo exonukleázovou doménu proteinu [78]. Tyto varianty vzhledem ke svému důsledku předčasného zastavení translace v genu *POLE* můžeme označit jako pravděpodobně patogenní.



Obrázek 21: *POLE* c.1503_1504del/p.Cys501Ter (HGVS nomenklatura), *HET*

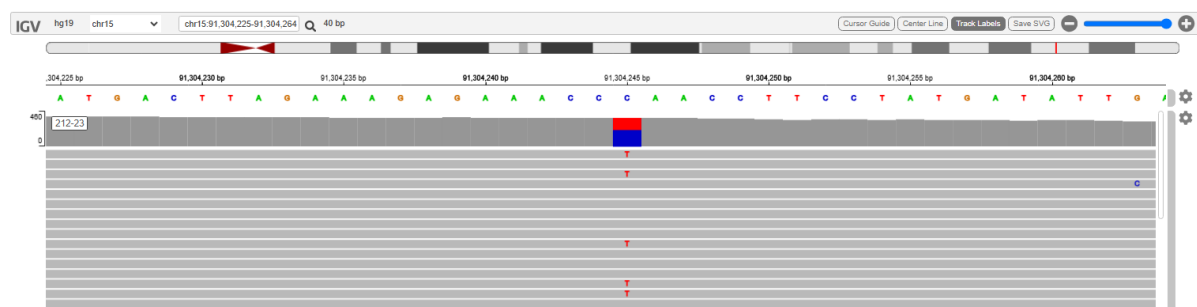
(Zdroj: MG laboratoř CLG)



Obrázek 22: *POLE* c.4654_4655del/p.Thr1552LeufsTer8 (HGVS nomenklatura), HET

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

Patogenní sekvenční varianta c.1642C>T (p.Gln548Ter, heterozygotní stav) v genu *BLM* (obrázek 23) nalezená u tří pacientů (tabulka 5) způsobuje změnu glutaminu na stop kodon. Mutace v *BLM* genu vedou k předčasnému zastavení translace vznikajícího proteinu z rodiny RecQ helicáz, čímž dochází k narušení procesu udržení struktury a integrity DNA. Varianty vedoucí ke ztrátě funkčnosti vznikajícího BLM proteinu byly v literatuře reportovány jako příčina vzniku autozomálně recesivního onemocnění Bloom syndromu [79, 80]. Varianta je v heterozygotním stavu také spojována se zvýšeným rizikem rozvoje karcinomu prsu obzvláště ve slovanské populaci [81, 82, 83, 84].



Obrázek 23: *BLM* c.1642C>T/p.Gln548Ter (HGVS nomenklatura), HET

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

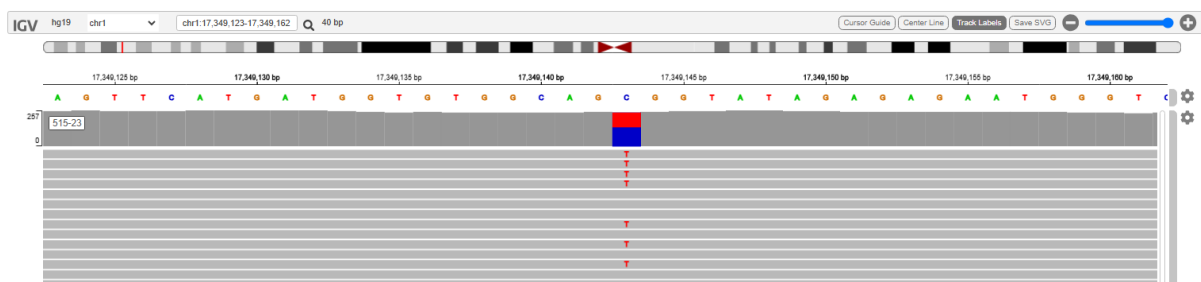
U dvou pacientů z testovaného souboru byla v genu *POLE* nalezena patogenní varianta c.51dup (p.Glu18ArgfsTer6) způsobující alternativní sestřih proteinu duplikací jedné báze, díky které dochází k záměně kyseliny glutamové za arginin a vzniku předčasného terminačního kodonu (obrázek 24). Varianta neleží rovněž v exonukleázové doméně proteinu *POLE*, jejíž poškození je v literatuře spojováno, stejně jako v případě předchozích variant třídy 4, se zvýšeným rizikem vzniku koloektálních nádorů a nádorů endometria [75, 76, 77].



Obrázek 24: *POLE* c.51dup/p.Glu18ArgfsTer6 (HGVS nomenklatura), HET, forward sekvence

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

Varianta c.725G>A (p.Arg242His) v heterozygotní formě v *SDHB* genu (obrázek 25) byla nalezena u tří pacientů. Tato mutace způsobuje záměnu aminokyseliny argininu za histidin. *SDHB* gen kóduje část enzymatického komplexu, který hraje zásadní roli v Krebsově cyklu a v mitochondriálním dýchacím řetězci. Jeho další funkce, jako tumor-supresorového genu, spočívá v regulaci procesů dělení a růstu buněk. Tato varianta se vyskytuje v jeho vysoce konzervovaném motivu, který je nezbytný v procesu přeměny energie v buňkách [85]. Varianty poškozující funkci *SDHB* genu jsou příčinou rozvoje paragangliomů, gastrointestinálních tumorů, papilárních karcinomů štítné žlázy a také agresivní formy karcinomu ledvin [85, 86, 87].



Obrázek 25: *SDHB* c.725G>A/p.Arg242His (HGVS nomenklatura), HET, reverse sekvence

(Zdroj: MG laboratoř CLG)

5. Závěr

Studie identifikovala 304 variant v 18 genech spojených s hereditárními nádorovými onemocněními trávicího traktu. Tyto varianty byly nalezeny u 24,1 % pacientů, přičemž většina z nich byla v heterozygotním stavu.

Klinicky významné varianty, které mohou zvyšovat riziko vzniku nádorů, byly nalezeny u podobného procenta mužů i žen, přičemž mezi pohlavími nebyl pozorován výrazný rozdíl v zastoupení těchto variant.

Studie odhalila nové varianty v genech *MSH6* a *CHEK2*, které nebyly dříve publikovány, a potvrdila známé patogenní varianty, které mohou vést k vyššímu riziku vzniku různých typů nádorů, jako jsou rakovina prsu, ovaria či kolorektálního karcinomu.

Nejčastější varianty byly nalezeny v genu *CHEK2*, což potvrzuje jeho význam v hereditární predispozici k nádorům.

V rámci studie byla u jednoho pacienta detekována homozygotní mutace v genu *MUTYH*, která vedla k diagnostice *MUTYH*-asociované polypózy (MAP). U pacienta byla na základě tohoto nálezu doporučena intenzivní sledování a preventivní vyšetření, což podtrhuje důležitost genetického testování při identifikaci osob s vyšším rizikem nádorových onemocnění.

6. Použitá literatura

- [1] HOFMANOVÁ, Jiřina. *Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy*. Online. Genotoxicita a karcinogeneze. Nedatováno. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html. [cit. 2024-10-05].
- [2] ŽALOUDEK, Jan. *Vyhněte se rakovině aneb prevence zhoubných nádorů pro každého*. Grada, 2011. ISBN 978-80-247-2307-5.
- [3] NATIONAL CANCER INSTITUTE. *Cancers by Body Location/System*. Online. Nedatováno. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/types/by-body-location>. [cit. 2024-10-05].
- [4] O'CONNOR, Clare. *Human Chromosome Translocations and Cancer*. Online. Nature Education. 2008. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>. [cit. 2024-10-05].
- [5] NATIONAL CANCER INSTITUTE. *Metastatic Cancer: When Cancer Spreads*. Online. 2020. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>. [cit. 2024-10-05].
- [6] FORETOVÁ, Lenka; MACHÁČKOVÁ, Eva a GAILLYOVÁ, Renata. *Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi*. Praha: Grada Publishing, 2022. ISBN 978-80-271-1293-7.
- [7] COOPER UNIVERSITY HEALTH CARE. *Review of Cancer Genetics*. Online. 2016. Dostupné z: https://www.cooperhealth.org/sites/default/files/pdfs/Review_of_Cancer_Genetics.pdf. [cit. 2024-10-06].
- [8] HANAHAN, Douglas a WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Online. *Cell*. 2011, roč. 144, č. 5, s. 646-674. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>. [cit. 2024-10-12].
- [9] ZSCHOCKE, Johannes a WEINBERG, Robert A. Dominant versus recessive: Molecular mechanisms in metabolic disease. Online. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2008, roč. 31, č. 5, s. 599-618. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10545-008-1016-5>. [cit. 2024-10-12].
- [10] HINO, Okio a KOBAYASHI, Toshiyuki. Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex. Online. *Cancer Science*. 2017, roč. 108, č. 1, s. 5-11. ISSN 1347-9032. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cas.13116>. [cit. 2024-10-12].
- [11] BETTS, J. Gordon et al. *Anatomy and Physiology 2e*. Online. Houston: OpenStax, 2022. ISBN 978-1-951693-42-8. Dostupné z: https://assets.openstax.org/oscms-prodcmis/media/documents/Anatomy_and_Physiology_2e_-_WEB_c9nD9QL.pdf. [cit. 2024-10-12].
- [12] BÜCHLER, Tomáš et al. *Obecná onkologie*. Online. Jessenius. Praha: Maxdorf, [2019]. ISBN 978-80-7345-617-7. [cit. 2024-10-12].
- [13] GARIBYAN, Lilit a AVASHIA, Nidhi. Polymerase Chain Reaction. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, roč. 133, č. 3, s. 1-4. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>. [cit. 2024-10-13].
- [14] FAKRUDDIN, Md. a CHOWDHURY, Abhijit. Pyrosequencing-An Alternative to Traditional Sanger Sequencing. Online. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2012, roč. 8, č. 1, s. 14-20. ISSN 1553-3468. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Fakruddin-Md/publication/235913524_Pyrosequencing-

[An Alternative to Traditional Sanger Sequencing/links/0c960518f275f8b069000000/Pyrosequencing-An-Alternative-to-Traditional-Sanger-Sequencing.pdf](#). [cit. 2024-10-19].

[15] TICHÁ, Ivana. *Genetické faktory odpovědné za vývoj dědičného karcinomu prsu a ovaria: rozsáhlé přestavby v genech BRCA1 a BRCA2*. Online, Dizertační práce, vedoucí Doc. MUDr. Petr Pohleisch, CSc. Praha: 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, 2010. Dostupné: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/34921/140002790.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. [cit. 2024-10-19].

[16] MONTEIRO DE PINA-NETO, João. Genetic counseling. Online. *Jornal de Pediatria*. 2008, roč. 84, č. 4, s. 20-26. ISSN 0021-7557. Dostupné z: <https://www.scielo.br/j/jped/a/CN9MqPcMqv8vyjHDYg69gLg/?format=pdf&lang=en>. [cit. 2024-10-20].

[17] ŠTASTNÝ, M. a ŘÍHOVÁ, B. Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému. Online. *Klinická onkologie*. 2015, roč. 28, č. 4, s. 28-37. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/408/4836.pdf>. [cit. 2024-10-20].

[18] WALDHAUER, I. a STEINLE, A. NK cells and cancer immunosurveillance. Online. *Oncogene*. 2008, roč. 27, č. 45, s. 5932-5943. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/onc.2008.267>. [cit. 2024-10-27].

[19] PRITCHARD, D. J. a KORF, Bruce R. *Základy lékařské genetiky*. Základy. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-449-2.

[20] KOPANOS, Christos et al. VarSome: the human genomic variant search engine. Online. *Bioinformatics*. 2018, roč. 35, č. 11, s. 1978-1980. Dostupné z: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/35/11/1978/5146783>. [cit. 2024-10-27].

[21] JANATOVÁ, M. et al. Klasifikace zárodečných variant identifikovaných při genetickém vyšetření nádorové predispozice-konsenzus konsorcia CZE CANCA. Online. *Klinická onkologie*. 2023, roč. 36, č. 6, s. 431-439. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/527/6268.pdf>. [cit. 2024-11-02].

[22] SOUKUPOVÁ, J. et al. CZE CANCA: CZEch CAncer paNel for Clinical Application – návrh a příprava cíleného sekvenačního panelu pro identifikaci nádorové predispozice u rizikových osob v České republice. Online. *Klinická onkologie*. 2016, roč. 29, č. 1, s. 46-54. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/200/4877.pdf>. [cit. 2024-11-02].

[23] MLKVÁ, I. Genetika tumorigenézy nádorů kolorekta (možnosti testování a screeningové predikce dědičné formy onemocnění – Lynchova syndromu). Online. *Klinická onkologie*. 2016, roč. 29, č. 1, s. 55-61. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/200/4879.pdf>. [cit. 2024-11-03].

[24] IDOS, Gregory a VALLE, Laura. Lynch Syndrome. Online. *National Cancer for Biotechnology Information*. 2021. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/>. [cit. 2024-11-02].

[25] NAGY, Rebecca; SWEET, Kevin a ENG, Charis. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. Online. *Oncogene*. 2004, roč. 23, č. 38, s. 6445-6470. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207714>. [cit. 2024-11-09].

[26] PELTOMÄKI, Päivi; SWEET, Kevin a ENG, Charis. Lynch Syndrome Genes. Online. *Familial Cancer*. 2005, roč. 4, č. 3, s. 227-232. ISSN 1389-9600. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10689-004-7993-0>. [cit. 2024-11-09].

[27] *National Institutes of Health*. Online. Dostupné z: <https://www.nih.gov/>. [cit. 2024-12-07].

[28] NCBI: National Center for Biotechnology Information. Online. Dostupné zde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [cit. 2024-11-07].

[29] RICCI, Maria Teresa; MICCOLI, Sara; TURCHETTI, Daniela; BONDAVALLI, Davide; VIEL, Alessandra et al. Type and frequency of MUTYH variants in Italian patients with suspected MAP: a retrospective multicenter study. Online. *Journal of Human Genetics*. 2017, roč. 62, č. 2, s. 309-315. ISSN 1434-5161. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.132>. [cit. 2024-11-23].

[30] VASEN, H. F. A.; MOSLEIN, G.; ALONSO, A.; ARETZ, S.; BERNSTEIN, I. et al. Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP): a retrospective multicenter study. Online. *Gut*. 2008, roč. 57, č. 5, s. 704-713. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/gut.2007.136127>. [cit. 2024-11-23].

[31] WILLINGHAM, Field; RAPHAEL, Kara; ALONSO, A.; ARETZ, S.; BERNSTEIN, I. et al. Hereditary pancreatitis: current perspectives. Online. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2016, roč. 9, č. 5, s. 197-207. ISSN 1178-7023. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/CEG.S84358>. [cit. 2024-11-23].

[32] BLAIR, Vanessa R; MCLEOD, Maybelle; CARNEIRO, Fátima; COIT, Daniel G; D'ADDARIO, Johanna L et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical practice guidelines. Online. *The Lancet Oncology*. 2020, roč. 21, č. 8, s. e386-e397. ISSN 14702045. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30219-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30219-9). [cit. 2024-11-23].

[33] PLEVOVÁ, Pavlína; MCLEOD, Maybelle; CARNEIRO, Fátima; COIT, Daniel G; D'ADDARIO, Johanna L et al. An Update on Inherited Colon Cancer and Gastrointestinal Polyposis: updated clinical practice guidelines. Online. *Klinická Onkologie*. 2019, roč. 32, č. Suppl 2, s. e386-e397. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2019S97>. [cit. 2024-11-23].

[34] KOUDOVÁ, Monika; PUCHMAJEROVÁ, Alena; CARNEIRO, Fátima; COIT, Daniel G; D'ADDARIO, Johanna L et al. Risks of Solid Tumors in Heterozygous Carriers of Recessive Syndromes: updated clinical practice guidelines. Online. *Klinická Onkologie*. 2019, roč. 32, č. Suppl 2, s. e386-e397. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2019S14>. [cit. 2024-11-23].

[35] MACFARLANE, James; SEONG, Keat Cheah; BISAMBAR, Chad; MADHU, Basetti; ALLINSON, Kieren et al. A review of the tumour spectrum of germline succinate dehydrogenase gene mutations: Beyond pheochromocytoma and paraganglioma. Online. *Clinical Endocrinology*. 2020, roč. 93, č. 5, s. 528-538. ISSN 0300-0664. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cen.14289>. [cit. 2024-11-23].

[36] KLEIBLOVÁ, Petra; NOVOTNÝ, Jan; CIBULA, David; CURTISOVÁ, Václava; DUBOVÁ, Olga et al. The guidelines for clinical practice for carriers of germline mutations in hereditary breast, ovarian, prostate, and pancreatic cancer predisposition genes BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, and CHEK2 (4.2024): Beyond pheochromocytoma and paraganglioma. Online. *Klinická onkologie*. 2024, roč. 37, č. 4, s. 528-538. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.48095/ccko2024292>. [cit. 2024-11-23].

[37] ANDERSON, M W; REYNOLDS, S H; YOU, M; MARONPOT, R M; DUBOVÁ, Olga et al. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis: Beyond pheochromocytoma and paraganglioma. Online. *Environmental Health Perspectives*. 1992, roč. 98, č. 4, s. 13-24. ISSN 0091-6765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1289/ehp.929813>. [cit. 2024-11-23].

[38] NAMBIAR, Mridula; KARI, Vijayalakshmi; RAGHAVAN, Sathees C.; MARONPOT, R M; DUBOVÁ, Olga et al. Chromosomal translocations in cancer: Beyond pheochromocytoma and paraganglioma. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2008, roč. 1786, č. 2, s. 139-152. ISSN 0304419X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.07.005>. [cit. 2024-11-23].

- [39] CORMIER, J. N.; POLLOCK, R. E.; RAGHAVAN, Sathees C.; MARONPOT, R M; DUBOVÁ, Olga et al. Soft Tissue Sarcomas: Beyond pheochromocytoma and paraganglioma. Online. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2004, roč. 54, č. 2, s. 94-109. ISSN 0007-9235. Dostupné z: <https://doi.org/10.3322/canjclin.54.2.94>. [cit. 2024-11-23].
- [40] FRIBERG, Sten a MATTSON, Stefan. On the growth rates of human malignant tumors: implications for medical decision making. Online. 1998, roč. 65, č. 4, s. 284-297. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9274795/>. [cit. 2024-11-23].
- [41] WU, Song; ZHU, Wei; THOMPSON, Patricia a HANNUN, Yusuf A. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. Online. *Nature Communications*. 2018, roč. 9, č. 1, s. 284-297. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05467-z>. [cit. 2024-11-23].
- [42] BEŇA, František. *Onkologická rizika*. Prevence nádorových onemocnění ve 21. století : národní program zdraví. Brno: GAD Studio, 2001. ISBN 80-238-7620-1.
- [43] KOVEITYPOUR, Zahra et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. Online. *Cell & Bioscience*. 2019, roč. 97, č. 9. ISSN 2045-3701. Dostupné z: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-019-0361-4#citeas>. [cit. 2024-11-23].
- [44] CASWELL-JIN, Jennifer L.; GUPTA, Tanya; HALL, Evan; PETROVCHICH, Iva M.; MILLS, Meredith A. et al. Racial/ethnic differences in multiple-gene sequencing results for hereditary cancer risk. Online. *Genetics in Medicine*. 2018, roč. 20, č. 2, s. 234-239. ISSN 10983600. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/gim.2017.96>. [cit. 2024-12-14].
- [45] POHLREICH, Petr et al. Klinický význam analýz genů středního rizika pro hodnocení rizika vzniku karcinomu prsu a dalších nádorů v České republice. Online. *Klinická onkologie*. 2012, roč. 25, č. 1, s. 59-66. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2012-08-15-supplement-1/klinicky-vyznam-analyz-genu-stredniho-rizika-pro-hodnoceni-rizika-vzniku-karcino/>. [cit. 2024-12-14].
- [46] KLEIBL, Zdenek; HAVRANEK, Ondrej; NOVOTNY, Jan; KLEIBLOVA, Petra; SOUCEK, Pavel et al. Analysis of CHEK2 FHA domain in Czech patients with sporadic breast cancer revealed distinct rare genetic alterations. Online. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2008, roč. 112, č. 1, s. 159-164. ISSN 0167-6806. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9838-7>. [cit. 2024-12-14].
- [47] ROEB, Wendy; HIGGINS, Jake; KING, Mary-Claire; KLEIBLOVA, Petra; SOUCEK, Pavel et al. Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer. Online. *Human Molecular Genetics*. 2012, roč. 21, č. 12, s. 2738-2744. ISSN 0964-6906. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/hmg/dds101>. [cit. 2024-12-14].
- [48] DELIMITSOU, Angeliki; FOSTIRA, Florentia; KALFAKAKOU, Despoina; APOSTOLOU, Paraskevi; KONSTANTOPOULOU, Irene et al. Functional characterization of CHEK2 variants in a *Saccharomyces cerevisiae* system. Online. *Human Mutation*. 2019, roč. 40, č. 5, s. 631-648. ISSN 10597794. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/humu.23728>. [cit. 2024-12-14].
- [49] BOONEN, Rick A.C.M.; WIEGANT, Wouter W.; CELOSSE, Nandi; VROLING, Bas; HEIJL, Stephan et al. Functional Analysis Identifies Damaging CHEK2 Missense Variants Associated with Increased Cancer Risk. Online. *Cancer Research*. 2022, roč. 82, č. 4, s. 615-631. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1845>. [cit. 2024-12-14].
- [50] FALCK, Jacob; LUKAS, Claudia; PROTOPOPOVA, Marina; LUKAS, Jiri; SELIVANOVA, Galina et al. Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. Online. *Oncogene*. 2001, roč. 20, č. 39, s. 5503-5510. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204811>. [cit. 2024-12-14].

- [51] LI, Jiejing; WILLIAMS, Brandi L.; HAIRE, Lesley F.; GOLDBERG, Michal; WILKER, Erik et al. Structural and Functional Versatility of the FHA Domain in DNA-Damage Signaling by the Tumor Suppressor Kinase Chk2. Online. *Molecular Cell*. 2002, roč. 9, č. 5, s. 1045-1054. ISSN 10972765. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00527-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00527-0). [cit. 2024-12-14].
- [52] BAZINET, Alexandre; HEATH, John; CHONG, Anne-Sophie; SIMO-CHEYOU, Estelle R.; WORME, Samantha et al. Common clonal origin of chronic myelomonocytic leukemia and B-cell acute lymphoblastic leukemia in a patient with a germline CHEK2 variant. Online. *Molecular Case Studies*. 2021, roč. 7, č. 3, s. 1045-1054. ISSN 2373-2865. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/mcs.a006090>. [cit. 2024-12-14].
- [53] SCHWARZ, Julie K; LOVLY, Christine M a PIWNICA-WORMS, Helen. Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. Online. *Molecular cancer research: MCR*. 2003, roč. 1, č. 8, s. 598-609. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12805407/>. [cit. 2024-12-14].
- [54] KLEIBLOVÁ, Petra; STOLAŘOVÁ, Lenka; KŘÍŽOVÁ, Kateřina; LHOTA, Filip; JAN, Hojný et al. Germline CHEK2 Gene Mutations in Hereditary Breast Cancer Predisposition – Mutation Types and their Biological and Clinical Relevance. Online. *Klinická Onkologie*. 2019, roč. 32, č. Suppl 2, s. 598-609. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2019S36>. [cit. 2024-12-14].
- [55] HAN, Fei-fei; GUO, Chang-long; LIU, Li-hong; LHOTA, Filip; JAN, Hojný et al. The Effect of CHEK2 Variant I157T on Cancer Susceptibility: Evidence from a Meta-Analysis. Online. *DNA and Cell Biology*. 2013, roč. 32, č. 6, s. 329-335. ISSN 1044-5498. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/dna.2013.1970>. [cit. 2024-12-14].
- [56] SZELIGA, Anna; PRALAT, Aleksandra; WITCZAK, Wiktoria; PODFIGURNA, Agnieszka; WOJTYLA, Cezary et al. CHEK2 Mutation in Patient with Multiple Endocrine Glands Tumors. Case Report: Evidence from a Meta-Analysis. Online. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020, roč. 17, č. 12, s. 329-335. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijerph17124397>. [cit. 2024-12-14].
- [57] ELHADY, Ghada M; ELNAGGAR, Mostafa A a DESOUKY, Lubna M. Association of CHEK2 I157T and SULT1A1 R213H genetic variants with risk of sporadic colorectal cancer in a sample of Egyptian patients. Online. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2022, article 18. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s43042-022-00238-4>. [cit. 2024-12-14].
- [58] ŠVAJDLER, Peter; VASOVČÁK, Peter; ŠVAJDLER, Marián; ŠEDIVCOVÁ, Monika; URBÁN, Veronika et al. CHEK2p.I157T Mutation Is Associated with Increased Risk of Adult-Type Ovarian Granulosa Cell Tumors. Online. *Cancers*. 2022, roč. 14, č. 5. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers14051208>. [cit. 2024-12-14].
- [59] LEE, S B et al. Destabilization of CHK2 by a missense mutation associated with Li-Fraumeni Syndrome. Online. *Cancer research*. 2001, roč. 61, č. 22. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11719428/>. [cit. 2024-12-14].
- [60] WU, Xianglin; WEBSTER, Shelley R. a CHEN, Junjie. Characterization of Tumor-associated Chk2 Mutations. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, roč. 276, č. 4, s. 2971-2974. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M009727200>. [cit. 2024-12-14].
- [61] BERNSTEIN, Jonine L.; TERAOKA, Sharon N.; JOHN, Esther M.; ANDRULIS, Irene L.; KNIGHT, Julia A. et al. The CHEK2*1100delC Allelic Variant and Risk of Breast Cancer: Screening Results from the Breast Cancer Family Registry. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, roč. 15, č. 2, s. 348-352. ISSN 1055-9965. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0557>. [cit. 2024-12-14].
- [62] WEISCHER, Maren; HEERFORDT, Ida M.; BOJESSEN, Stig E.; EIGENTLER, Thomas; GARBE, Claus et al. CHEK2*1100delC and Risk of Malignant Melanoma: Danish and German Studies and Meta-Analysis. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012, roč. 132, č. 2, s. 299-303. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jid.2011.303>. [cit. 2024-12-14].

- [63] LEEDOM, Tracey P.; LADUCA, Holly; MCFARLAND, Rachel; LI, Shuwei; DOLINSKY, Jill S. et al. Breast cancer risk is similar for CHEK2 founder and non-founder mutation carriers: Danish and German Studies and Meta-Analysis. Online. *Cancer Genetics*. 2016, roč. 209, č. 9, s. 403-407. ISSN 22107762. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.08.005>. [cit. 2024-12-14].
- [64] KUNDU, Sucharita; BRINKMEYER, Megan K.; LIVINGSTON, Alison L.; DAVID, Sheila S.; DOLINSKY, Jill S. et al. Adenine removal activity and bacterial complementation with the human MutY homologue (MUTYH) and Y165C, G382D, P391L and Q324R variants associated with colorectal cancer: Danish and German Studies and Meta-Analysis. Online. *DNA Repair*. 2009, roč. 8, č. 12, s. 1400-1410. ISSN 15687864. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.09.009>. [cit. 2024-12-14].
- [65] RAETZ, Alan G.; XIE, Yali; KUNDU, Sucharita; BRINKMEYER, Megan K.; DOLINSKY, Jill S. et al. Adenine removal activity and bacterial complementation with the human MutY homologue (MUTYH) and Y165C, G382D, P391L and Q324R variants associated with colorectal cancer: Danish and German Studies and Meta-Analysis. Online. *Carcinogenesis*. 2012, roč. 33, č. 11, s. 1400-1410. ISSN 1460-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs270>. [cit. 2024-12-14].
- [66] DUMANSKI, Jan P; RASI, Chiara; BJÖRKLUND, Peyman; DAVIES, Hanna; ALI, Abir S et al. A MUTYH germline mutation is associated with small intestinal neuroendocrine tumors: Danish and German Studies and Meta-Analysis. Online. *Endocrine-Related Cancer*. 2017, roč. 24, č. 8, s. 427-443. ISSN 1351-0088. Dostupné z: <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0196>. [cit. 2024-12-14].
- [67] NIELSEN, Maartje et al. MUTYH Polyposis. Online. *GeneReviews*. 2012. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23035301/>. [cit. 2024-12-14].
- [68] NAGEL, Felix; PALM, Gottfried J.; GEIST, Norman; MCDONNELL, Thomas C. R.; SUSEMIHL, Anne et al. Structural and Biophysical Insights into SPINK1 Bound to Human Cationic Trypsin. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 7. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23073468>. [cit. 2024-12-14].
- [69] MASSON, Emmanuelle; CHEN, Jian-Min; AUDRÉZET, Marie-Pierre; COOPER, David N.; FÉREC, Claude et al. A Conservative Assessment of the Major Genetic Causes of Idiopathic Chronic Pancreatitis: Data from a Comprehensive Analysis of PRSS1, SPINK1, CTSC and CFTR Genes in 253 Young French Patients. Online. *PLoS ONE*. 2013, roč. 8, č. 8. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073522>. [cit. 2024-12-14].
- [70] WITT, Heiko; LUCK, Werner; HENNIES, Hans Christian; CLASSEN, Martin; KAGE, Andreas et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis: Data from a Comprehensive Analysis of PRSS1, SPINK1, CTSC and CFTR Genes in 253 Young French Patients. Online. *Nature Genetics*. 2000, roč. 25, č. 2, s. 213-216. ISSN 1061-4036. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/76088>. [cit. 2024-12-14].
- [71] BOULLING, Arnaud; MASSON, Emmanuelle; ZOU, Wen-Bin; PALIWAL, Sumit; WU, Hao et al. Identification of a functional enhancer variant within the chronic pancreatitis-associated SPINK1 c.101A>G (p.Asn34Ser)-containing haplotype: Data from a Comprehensive Analysis of PRSS1, SPINK1, CTSC and CFTR Genes in 253 Young French Patients. Online. *Human Mutation*. 2017, roč. 38, č. 8, s. 1014-1024. ISSN 1059-7794. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/humu.23269>. [cit. 2024-12-14].
- [72] HAVRANEK, Ondrej; KLEIBLOVA, Petra; HOJNY, Jan; LHOTA, Filip; SOUCEK, Pavel et al. Association of Germline CHEK2 Gene Variants with Risk and Prognosis of Non-Hodgkin Lymphoma. Online. *PloS One*. 2015, roč. 10, č. 10. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26506619/>. [cit. 2024-12-14].
- [73] APOSTOLOU, Paraskevi; FOSTIRA, Florentia; MOLLAKI, Vasiliki; DELIMITSOU, Angeliki; VLASSI, Metaxia et al. Characterization and prevalence of two novel CHEK2 large deletions in Greek breast cancer patients. Online. *Journal of Human Genetics*. 2018, roč. 63, č. 8, s. 877-886. ISSN 1434-5161. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0466-3>. [cit. 2024-12-14].

- [74] STOLAROVA, Lenka; KLEIBLOVA, Petra; JANATOVA, Marketa; SOUKUPOVA, Jana; ZEMANKOVA, Petra et al. CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate. Online. *Cells*. 2020, roč. 9, č. 12, s. 877-886. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells9122675> . [cit. 2024-12-14].
- [75] PALLES, Claire; CAZIER, Jean-Baptiste; HOWARTH, Kimberley M; DOMINGO, Enric; JONES, Angela M et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas: Stalemate Rather than Checkmate. Online. *Nature Genetics*. 2013, roč. 45, č. 2, s. 136-144. ISSN 1061-4036. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ng.2503>. [cit. 2024-12-14].
- [76] VALLE, Laura; HERNÁNDEZ-ILLÁN, Eva; BELLIDO, Fernando; AIZA, Gemma; CASTILLEJO, Adela et al. New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis: Stalemate Rather than Checkmate. Online. *Human Molecular Genetics*. 2014, roč. 23, č. 13, s. 3506-3512. ISSN 1460-2083. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu058>. [cit. 2024-12-14].
- [77] HÜHNS, Maja; NÜRNBERG, Sylvia; KANDASHWAMY, Krishna Kumar; MALETZKI, Claudia; BAUER, Peter et al. High mutational burden in colorectal carcinomas with monoallelic POLE mutations: absence of allelic loss and gene promoter methylation. Online. *Modern Pathology*. 2020, roč. 33, č. 6, s. 1220-1231. ISSN 08933952. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0430-6>. [cit. 2024-12-14].
- [78] GARMEZY, Benjamin; GHEEYA, Jinesh; LIN, Heather Y.; HUANG, Yuefan; KIM, Taebeom et al. Clinical and Molecular Characterization of POLE Mutations as Predictive Biomarkers of Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced Cancers: absence of allelic loss and gene promoter methylation. Online. *JCO Precision Oncology*. 2022, roč. 33, č. 6, s. 1220-1231. ISSN 2473-4284. Dostupné z: <https://doi.org/10.1200/PO.21.00267>. [cit. 2024-12-14].
- [79] SUSPITSIN, Evgeny N.; SIBGATULLINA, Farida I.; LYAZINA, Lydia V.; IMYANITOV, Evgeny N.; KIM, Taebeom et al. First Two Cases of Bloom Syndrome in Russia: Lack of Skin Manifestations in a BLM c.1642C>T (p.Q548X) Homozygote as a Likely Cause of Underdiagnosis. Online. *Molecular Syndromology*. 2017, roč. 8, č. 2, s. 103-106. ISSN 1661-8769. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000454820>. [cit. 2024-12-14].
- [80] TRIZULJAK, Jakub; PETRUCHOVÁ, Terezie; BLAHÁKOVÁ, Ivona; VRZALOVÁ, Zuzana; HOŘÍNOVÁ, Věra et al. Diagnosis of Bloom Syndrome in a Patient with Short Stature, Recurrence of Malignant Lymphoma, and Consanguineous Origin: Lack of Skin Manifestations in a BLM c.1642C>T (p.Q548X) Homozygote as a Likely Cause of Underdiagnosis. Online. *Molecular Syndromology*. 2020, roč. 11, č. 2, s. 73-82. ISSN 1661-8769. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000507006>. [cit. 2024-12-14].
- [81] SOKOLENKO, Anna P.; IYEVLEVA, Aglaya G.; PREOBRAZHENSKAYA, Elena V.; MITIUSHKINA, Nathalia V.; ABYSHEVA, Svetlana N. et al. High prevalence and breast cancer predisposing role of the BLM c.1642 C>T (Q548X) mutation in Russia: Lack of Skin Manifestations in a BLM c.1642C>T (p.Q548X) Homozygote as a Likely Cause of Underdiagnosis. Online. *International Journal of Cancer*. 2012, roč. 130, č. 12, s. 2867-2873. ISSN 0020-7136. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ijc.26342>. [cit. 2024-12-14].
- [82] PROKOFYEVA, Darya; BOGDANOVA, Natalia; DUBROWINSKAJA, Natalia; BERMISHEVA, Marina; TAKHIROVA, Zalina et al. Nonsense mutation p.Q548X in BLM, the gene mutated in Bloom's syndrome, is associated with breast cancer in Slavic populations: Lack of Skin Manifestations in a BLM c.1642C>T (p.Q548X) Homozygote as a Likely Cause of Underdiagnosis. Online. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2013, roč. 137, č. 2, s. 533-539. ISSN 0167-6806. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2357-1>. [cit. 2024-12-14].
- [83] LHOTA, F.; ZEMANKOVA, P.; KLEIBLOVA, P.; SOUKUPOVA, J.; VOCKA, M. et al. Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in BRCA1 / BRCA2 / PALB2 -negatively tested breast cancer

patients: Lack of Skin Manifestations in a BLM c.1642C>T (p.Q548X) Homozygote as a Likely Cause of Underdiagnosis. Online. *Clinical Genetics*. 2016, roč. 90, č. 4, s. 324-333. ISSN 0009-9163. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cge.12748>. [cit. 2024-12-14].

[84] KOUDOVÁ, Monika a PUCHMAJEROVÁ, Alena. Risks of Solid Tumors in Heterozygous Carriers of Recessive Syndromes. Online. *Klinická onkologie*. 2019, roč. 32, č. 2, s. 14-23. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2019S14>. [cit. 2024-12-14].

[85] SAXENA, Neetu; MAIO, Nunziata; CROOKS, Daniel R.; RICKETTS, Christopher J.; YANG, Youfeng et al. SDHB-Deficient Cancers: The Role of Mutations That Impair Iron Sulfur Cluster Delivery. Online. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015, roč. 108, č. 1, s. 14-23. ISSN 0027-8874. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jnci/djv287>. [cit. 2024-12-14].

[86] NIEMEIJER, Nicolasine D; RIJKEN, Johannes A; EIJKELINKAMP, Karin; VAN DER HORST-SCHRIJVERS, Anouk N A; KERSTENS, Michiel N et al. The phenotype of SDHB germline mutation carriers: a nationwide study. Online. *European Journal of Endocrinology*. 2017, roč. 177, č. 2, s. 115-125. ISSN 0804-4643. Dostupné z: <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0074>. [cit. 2024-12-14].

[87] MOJTOVÁ, Emília; HANAJÍKOVÁ, Jana; HAMIDOVÁ, Olívia; BOGNÁR, Gabriel; DYTERT, Daniel et al. An incidental finding of pheochromocytoma in a 33-year-old patient with Lynch syndrome: a nationwide study. Online. *Vnitřní lékařství*. 2020, roč. 66, č. 5, s. e38-e42. ISSN 0042773X. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/vnl.2020.096>. [cit. 2024-12-14].

7. Seznam obrázků

Obrázek 1: Filadelfský chromozom (Ph chromozom) je abnormální chromozom vznikající, když se části chromozomů 9 a 22 odlomí a vymění si místa. Gen ABL z chromozomu 9 se spojí s genem BCR na chromozomu 22, čímž vznikne fúzní gen BCR::ABL. Změněný chromozom 22, který nese tento fúzní gen, je pak označován jako Filadelfský chromozom. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/philadelphia-chromosome>

Obrázek 2: Základní klasifikace nádorů. https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html

Obrázek 3: Metastáze a jak se šíří tělem. <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>

Obrázek 4: Podíl nádorové mortality (v rozvinutých zemích) přisuzovaný vlivu specifických faktorů nebo skupině faktorů. https://issuu.com/knizni_klub/docs/9788027112937

Obrázek 5: Schéma znázorňující procesy vedoucí ke vzniku maligního nádoru. <https://eshop.maxdorf.cz/user/documents/upload/data/dl/Obecna%20onkologie.pdf>

Obrázek 6: Autozomálně dominantní dědičnost: Dědičné vzory vázané na chromozom X: Graf vzorů dědičnosti X-vázané dominantní poruchy se liší v závislosti na tom, zda (a) je postižen otec, nebo (b) matka. https://assets.openstax.org/oscms-prodcms/media/documents/Anatomy_and_Physiology_2e_-_WEB_c9nD9QL.pdf

Obrázek 7: Autozomálně recesivní dědičnost. Dědičný vzor autozomálně recesivní poruchy u dvou rodičů nositelů odráží pravděpodobnost 3:1 pro projev u potomků. https://assets.openstax.org/oscms-prodcms/media/documents/Anatomy_and_Physiology_2e_-_WEB_c9nD9QL.pdf

Obrázek 8: Schématické znázornění principu polymerázové řetězové reakce. <https://sci-hub.se/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23399825/>

Obrázek 9: Postup sekvenování nové generace (NGS). *Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi*. ISBN 978-80-271-1293-7

Obrázek 10: Ilustrační obrázek Sangerova sekvenování. MG laboratoř CLG

Obrázek 11: Ilustrační obrázek MLPA, konkrétně pro gen BRCA1 (kit SALSA MLPA BRCA1 P002). MG laboratoř CLG

Obrázek 12: *CHEK2* c.470T>C/p.Ile157Thr (HGVS nomenklatura), HET, forward sekvence. MG laboratoř CLG

Obrázek 13: *CHEK2* c.1100del/p.Thr367MetfsTer15 (HGVS nomenklatura), HET, revers sekvence. MG laboratoř CLG

Obrázek 14: *MUTYH* c.1187G>A/p.Gly396Asp (HGVS nomenklatura), HET, revers sekvence. MG laboratoř CLG

Obrázek 15: *SPINK1* c.101A>G/p.Asn34Ser (HGVS nomenklatura), HET, revers sekvence. MG laboratoř CLG

Obrázek 16: *MSH6* c.752_753insC/p.Ser252IlefsTer4 (HGVS nomenklatura), HET, forward sekvence. MG laboratoř CLG

Obrázek 17: Delece exonů 9, 10 v genu *CHEK2*, HET (SALSA MLPA *BRCA2/CHEK2* P045). MG laboratoř CLG

Obrázek 18: Delece exonů 9, 10 v genu *CHEK2*, HET (NGS CNV analýza). MG laboratoř CLG

Obrázek 19: Delece exonů 1 až 15 v genu *CHEK2*, HET (SALSA MLPA *CHEK2* P190). MG laboratoř CLG

Obrázek 20: Delece exonů 1 až 15 v genu *CHEK2*, HET (NGS CNV analýza). MG laboratoř CLG

Obrázek 21: *POLE* c.1503_1504del/p.Cys501Ter (HGVS nomenklatura), HET. MG laboratoř CLG

Obrázek 22: *POLE* c.4654_4655del/p.Thr1552LeufsTer8 (HGVS nomenklatura), HET. MG laboratoř CLG

Obrázek 23: *BLM* c.1642C>T/p.Gln548Ter (HGVS nomenklatura), HET. MG laboratoř CLG

Obrázek 24: *POLE* c.51dup/p.Glu18ArgfsTer6 (HGVS nomenklatura), HET, forward sekvence. MG laboratoř CLG

Obrázek 26: *SDHB* c.725G>A/p.Arg242His (HGVS nomenklatura), HET, reverse sekvence. MG laboratoř CLG

8. Seznam tabulek a grafů

Tabulka 1: Přehled nádorových onemocnění. <https://www.cancer.gov/types/by-body-location>

Tabulka 2: Seznam analyzovaných genů, jejich lokalizace, referenční sekvence a OMIM kód. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Tabulka 3: Klasifikace variant dle American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). <https://www.acgs.uk.com/media/12533/uk-practice-guidelines-for-variant-classification-v12-2024.pdf>
<https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/527/6268.pdf>

Tabulka 4: Výběr analyzovaných genů, jejich asociace k nádorovému onemocnění a klasifikace reportovaných variant.

Tabulka 6: Počty nalezených variant třídy 4 a 5 v testovaných genech.

Graf 1: Počet detekovaných variant v analyzovaných genech

Graf 2: Procentuální zastoupení variant třídy 3, 4 a 5 v testovaných genech