

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Ing. Petra Slavíková

Re-analýza pacientů se suspektním FAP onemocněním
(familiární adenomatózní polypóza)

Re-analysis of suspected patients with FAP disease
(familial adenomatous polyposis)

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Markéta Urbanová, PhD.

Praha, 2021

Charles University
Faculty of Science

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.8.2021

.....

Poděkování

Práce byla vypracována v laboratoři molekulární genetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze.

Na prvním místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Markétě Urbanové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, podporu a veškerý čas, které mi v průběhu zpracování práce věnovala.

Velký dík patří Mgr. Petře Zemánkové, Ph.D. za zpracování bioinformatických dat. Děkuji také ostatním členům výzkumné skupiny prof. MUDr. Zdeňka Kleibla, Ph.D. z Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK, kteří sestavili NGS panel CZEKANCA a zavedli jej zavedení do rutinní praxe.

Za rady a pomoc při řešení problémů děkuji Ing. Jitce Štekrové, RNDr. Marianně Borecké, Ph.D. a Ing. Bohumile Janošíkové, Ph.D. Děkuji také Markétě Děkanovské za provedení analýzy na kapilárních genetických analyzátoch, ale také za ochotu a pomoc při práci v laboratoři, stejně jako Monice Škodové, Martině Řezníčkové a Marcele Hlinovské.

V neposlední řadě děkuji rodině a přátelům za jejich podporu po celou dobu mého studia.

Práce vznikla za finanční podpory programem Progres Q28/LF1 UK.

Abstrakt

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je dědičné autozomálně dominantní onemocnění způsobené zárodečnými mutacemi v tumor supresorovém genu *APC*. Projevuje se tvorbou stovek až tisíců kolorektálních adenomatózních polypů s vysokým rizikem malignizace v adenokarcinom tlustého střeva a/nebo konečníku.

Cílem této práce je re-analyzovat soubor FAP suspektních probandů z let 1993–2004, u kterých se diagnózu v té době běžně používanými metodami molekulární diagnostiky nepodařilo potvrdit.

Pomocí sekvenování nové generace (NGS) bylo na platformách Miseq a NextSeq (Illumina®) za využití NGS panelu CZEKANCA verze 1.2 (Czech Cancer Panel for Clinical Application) osekvenováno celkem 78 vzorků DNA izolované z periferní krve probandů. Panel umožňuje vyšetřit exonové a exon-intronové oblasti 226 genů souvisejících s nádorovou predispozicí, přičemž nově zahrnuje také diagnosticky významnou oblast promotoru 1B genu *APC*.

V rámci re-analýzy byla patogenní varianta v genu *APC* nalezena u 18 % pacientů, 11 % pacientů pak nese patogenní variantu v některém z dalších genů klinicky souvisejících s tvorbou kolorektálních polypů. Dalších 13 % probandů patří mezi nositele varianty s nejasným klinickým významem.

NGS panel CZEKANCA v.1.2 umožnil konfirmovat či přehodnotit suspektní diagnózu 22 probandů. Minimálně 5 variant zachycených v klinicky významných genech představuje nové, dosud nepopsané a velmi pravděpodobně patogenní varianty.

Klíčová slova: familiární adenomatózní polypóza, gen *APC*, NGS, karcinom tlustého střeva a konečníku

Abstract

Familial adenomatous polyposis (FAP) is a condition caused by germline mutations in tumor suppressor gene *APC*, inherited in autosomal dominant manner. Patients with FAP develop hundreds to thousands of adenomatous colorectal polyps with extremely high risk of malignant reversal into adenocarcinoma of colon and/or rectum.

The aim of this thesis is to re-analyze a cohort of highly suspected FAP probands from years 1993–2004 whose diagnosis previously failed to be confirmed by at that time commonly used methods of molecular diagnostics.

Next generation sequencing on MiSeq and NextSeq platforms (Illumina®) was performed on 78 samples of probands' DNA, isolated from peripheral blood, using gene panel CZECANCA version 1.2 (Czech Cancer Panel for Clinical Application). The panel enables sequencing of exons and exon-intron junctions of 226 genes linked to hereditary cancer predispositions, newly also including the diagnostically important promoter 1B region of *APC*.

Pathogenic variant in the *APC* gene was detected in 18 % of re-analyzed probands, 11 % of probands carry pathogenic variants in other genes associated with colorectal polyps. Additional 13 % of probands are carriers of a variants of unknown clinical significance.

NGS gene panel CZECANCA enabled diagnosis confirmation or re-evaluation of 22 FAP suspected probands. At least 5 detected variants in clinically significant genes represent new, not yet published and very probably pathogenic variants.

Key words: familial adenomatous polyposis, *APC* gene, NGS, colon and rectal cancer

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce	3
3. Přehled literatury	4
3.1 Kolorektální polypy	4
3.2 Familiární adenomatózní polypóza	5
3.2.1 Klinické projevy	6
3.2.2 Diagnostika.....	7
3.2.3 Dispenzarizace	8
3.2.4 Management.....	8
3.2.5 Další formy familiární adenomatózní polypózy	10
3.3 Molekulární biologie familiární adenomatózní polypózy	11
3.3.1 Gen <i>APC</i>	11
3.3.2 Genový podklad FAP onemocnění.....	15
3.3.3 Protein APC a jeho funkce	20
4. Materiály a metody	25
4.1 Vzorky.....	25
4.2 Chemikálie	26
4.3 Software	29
4.4 Metody	29
4.4.1 Příprava NGS knihovny	29
4.4.2 Sekvenace.....	41
4.4.3 Analýza sekvenačních dat	41
4.4.4 Konfirmace.....	44
5. Výsledky	50
5.1 Konfirmace	57
6. Diskuze.....	63
6.1 Patogenní varianty v genu <i>APC</i>	66
6.1.1 Genotyp-fenotypová korelace	68
6.1.2 Delece promotoru 1B	69
6.1.3 Duplikace exonu 15.....	70
6.1.4 Nové patogenní varianty v genu <i>APC</i>	71
6.1.5 Mozaicismus u FAP pacientů.....	72
6.2 Patogenní varianty v ostatních genech souvisejících s tvorbou kolorektálních polypů	73
6.1.1 Nové patogenní varianty	76
6.3 Varianty s nejasným klinickým významem	78
6.4 Probandi s negativním výsledkem	79
6.5 Varianty v genu <i>DPYD</i>	80
6.6 Další postup	81

7. Souhrn.....	83
Seznam použité literatury	85
Seznam obrázků.....	94
Seznam tabulek.....	95
Seznam grafů.....	96
Seznam příloh.....	97
Přílohy	I

Seznam zkratek

5-FU	5-fluorouracil
ACMG	American College of Genetics and Genomics
AD	autozomálně dominantní
AFAP	atenuovaná familiární adenomatózní polypóza
APC	adenomatous polyposis coli
APC2/APCL	adenomatous polyposis coli protein 2
APE1	apurinní/apyrimidinní endonukleáza 1
AR	autozomálně recesivní
BER	excizní oprava bazí (base excision repair)
BMPR1A	kostní morfogenetický proteinový receptor, typ IA (bone morphogenetic protein receptor, type IA)
CC	karcinom tlustého střeva
<i>CHEK2</i>	gen pro checkpoint kinázu 2 (CHK2)
CNS	centrální nervová soustava
CNV	variabilita počtu kopií (copy number variation)
CZECANCA	Czech Cancer Panel for Clinical Application
DGGE	elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (denaturing gradient gel electrophoresis)
dHPLC	denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie (denaturing high performance liquid chromatography)
DLG	lidský homolog proteinu discs large
DPD	dihydropyrimidin dehydrogenáza
<i>DPYD</i>	gen pro dihydropyrimidin dehydrogenázu
DT	desmoidní tumor
EB1	koncový protein 1 (end binding protein 1)
EXO1	exonukleáza 1
FAP	familiární adenomatózní polypóza
FEN1	flap endonukleáza 1 (flap structure-specific endonuclease 1)
GAPPS	syndrom adenokarcinomu žaludku a mnohočetné polypózy žaludku (gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach)
GIT	gastrointestinální trakt
GUS	gen s nejasným klinickým významem (gene of uncertain significance)
H3BNH8	paralog proteinu APC
HGMD®	The Human Gene Mutation Database
HRM	vysokorozlišovací analýza křivek tání (high resolution melting analysis)
CHRPE	kongenitální hypertrofie retinálního pigmentového epitelu (congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium)
IGV	Integrative Genomics Viewer
LOH	ztráta heterozygoty (loss of heterozygosity)
LM PCR	ligací zprostředkovaná polymerázová řetězová reakce (ligation-mediated polymerase chain reaction)
LR PCR	long-range PCR
MAP	<i>MUTYH</i> -asociovaná adenomatózní polypóza
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MMR	oprava chybného párování bazí (mismatch repair)
MSH2	MutS homolog 2

MSH6	MutS homolog 6
MUTYH	MutY homolog
NGS	sekvenování nové generace (next generation sequencing)
NMD	degradace mRNA indukovaná předčasně zařazeným terminačním kodonem (nonsense-mediated mRNA decay)
NSD1	jaderný receptor pro protein 1 obsahující SET doménu (nuclear receptor binding SET domain-containing protein 1)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PMS2	protein postmeiotické segregace 2 (postmeiotic segregation increased homolog 2)
POLD1	DNA polymeráza delta 1, katalytická podjednotka
POLE	DNA polymeráza epsilon, katalytická podjednotka
PTEN	fosfatázový a tenzinový homolog (phosphatase and tensin homolog)
PTT	protein truncation test
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
RC	karcinom konečníku
SMAD4	mothers against decapentaplegic (SMAD) homolog 4
SNV	jednonukleotidová varianta (single nucleotide variant)
STK11	serin/threonin kináza 11
TP53	tumor protein p53
TCF/LEF	T-buněčný faktor (T-cell Factor)/lymfoidní zesilovací faktor (lymphoid enhancing factor)
VUS	varianta s nejasným klinickým významem (variant of uncertain significance)

1. Úvod

Karcinom tlustého střeva (CC z angl. colon cancer) a/nebo konečníku (RC z angl. rectal cancer) představuje po rakovině prsu a plic třetí nejčastější nádorové onemocnění na světě. Z hlediska mortality se jedná o druhý nejsmrtelnější druh rakoviny, hned po rakovině plic (International Agency for Research on Cancer 2020).

Podle příčiny lze rozlišit 3 základní formy CC/RC. Převládající formou tohoto onemocnění je (1) sporadicky se vyskytující CC/RC, který vykazuje nejvyšší možnost prevence vzniku. Až 30 % případů tvoří (2) CC/RC s familiárním výskytem. U této formy onemocněním trpí více členů rodiny, nicméně jeho genetická příčina není známa. Dalších asi 5 % případů způsobují vysoce penetrantní mutace v genech spojených (3) s dědičnými syndromy zvýšené predispozice k CC/RC. Zdaleka nejčastějším z těchto syndromů je přitom Lynchův syndrom, který se na CC/RC podílí až ze 4 %. Familiární adenomatózní polypóza (FAP), na kterou se tato diplomová práce primárně zaměřuje, pak jako druhý nejčastější syndrom představuje necelé 1 % všech případů CC/RC (Patel a Ahnen 2012). Z důvodu vysoké penetrance má molekulární diagnostika takových dědičných syndromů kromě samotných pacientů velký význam i pro jejich příbuzné, u kterých umožňuje včasnou dispenzarizaci.

FAP je autozomálně dominantní onemocnění způsobené zárodečnými mutacemi v tumor supresorovém genu *APC*. Patří do skupiny dědičných kolorektálních polypóz, při kterých se na sliznici tlustého střeva a konečníku pacientů tvoří benigní výrůstky, tzv. polypy, lišící se svým histologickým původem. Hlavní nebezpečí kolorektálních polypů spočívá především v potenciálu malignizovat a rozvinout se až v CC/RC, přičemž toto riziko se napříč jednotlivými syndromy liší. V případě FAP onemocnění je riziko malignizace vznikajících adenomatózních polypů extrémně vysoké a bez včasného profylaktického zákroku tak dochází k rozvoji CC/RC téměř ve 100 % případů. Stejně jako ostatní dědičné syndromy spojené s CC/RC je FAP onemocnění spjaté také se zvýšenou predispozicí pro řadu dalších nádorových onemocnění (Half et al. 2009, Jasperson et al. 2017).

Molekulární diagnostika FAP onemocnění spočívala zpočátku především v metodách založených na elektroforéze, které v porovnání se současnými metodami vykazují omezený diagnostický výtěžek. Vědecký a technický pokrok postupně umožňoval využít k analýze genu *APC* modernější metody. Zlomový okamžik pro molekulární diagnostiku (nejen FAP) znamenalo rutinní zavedení masivního paralelního sekvenování, které kromě

genu *APC* umožňuje v rámci jedné analýzy současně vyšetřit i ostatní geny se vztahem k dědičným syndromům zvýšené predispozice k CC/RC. V rámci této práce byla pomocí cíleného sekvenování nové generace provedena re-analýza FAP suspektních probandů, kteří v letech 1993–2004 prošli molekulární diagnostikou a v dalších letech (do roku 2014) také několika fázemi re-analýzy, nicméně suspektní diagnózu se u nich tehdejšími metodami nepodařilo potvrdit. V případě genu *APC* se tato fáze re-analýzy nově zaměřuje také na diagnosticky významnou oblast promotoru 1B.

2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce je re-analyzovat soubor zhruba 100 probandů se suspektní diagnózou FAP onemocnění.

- Pomocí moderní diagnostické metody masivního paralelního sekvenování panelu genů CZEKANCA v.1.2 se pokusit detekovat kauzální variantu v genu *APC* (včetně jeho promotorů), případně v jiných genech souvisejících s tvorbou střevních či rektálních polypů.
- V případě záchytu původně nedetekované varianty se pokusit vysvětlit z jakého důvodu nebyla primárně kauzální mutace dříve dostupnými metodami odhalena.
- V případě opětovné negativity se pokusit přijít s návrhy na zlepšení současné diagnostické metody a přispět tak k vylepšení nadcházející verze CZEKANCA panelu či zavedení jiné paralelní molekulárně diagnostické metody, která by zlepšila záchyt kauzálních variant u suspektních FAP pacientů v rutinním provozu laboratoře.

3. Přehled literatury

3.1 Kolorektální polypy

Jako kolorektální polypy se označují výrůstky na sliznici tlustého střeva a konečníku (jakožto části tlustého střeva) různého histologického původu. V případě dědičných syndromů kolorektálních polypóz se na sliznici pacientů tvoří zejména adenomatózní, hamartomatózní a serátní polypy, případně jejich různé kombinace (tab. 3.1). Na základě rizika malignizace lze kolorektální polypy zjednodušeně rozdělit na *neoplastické*, které vykazují zvýšený maligní potenciál (adenomatózní a serátní polypy, dále některé vzácné maligní léze – např. karcinoidy, lymfomy), a *non-neoplastické*, které obvykle nemalignizují (hamartomatózní a hyperplastické polypy, různé submukózní léze – např. lipomy, angiomy, lymfoidy apod.) (Steinhagen a Guillem 2013).

Tab. 3.1: Přehled dědičných kolorektálních polypózních syndromů

Syndrom	Dědičnost	Postižený gen
Adenomatózní polypy:		
• Familiární adenomatózní polypóza (+ její varianty)	AD	<i>APC</i>
• <i>MUTYH</i> -asociovaná polypóza	AR	<i>MUTYH</i>
• Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (Lynchův syndrom)	AD	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM</i>
• Polypóza spojená s opravnou funkcí polymerázy	AD	<i>POLE, POLD1</i>
• <i>NTHL1</i> -asociovaná polypóza	AR	<i>NTHL1</i>
• <i>MSH3</i> -asociovaná polypóza	AR	<i>MSH3</i>
• Syndrom konstitučního deficitu systému oprav chybného párování bazí	AR	<i>MSH2, MSH6, PMS2</i>
Hamartomatózní polypy:		
• Peutzův-Jeghersův syndrom	AD	<i>STK11</i>
• <i>PTEN</i> hamartomatózní tumorový syndrom (syndrom Cowdenové + Bannayanův-Rileyho-Ravulcabův syndrom)	AD	<i>PTEN</i>
• Syndrom juvenilní polypózy	AD	<i>SMAD4, BMPRIA</i>
Serátní polypy:		
• Syndrom serátní polypózy	neznámá	<i>RNF43</i> + další geny?
Smišené polypy:		
• Hereditární smíšený polypózní syndrom	AD	<i>BMPRIA, SCG5/GREMI?</i>

Adenomatózní polypy (adenomy) představují nejčastější typ kolorektálních polypů. Jedná se o benigní nádory žláзовého epitelu, které se mohou vyskytovat sporadicky, nebo jako projev dědičného onemocnění. Většinou mají hladký povrch a jejich velikost se pohybuje v řádu milimetrů až centimetrů. V průběhu času mohou růst, stávat se postupně dysplastickými a vyvinout se až v adenokarcinom (Steinhagen a Guillem 2013). Riziko malignizace adenomů se v závislosti na jejich histologické variantě pohybuje v rozmezí od <5 % po 40 % (Amersi et al. 2005).

Jako *hamartomatózní polypy* (hamartomy) jsou označovány výrůstky normální tkáně nacházející se v nesprávné lokaci. Jejich potenciál maligní transformace není zcela známý, obecně je ale považován za velmi nízký. Nebezpečí však mohou hamartomy pro pacienty představovat už jen z důvodu možných komplikací jako jsou obstrukce střev nebo gastrointestinální krvácení. V případě tzv. hamartomatózních polypózních syndromů se zvýšené riziko malignizace uvádí především v souvislosti s tvorbou doprovodných adenomů (Jelsig et al. 2014).

Poměrně nově ustanovený typ polypů představují *serátní polypy* (užívá se také označení pilovité polypy). V některých případech jsou stále považovány za podskupinu hyperplastických polypů. Název těchto polypů odráží jejich pilovitý tvar (Steinhagen a Guillem 2013, Ijspeert et al. 2017). Podobně jako v případě adenomů se serátní polypy na základě histologického původu dělí na podskupiny s různým rizikem malignizace, které se pohybuje v rozmezí 0 až 5 % (Haumaier et al. 2017).

3.2 Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je dědičné autozomálně dominantní onemocnění způsobené zárodečnými mutacemi v tumor supresorovém genu *APC* (adenomatous polyposis coli). Projevuje se tvorbou stovek až tisíců adenomatózních polypů v kolorektální oblasti, přičemž penetrance dosahuje téměř 100 %. Prevalence onemocnění se v Evropě pohybuje v rozmezí 1:11 300 až 1:37 600 (Half et al. 2009).

Adenomy se začínají formovat v nízkém věku, obvykle v druhé dekádě života (průměrně v 15 letech). U pacientů do věku 35 let jsou polypy přítomny až v 95 % případů (Jasperson et al. 2017). Nebezpečí onemocnění spočívá především ve vysokém riziku přeměny v nádory zhoubné (malignizace). Bez včasné diagnostiky a lékařského zákroku se rozvíjí karcinom tlustého střeva (CC) a/nebo konečníku, (RC) a to přibližně do 10 let od výskytu polypů (Bogaert a Prenen 2014). Průměrný věk nálezu adenokarcinomů v oblasti kolorekta je u pacientů postižených FAP přibližně 39 let (Fornasarig et al. 2018).

Kromě klasické formy FAP existuje také tzv. atenuovaná familiární adenomatózní polypóza (AFAP). Jedná se o mírnější formu onemocnění, při které se adenomy začínají tvořit v pozdějším věku a menším počtu. Mezi další formy FAP se dále řadí i Gardnerův syndrom, Turcotův syndrom a *MUTYH*-asociovaná polypóza (MAP) (Half et al. 2009).

3.2.1 Klinické projevy

Zpočátku se FAP onemocnění projevuje nespecificky – průjmy nebo naopak zácpou, bolestmi břicha, úbytkem tělesné hmotnosti, či hmatatelnými masami v břiše. U klasické formy FAP se polypy začínají tvořit nejprve v distální části tlustého střeva a postupně se rozrůstají po celé jeho délce (obr. 3.1), postihují i oblast konečníku. V okamžiku, kdy narostou do určité velikosti, způsobují krvácení z konečníku, které může vést až k anémii (Half et al. 2009). Kromě tlustého střeva se adenomy tvoří také na sliznici dvanáctníku, žaludečního fundu (horní část žaludku nad otvorem jícnu) a v periampulární oblasti (oblast okolo Vaterovy papily – sestupná část dvanáctníku, žlučovody, vývod slinivky břišní) (Bogaert a Prenen 2014).

Obr. 3.1: Adenomatózní polypy tlustého střeva
(zdroj: <https://www.humpath.com/spip.php?article1815>, cit. 8.4.2020)



Pro onemocnění je dále charakteristická zvýšená predispozice pro tvorbu některých benigních nádorů. Nejčastěji se jedná se o desmoidy (nádory vazivové tkáně), různé kožní léze, kongenitální hypertrofii retinálního pigmentového epitelu (CHRPE z angl. congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium) – vrozený nádor pigmentového epitelu oční sítnice, nádory štítné žlázy, jater, slinivky břišní či žlučovodů. V případě Turcotova syndromu vznikají také různé kostní a zubní nádory či anomálie. Pacienti s Gardnerovým syndromem navíc trpí tvorbou nádorů v centrální nervové soustavě (zejména medulloblastomy a glioblastomy) (Jaspersen et al. 2017).

3.2.2 Diagnostika

Možnost, že by pacient mohl trpět některou z forem FAP onemocnění, by podle americké organizace National Comprehensive Cancer Network měla být zvažena v těchto případech:

- přítomnost alespoň 10 kolorektálních adenomatózních polypů;
- přítomnost extrakolonických příznaků typických pro různé formy FAP (hepatoblastomy, CHRPE, desmoidní tumory, nádory štítné žlázy atd.);
- rodinná historie kolorektálních adenomatózních polypů a/nebo jiných extrakolonických příznaků typických pro FAP onemocnění (Gupta et al. 2019).

U většiny pacientů pak první krok diagnostiky FAP spočívá v kolonoskopickém vyšetření. Na základě nálezu je onemocnění možné diagnostikovat následujícím způsobem:

1. *klasická FAP*: alespoň 100 difuzně se vyskytujících kolorektálních adenomatózních polypů, případně i méně než 100 polypů u pacienta s pozitivní rodinnou anamnézou;
2. *atenuovaná FAP*: 10 až 100 kolorektálních adenomatózních polypů, případně více než 100 polypů u pacientů ve věku nad 40 let, a/nebo pozitivní rodinná anamnéza (Jasperson et al. 2017).

V případě pozitivní rodinné anamnézy platí, že z rodokmenu sestaveného klinickým genetikem musí být patrná autozomálně dominantní dědičnost (Plevová et al. 2009).

Molekulární diagnostika

Zásadní krok diagnostiky FAP onemocnění představuje molekulární diagnostika, která umožňuje rozlišit FAP od jiných typů polypóz nebo sporadicky se vyskytujících polypů. V rámci genetického testování lze zaujmout 2 hlavní přístupy: (1) zaměřit se pouze na gen *APC* (případně také gen *MUTYH*), (2) využít multigenový panel (Jasperson et al. 2017).

Zatímco první varianta se využívala především v minulosti, s modernizací přístrojů a nástupem nových metod nyní převažuje druhý přístup. Výhodou multigenového panelu je možnost zachytit nejenom mutace v genu *APC*, ale také v ostatních genech souvisejících s jinými formami dědičně podmíněných polypóz tlustého střeva a konečníku (viz tab. 3.1). Převážná většina laboratoří v současnosti využívá metod sekvenování nové generace (NGS z angl. next generation sequencing). Pro zjištění delecí nebo naopak amplifikací celých exonů, případně jiných velkých genových přestaveb

se pak často využívají také metody komparativní genomové hybridizace na čípech nebo multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) (Hegde et al. 2014).

3.2.3 Dispenzarizace

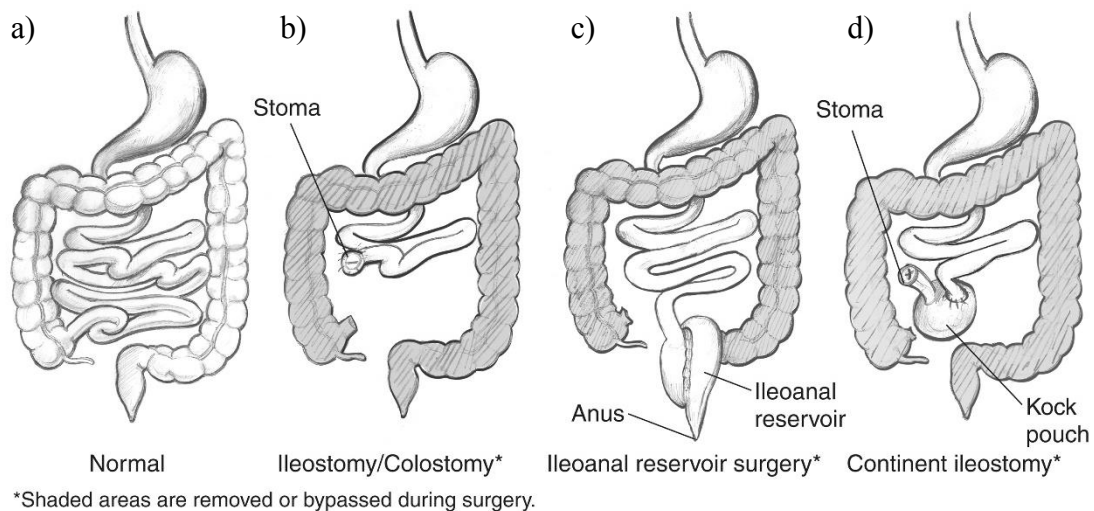
Dispenzarizace pacienta s FAP onemocněním spočívá v pravidelných kolonoskopických vyšetřeních. Ta se provádí jednou za půl roku, a to do doby, než onemocnění dosáhne stádia, kdy je u pacientů doporučena kolektomie nebo jiná forma profylaxe. Kromě samotného pacienta by pravidelná vyšetření měli zároveň podstoupit všichni jeho příbuzní prvního stupně (děti, sourozenci, rodiče). Především u mladších pacientů vyšetření umožňuje zachytit případné onemocnění v raném stádiu. Děti od věku cca 10–12 let namísto kolonoskopií podstupují pravidelná sigmoideoskopická vyšetření. Při pozitivním nálezu se pak přechází na klasickou kolonoskopii.

U pacientů se dále provádí pravidelná vyšetření žaludku a dvanáctníku. Doporučována bývají i ultrazvuková vyšetření jater, oční sítnice, štítné žlázy, gynekologická a neurologická vyšetření atd. Sledování stavu však ve velké míře závisí pacientově genotypu, fenotypu, věku, rodinné anamnéze atd. (Plevová et al. 2009, Trna et al. 2010).

3.2.4 Management

Dosud nejlepším možným způsobem, jak předejít vzniku či dalšímu rozšiřování CC/RC, je profylaktická operace – *kolektomie* (chirurgické odstranění tlustého střeva) nebo *proktokolektomie* (odstranění tlustého střeva a konečníku), která je následována ileostomií (vytvořením umělého vývodu tenkého střeva v oblasti ilea) či zavedením ileálního nebo ileoanálního pouče (vak vytvořený z části tenkého střeva) (obr. 3.2). V případě kolektomie musí pacienti nadále podstupovat pravidelná rektoskopická vyšetření z důvodu vysokého rizika rozvoje RC – u většiny pacientů s klasickou formou FAP je pozdější odstranění konečníku téměř nevyhnutelné. Kolektomie proto bývá preferována spíše u pacientů s atenuovanou formou FAP, u kterých se polypy v oblasti konečníku vyskytují v menší míře (Plevová et al. 2009, Aihara et al. 2014).

Obr. 3.2: Různé formy proktokolektomie
(zdroj: <https://www.niddk.nih.gov/news/media-library/8261>, cit. 19.8.2020)



a) Gastrointestinální trakt zdravého pacienta, **b)** Proktokolektomie s ileostomií, **c)** Restorativní proktokolektomie (ileoanální pouch), **d)** Proktokolektomie s kontinentní ileostomií (ileální pouch)

Ke zpomalení růstu polypů v případě nutného oddálení profylaktické operace, k zabránění tvorby RC u pacientů po kolektomii a k zabránění tvorby nádorů v horní části gastrointestinálního traktu se využívají chemoterapeutika na bázi inhibitorů cyklooxygenáz – enzymů katalyzujících přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandiny, které mají významnou roli v buněčné adhezi, angiogenezi a inhibici apoptózy (Aihara, Kumar, a Thompson 2014). Jedná se například o přípravky celecoxib (inhibitor cyklooxygenázy 2) nebo sulindac (Kim a Giardiello 2011).

V současné době je také zkoumána schopnost erytromycinu stimulovat programované pročitání stop kodonů (tzv. stop codon readthrough). Během tohoto procesu jsou rozpoznány mutacemi vzniklé předčasné stop kodony. Ribozomy je pak během translace ignorují a syntetizují protein v plné délce (Kariv et al. 2020).

V případě sporadického CC/RC je obecně známý vliv životního stylu (pravidelný pohyb a stravovací návyky) na průběh a případně i prevenci onemocnění. Několik studií se zaměřilo i na souvislost životního stylu a výskytu adenokarcinomů u pacientů s FAP. Výsledky naznačují, že pravidelná fyzická aktivita může u FAP onemocnění zpomalit malignizaci, ale i samotný růst polypů (Nakamura et al. 2019). S tvorbou a růstem adenomů a adenokarcinomů se dále do souvislosti udává chronický střevní zánět. Pacientům by tak ke zmírnění příznaků FAP onemocnění, ale i gastrointestinálních problémů v důsledku kolektomie nebo proktokolektomie mohla pomoci protizánětlivá dieta. Mezi potraviny, které by pacienti měli omezit či úplně vyřadit, patří především potraviny stimulujících zvýšenou produkci žlučových kyselin (červené a zpracované

maso) a prostaglandinů (potraviny s vysokým obsahem omega-6 mastných kyselin), alkohol a dále potraviny s vysokým glykemickým indexem (cukr, slazené nápoje, sladkosti, rafinovaná pšeničná mouka, bílé pečivo, brambory atd.), které prostřednictvím zvýšené hladiny inzulínu přispívají k tvorbě prozánětlivých cytokinů (Baena a Salinas 2015, Pasanisi et al. 2019).

3.2.5 Další formy familiární adenomatózní polypózy

Atenuovaná familiární adenomatózní polypóza

Atenuovaná familiární adenomatózní polypóza (AFAP) představuje méně závažnou formu FAP. Projevuje se přítomností menšího počtu polypů (méně než 100), převážně v proximální části tlustého střeva. V konečniku se polypy vyskytují s menší frekvencí (Bogaert a Prenen 2014). K jejich tvorbě i malignizaci dochází oproti klasické formě o 10 až 15 let později (průměrný věk diagnostiky 44 let). Kromě tlustého střeva se polypy mohou objevovat i ve dvanáctníku či žaludku. Pacienti s AFAP zároveň mívají predispozice pro tvorbu hepatoblastomů a adenokarcinomů žaludku a prsu (Half et al. 2009).

Mutace způsobující tuto formu onemocnění se podařilo lokalizovat na oba konce genu *APC* a na oblast alternativního sestřihu v exonu 9 (Balaguer et al. 2015, Fostira a Yannoukakos 2010). Na rozdíl od klasické formy FAP nemají 100% penetranci a karcinom se proto nerozvíjí u všech nositelů kauzální mutace (Jasperson et al. 2017).

Gardnerův syndrom

Kromě projevů klasické FAP se u pacientů s Gardnerovým syndromem navíc mnohem častěji tvoří nádory měkkých tkání (desmoidy) a různé kostní malformace. Docházet může zároveň i ke vzniku různých zubních abnormalit – nádory, chybějící nebo naopak nadpočetné zuby, neprořezané zuby, cysty apod. (Gardner 1962, Baldino et al. 2019).

Turcotův syndrom

U Turcotova syndromu doprovází kolorektální polypy a další symptomy spjaté s FAP navíc tvorba maligních nádorů v centrální nervové soustavě (CNS) (Turcot et al. 1959, Hamilton et al. 1995). Onemocnění se začíná projevovat již v druhé dekádě života a příznaky postižení CNS většinou předcházejí intestinální příznaky (Busbait et al. 2019).

Syndrom byl zaznamenán v autozomálně dominantní i autozomálně recesivní podobě. Z důvodu odlišného genetického původu se rozlišují 2 varianty Turcotova

syndromu. *Typ 1* je podmíněn zárodečnými mutacemi v genech kódujících proteiny pro opravu chybného párování bazí, v tzv. mismatch repair (MMR) genech (např. *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* nebo *PMS2*). Představuje proto jednu z forem Lynchova syndromu. Tento typ onemocnění charakterizují tumory gliových buněk a menší počet střevních polypů. *Typ 2* způsobují mutace v genu *APC* a jedná se tedy o formu FAP onemocnění. Projevuje se až tisíci adenomatózními kolorektálními polypy a zvýšeným rizikem tvorby meduloblastomů (maligní nádory mozku) (Dipro et al. 2012, Khattab a Monga 2020).

MUTYH-asociovaná polypóza

MUTYH-asociovaná polypóza (MAP) je zapříčiněna bialelickými zárodečnými mutacemi v genu *MUTYH*, (i přesto se uvádí jako forma FAP), na rozdíl od FAP tedy vykazuje autozomálně recesivní dědičnost. Oproti klasické FAP má toto onemocnění mírnější průběh – menší počet polypů (maximálně v řádu stovek), které se objevují v pozdějším věku. Bývá však spjato s řadou dalších nádorových onemocnění např. dvanáctníku, žaludku, endometria nebo prsu (Plevová et al. 2009, Nielsen et al. 2011).

Gen *MUTYH* se nachází v lokusu 1p34.1. Tvoří ho celkem 22 exonů (referenční sekvence NG_008189.1 v databázi NCBI), přičemž jeho nejdelší transkripční varianta (NM_001128425) je dlouhá 1,9 kbp. Kóduje glykosylázu *MUTYH* (MutY homolog), která se účastní excizních oprav bazí (BER z angl. base excision repair) ve vláknech DNA postižených oxidativním stresem (Ichinoe 2004, Nielsen et al. 2011). Konkrétně zodpovídá především za odstraňování adeninů špatně spárovaných s 8-oxoguaninem. Při absenci funkční *MUTYH* glykosylázy dochází při replikaci DNA k transverzím G:C > T:A, které u pacientů s MAP onemocněním vznikají především v genech souvisejících s tvorbou sporadického CC/RC (např. *APC* nebo *KRAS*) (Balaguer et al. 2015).

3.3 Molekulární biologie familiární adenomatózní polypózy

3.3.1 Gen *APC*

Gen *APC* kóduje stejnojmenný tumor supresorový protein. Lidský *APC* se nachází v lokusu 5q22.2 (chr5:112043202–112181936 v referenčním genomu hg19) a tvoří transkript dlouhý necelých 11 kb (délka hlavní transkripční varianty NM_000038). Skládá se alespoň z 20 exonů, přičemž přibližně 75 % kódující sekvence se nachází na posledním exonu (obr. 3.3). Právě v této oblasti bývá detekováno nejvíce zárodečných i somatických mutací (Balaguer et al. 2015). Jako referenční sekvence genu se nejčastěji využívají následující 3 (identické) sekvence: NG_008481 (databáze NCBI,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ENSG00000134982 (databáze ENSEMBL, <https://www.ensembl.org/>) a LRG_130 (databáze LRG, <https://www.lrg-sequence.org/>).

Promotorová oblast

Gen *APC* obsahuje dva promotory – 1A a 1B. Leží od sebe ve vzdálenosti asi 30 kbp, přičemž promotor 1B předchází promotor 1A. V minulosti byla promotoru 1B připisována poměrně nevýznamná role v regulaci exprese genu *APC* a nebyl proto příliš studován. Teprve až v poslední době se na tuto oblast zaměřilo několik studií a mimo jiné potvrdilo souvislost zárodečných mutací v promotoru 1B se sníženou expresí genu *APC* a FAP fenotypem (Rohlin et al. 2011, Yamaguchi et al. 2016, Marabelli et al. 2017).

Kromě FAP onemocnění způsobují zárodečné mutace v promotoru 1B také autozomálně dominantní onemocnění zvané *syndrom adenokarcinomu žaludku a mnohočetné polypózy žaludku* (GAPPS z angl. gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach). I u pacientů s FAP může docházet k tvorbě polypů žaludečního fundu, nicméně u pacientů s GAPPS syndromem je riziko případného rozvoje karcinomu vyšší. Když byla souvislost mezi mutacemi v promotoru 1B a GAPPS fenotypem objevena, zdálo se nejprve, že u pacientů nedochází k tvorbě adenomů v kolorektální oblasti (Worthley et al. 2012). O něco později již však bylo s GAPPS diagnostikováno i několik pacientů s polypy v tlustém střevě (Li et al. 2016, Jasperson et al. 2017).

I přesto, že byly mutace v promotoru 1A u pacientů s FAP onemocněním zaznamenány (Charames et al. 2008), mnohem častěji jsou detekovány mutace v promotoru 1B. O promotoru 1A se hovoří spíše v souvislosti s hypermethyací (zvýšená míra methylace DNA oproti standardnímu stavu), která se vyskytuje jak u FAP pacientů, tak u pacientů se sporadickými CC a/nebo RC, ale právě také u pacientů s GAPPS syndromem. U dědičných onemocnění způsobených mutacemi v *APC* tak hypermethylace promotoru 1A může představovat jeden z možných „druhých zásahů“ (second hit) způsobující inaktivaci genu i na druhé alele (Fearnhead et al. 2001).

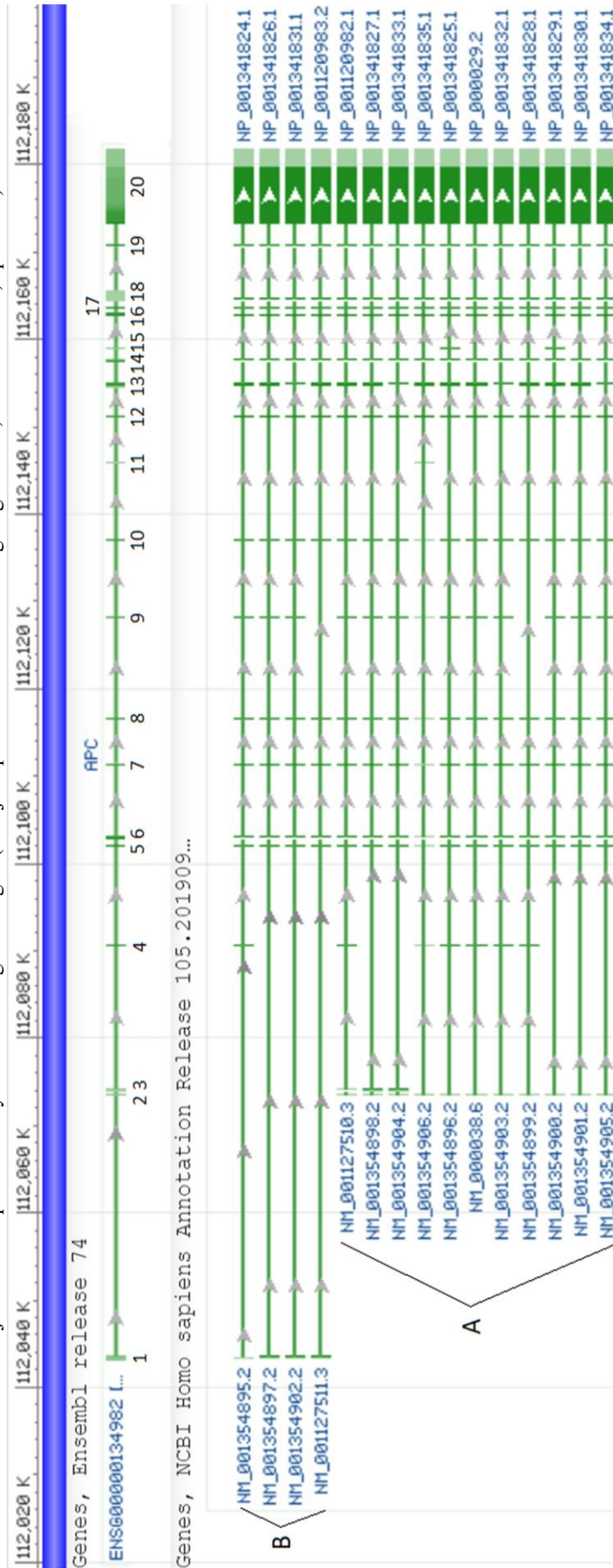
Transkripční varianty

Pro *APC* je charakteristický komplexní systém alternativní transkripce, vedoucí k tvorbě celé řady izoforem (obr. 3.3). Jak již bylo zmíněno, gen obsahuje dva promotory, které vedou k rozdílné iniciaci transkripce a izoformy se tak od sebe mohou lišit hned prvním exonem (Jasperson et al. 2017). Dále dochází k alternativnímu sestřihu

transkriptů, díky kterému mohou být v jednotlivých variantách rozdílně využity určité exony (na obr. 3.3 označené jako 3, 4 a 9). Některé z nich bývají obsaženy výhradně v transkriptech specifických pro mozkovou tkáň (Thliveris et al. 1994). Alternativní sestřihová místa jsou navíc obsažena i uvnitř některých exonů (13, 14 a 19 na obr. 3.3), které se tak v transkriptech mohou vyskytovat v různých délkách (Charames 2002, Carson et al. 2004).

Nejenom pro klinické účely se jako reference, stejně jako u ostatních genů, využívají sekvence transkriptů specifických pro studovanou tkáň (číslování exonů se tak běžně provádí s ohledem na počet exonů konkrétní referenční sekvence). Databáze NCBI momentálně obsahuje 15 referenčních sekvencí APC mRNA (obr. 3.3), databáze ENSEMBL 10 a databáze LRG 3. V řadě případů není zcela jasné, které sekvence si napříč databázemi navzájem odpovídají, a při porovnávání výsledků mezi jednotlivými laboratořemi tak situace může být poněkud komplikovaná. Primárně však bývá využívána sekvence NM_000038 (NCBI), transkript nejvíce exprimovaný napříč všemi prostudovanými tkáněmi. Tato transkripční varianta je dlouhá 10,7 kbp (překládány jsou přitom pozice 60–8591), obsahuje 16 exonů a je identická s referenčními sekvencemi ENST00000257430 (ENSEMBL) a LRG_130t1 (LRG).

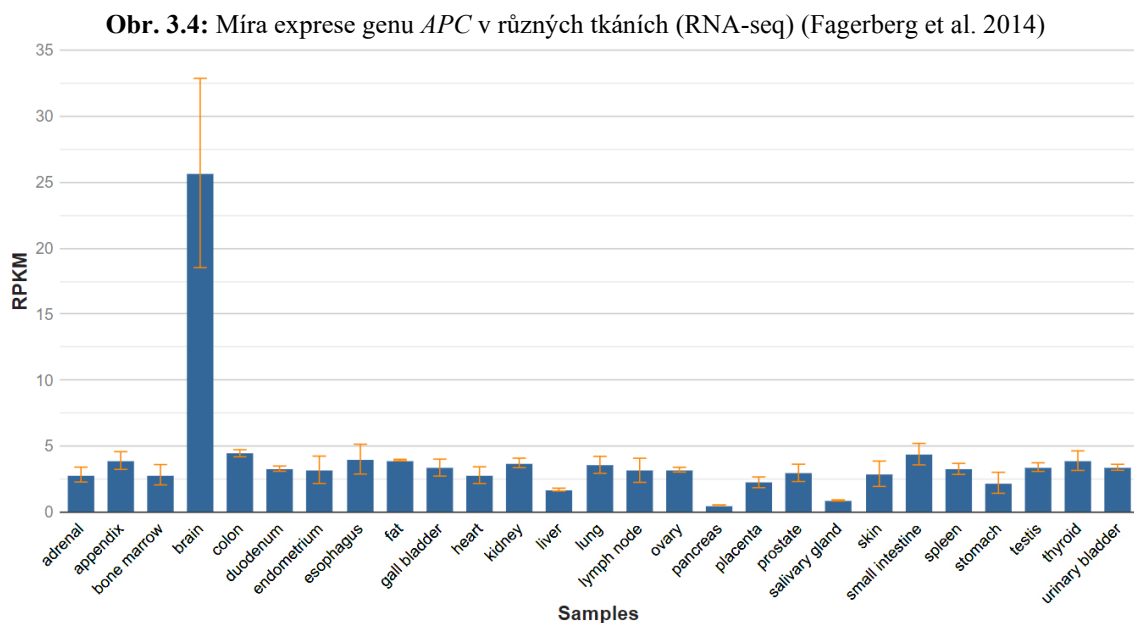
Obr. 3.3: Gen *APC* a jeho transkripční varianty – referenční genom hg19 (zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/324>, cit. 25.9.2020, upraveno)



A – transkripční varianty kontrované promotorem 1A, B – transkripční varianty kontrované promotorem 1B

Tkáňová exprese

Jednoznačně nejvíce se gen *APC* exprimuje v mozkové tkáni. Byla zde zaznamenána více než pětikrát vyšší úroveň exprese oproti ostatním studovaným tkáním (obr. 3.4) (Fagerberg et al. 2014). FAP onemocnění doprovází právě i riziko tvorby nádorů CNS, (Hamilton et al. 1995). O funkci, kterou by protein APC měl v neurogenезi mít, se zatím mnoho neví. Pravděpodobně se účastní mechanismů podílejících se na diferenciaci neuronů, tvorbě postsynaptického komplexu na nikotinových synapsích neuronů a proliferaci dospělých neurálních kmenových buněk (Rosenberg et al. 2010, Imura et al. 2010). Mutace a epigenetické modifikace genu *APC* by tak mohly hrát roli i v některých psychických poruchách – např. ve schizofrenii (Cui et al. 2005, Forero a González-Giraldo 2020).



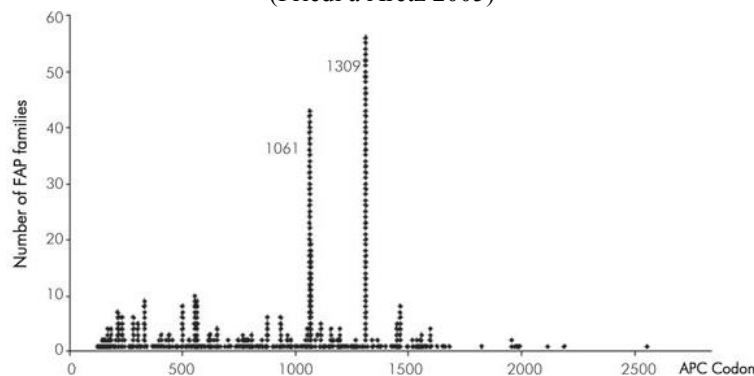
3.3.2 Genový podklad FAP onemocnění

FAP onemocnění patří mezi autozomálně dominantní onemocnění. U některých pacientů s FAP se nicméně může zdánlivě jednat o sporadickou formu, kdy pacient představuje jediného postiženého v rodokmenu. Tato situace nastává u pacienta, který je nositelem *de novo* mutace v mozaice, nebo je potomkem jedince s *de novo* mutací v mozaice. V druhém případě by pak pro takového pacienta byl již standardní heterozygotní stav. Uvádí se, že asi až 20 % případů FAP onemocnění tvoří právě mozaicismus vzniklý *de novo* mutacemi (Hes et al. 2007).

Genové mutace

Nejčastější příčinou FAP onemocnění bývají substituce a krátké inserce nebo delece. K takovýmto mutacím je nejnáchylnější poslední exon genu *APC*, obzvláště na jeho 5' konci. Na základě výsledků několika studií byla nejvyšší frekvence mutací u pacientů s FAP onemocněním zaznamenána v kodonech 1061 a 1309 (obr. 3.5) (Schnitzler et al. 1998, Friedl 2001, Bertario et al. 2004, Friedl a Aretz 2005).

Obr. 3.5: Poloha a frekvence mutací v genu *APC* u pacientů s FAP onemocněním (Friedl a Aretz 2005)



K mutacím nejnáchylnější kodon 1309 leží uvnitř tzv. oblasti mutačního klastru (mutation cluster region). Tato oblast byla v genu *APC* lokalizována na úsek kodonů cca 1250–1450, který se nachází přibližně v polovině posledního exonu. Jedná se o oblast, ve které dochází k největšímu počtu zárodečných i somatických mutací (Groves et al. 2002), přičemž nejčastěji zde dochází k mutacím, které způsobují vznik předčasných stop kodonů (nonsense nebo frameshift delece či inserce). Pokud taková mRNA není rozpoznána a degradována mechanismem nonsense-mediated mRNA decay (NMD), vzniká zkrácený protein. Aberantní protein pak ztrácí jednu či více jeho funkcí v závislosti na délce chybějícího úseku, nebo naopak získává nežádoucí vlastnost a způsobuje tak např. odolnost buňky vůči apoptóze, indukci buněčné proliferace apod. (Zhang a Shay 2017).

V databázi HGMD® (The Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>) je v současnosti zaznamenáno přes 2 tisíce zárodečných mutací v genu *APC* označených jako „patogenní“ a „pravděpodobně patogenní“ (systém klasifikace popsán v kapitole *Analýza sekvenčních dat*). Tab. 3.2 zobrazuje procentuální podíl jednotlivých typů mutací dle následku, který v molekule DNA zapříčiní.

Tab. 3.2: Procentuální podíl patogenních mutací v genu *APC* u pacientů s FAP onemocněním (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>, údaje ke dni 9.4.2021)

Typ mutace	Podíl (%)
Krátká delece	38
Nesmyslná (nonsense)	18
Krátká inserce/duplikace	17
Změna smyslu (missense)	10
Dlouhé delece	7
Sestřihová (splicing)	6
Krátký indel	2
Dlouhá inserce/duplikace	<1
Substituce v regulační oblasti	<1
Komplexní přestavba	<1

V databázi VarSome (<https://varsome.com/>) je celkově pro gen *APC* uvedeno téměř 6,5 tisíc variant (zárodečných a somatických dohromady). Největší podíl na variantách tvoří missense varianty, nicméně jejich patogenita je velmi nízká. Velkou část z toho však představují varianty s nejasným klinickým významem (VUS – z angl. variant of uncertain significance) a nízký podíl patogenních variant tak může být zavádějící. Naopak posunové a nonsense varianty v *APC* se v populaci tak často nevyskytují, ale jejich patogenita je velmi vysoká (tab. 3.3).

Tab. 3.3: Procentuální podíl jednotlivých typů genových variant v genu *APC* (<https://varsome.com/>, údaje ke dni 14.10.2020)

Typ varianty dle následku	Podíl (%)	Patogenní* (%)	Benigni** (%)	VUS (%)
Missense	61	1	2	97
Samesense	19	<1	92	8
Posunová (frameshift)	9	95	-	5
Nonsense	6	97	-	3
Varianta v nekódující oblasti (non-coding)	2	18	28	54
Inserce/delece bez posunu čtecího rámce (inframe indel)	2	3	94	3
Sestřihová (ztráta místa sestřihu)	1	88	1	11

* varianty zařazené do skupiny „patogenní“ a „pravděpodobně patogenní“

** varianty zařazené do skupiny „benigni“ a „pravděpodobně benigní“

Chromozomové mutace

V řadě případů bývá FAP onemocnění zapříčiněno rozsáhlejšími mutacemi na bázi strukturních chromozomových přestaveb. Nejčastěji se jedná se o delece či amplifikace, tzv. variabilitu počtu kopií (CNV – copy number variation). Zaznamenány byly delece a duplikace nejenom částí, ale i celých exonů, případně dlouhé delece přesahující více exonů až celý gen *APC* (Meuller et al. 2004, Aretz et al. 2005, Nielsen et al. 2007). Jak již bylo dříve uvedeno, delece mohou zasáhnout i promotorovou oblast genu. V takovém případě pak dochází k potlačení exprese genu na dané alele (Rohlin et al. 2011, Lin et al. 2015).

Vzácně se u pacientů s FAP onemocněním vyskytují delece, které zasahují mnohem delší oblast než jen samotný gen *APC*. Fenotyp pacientů pak samozřejmě závisí na rozsahu delece. Například pacienti s intersticiální delecí oblasti 5q15–q22 kromě Gardnerova syndromu trpěli mentální retardací a vykazovali také mírnou kraniofaciální dysmorfii (velká hlava v proporcii ke zbytku těla, velký nos, vysoké čelo a vysoce klenuté patro) (Hockey et al. 1989). Podobný fenotypový projev se objevil i u pacienta s intersticiální delecí lokusu 5q21.3–q23.1 (Raedle et al. 2001).

V extrémních případech lze u pacientů s FAP fenotypem nalézt i jiné strukturní chromozomové přestavby. Zaznamenány byly například inverze oblasti 5q22–q31.3 (de Chadarévian et al. 2002) nebo reciproká translokace t(5;10)(q22;q25) (Van Der Luijt et al. 1995). U jedné rodiny byla dokonce detekována komplexní přestavba exonu 4, sestávající se z delece části exonu a inserce 4 krátkých sekvencí (z toho 3 byly reverzně orientované úseky s původem v *APC* genu), která při transkripci vede k přeskočení exonu 4 a posunu čtecího rámce (Pagenstecher et al. 2007).

Genotyp-fenotypová korelace

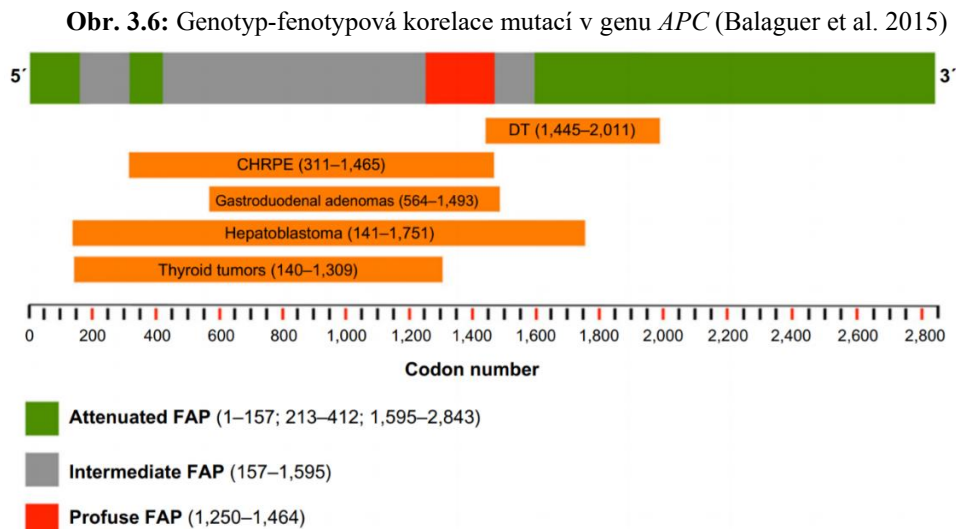
Ukazuje se, že existuje souvislost mezi pozicí mutace a klinickými projevy FAP onemocnění (tzv. genotyp-fenotypová korelace), vycházející z postižení různých domén proteinu APC s rozdílnými funkcemi. Na základě genotyp-fenotypové korelace lze FAP rozdělit do 3 kategorií – klasická, atenuovaná a agresivní forma (obr. 3.6). Stejně tak lze na genu lokalizovat oblasti související s některými dalšími projevy onemocnění jako jsou adenomy v oblasti žaludku a dvanáctníku, nádory štítné žlázy, CHRPE, desmoidní tumory nebo hepatoblastomy (Balaguer et al. 2015).

Jak již bylo výše zmíněno, nejčastěji dochází k mutacím v oblasti mutačního klastru, a to především v kodonu 1309. Jedná se o oblast, která ve vzniklém proteinu zodpovídá za vazbu β -kateninu. Pokud následkem mutace v tomto klastru vzniká zkrácený protein (v případě, že nenastane degradace mRNA mechanismem NMD), nemá schopnost vázat β -katenin. Stále však má zachovanou N-koncovou dimerizační doménu a může tak vázat funkční APC protein, který se exprimuje z druhé alely, a negativně ovlivnit jeho aktivitu (Zhang a Shay 2017). Mutace v této oblasti se u pacientů projevuje *agresivní formou FAP* (vysoký počet polypů, nízký věk manifestace, řada extrakolonických projevů).

Naopak *atenuovanou formu FAP* onemocnění způsobují mutace nacházející se na 5' konci genu, mutace v druhé polovině posledního exonu a ve většině případů i na 5' konci exonu 9 (v kanonickém transkriptu), kde se nachází místo alternativního

sestříhu (Balaguer et al. 2015, Fostira a Yannoukakos 2010). Na 5' konci exonu 9 však byla objevena i mutace, která vedla k agresivní formě FAP onemocnění. Způsobila totiž změnu v sekvenci zesilovače pro sestřih transkriptu, která v důsledku vedla k úplnému přeskočení exonu 9 a k posunu čtecího rámce v exonu 10 se vznikem stop kodonu (Cheah et al. 2012, Cheah et al. 2014).

Klasická forma FAP onemocnění pak nejspíš koresponduje s mutacemi v exonech 5–8 a 9–15 (Balaguer et al. 2015).



DT – desmoidní tumory, CHRPE – kongenitální hypertrofie retinálního pigmentového epitelu

Teorie dvou zásahů

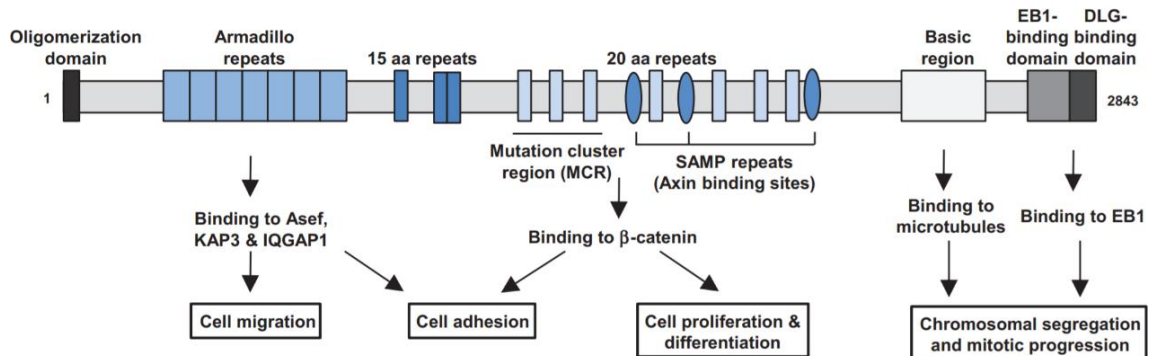
Stejně jako u ostatních onemocnění způsobených mutacemi v tumor supresorových genech platí, že onemocnění se projevuje až poté, co je gen kompletně vyřazen z funkce inaktivací i na druhé alele. Tento „druhý zásah“, ke kterému dochází na somatické úrovni, může spočívat ve ztrátě heterozygosity (LOH z angl. loss of heterozygosity), *de novo* mutaci nebo epigenetickém potlačení exprese.

Bylo zjištěno, že poloha mutace na první poškozené alele genu *APC* může ovlivnit charakter druhého zásahu, a to jak u FAP, tak u sporadických CC/RC. Pokud se mutace nachází v okolí kodonu 1300 (cca 1285–1378), dochází na druhé alele především k LOH (nejčastěji mechanismem mitotické rekombinace). V případě, že mutace leží mimo tuto oblast, bývá druhá alela inaktivována spíše v důsledku mutace v mutačním klastru vedoucí ke vzniku předčasného stop kodonu (Lamlum et al. 1999, Rowan et al. 2000, Crabtree et al. 2003).

3.3.3 Protein APC a jeho funkce

Protein APC je multifunkční protein o délce 2843 aminokyselin s molekulovou hmotností přibližně 310 kDa (v případě nejvíce zastoupené izoformy). Nejvýznamnější roli hraje APC především v regulaci hladiny β -kateninu ve Wnt signální dráze (Lesko, Goss, a Prosperi 2014). Obsahuje však celou řadu domén (obr. 3.7 znázorňuje 8 hlavních domén), které interagují s různými vazebnými partnery a podílí se tak, na celé řadě buněčných procesů jako je buněčná migrace, adheze, proliferace, diferenciacce a apoptóza (Zhang a Shay 2017).

Obr. 3.7: Jednotlivé domény proteinu APC a jejich hlavní interakční partneři (Zhang a Shay 2017)



V důsledku existence velkého množství transkriptů existuje protein APC v několika izoformách. Kanonickou sekvencí proteinu je právě výše zobrazená izoforma o délce 2843 aminokyselin, někdy také označována jako „*dlouhá izoforma*“, vznikající z promotoru 1A (NP_000029). „*Krátká izoforma*“ proteinu je dlouhá 2742 aminokyselin a její expresi reguluje stejný promotor (NP_001341832). Nejvýznamnější izoforma, jejíž vznik reguluje promotor 1B je dlouhá 2825 aminokyselin (NP_001120983).

Hlavní funkční domény a jejich interakční partneři

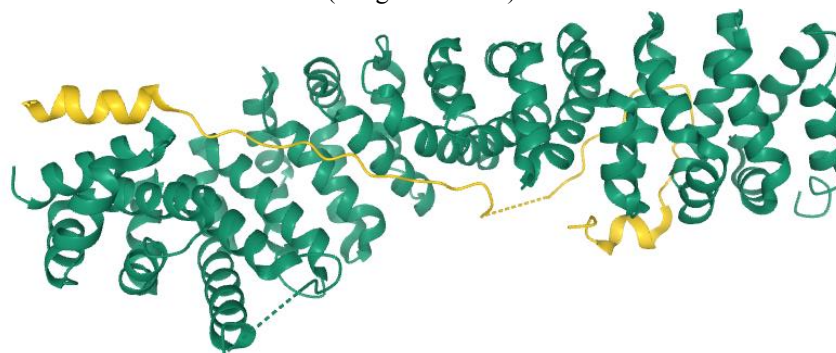
Přímo na N-konci proteinu se nachází 55 aminokyselin dlouhá *dimerizační doména* se strukturou coiled-coil (typ šroubovice s opakujícími se motivy o délce 7 aminokyselin převážně hydrofobního charakteru), která umožňuje tvorbu jeho homodimerů (Fearnhead et al. 2001). Bylo zjištěno, že s doménou mohou interagovat zkrácené APC proteiny obsahující alespoň prvních 171 aminokyselin. Vazba těchto aberantních proteinů však negativně ovlivňuje funkci dimeru (Zhang a Shay 2017), který pravděpodobně přispívá k samotné tvorbě a stabilizaci komplexu degradujícího β -katenin (Kunttas-Tatli et al. 2014).

Směrem k C-konci proteinu následuje dimerizační doménu tzv. *armadillo oblast* sestávající se ze 7 repetitivních armadillo úseků. Jedná se o vysoce konzervovanou oblast,

kteřá vykazuje vysoký stupeň homologie s podobnou sekvencí v molekule β -kateninu. (Fearnhead et al. 2001). Zprostředkovává vazbu faktorů podílejících se na buněčné migraci a adhezi (obr. 3.7) (Zhang a Shay 2017). Pravděpodobně také souvisí s apoptózou. Zatímco plnohodnotný protein APC podle řady studií hraje roli v navození apoptózy, mutovaný protein může prostřednictvím různých mechanismů způsobovat přežití nádorových buněk. Lokalizace aberantního APC byla například zjištěna v mitochondriích, kde ovlivňuje aktivitu Bcl-2 proteinů regulujících apoptózu (Lui et al. 2012).

Dále protein obsahuje 3 repetic 15 aminokyselin dlouhých sekvencí (*15 aa repeats*), které sice představují vazebná místa pro β -katenin, nicméně v regulaci jeho hladiny v cytoplazmě roli nemají. Za tu je zodpovědná až následující doména, kterou tvoří 7 repetic tentokrát 20 aminokyselin dlouhých úseků (*20 aa repeats*). β -katenin se na tuto oblast váže pouze v případě, že je v místech vazby fosforylována (stejná podmínka platí i v případě předchozí domény). Pro správnou funkci domény musí přitom protein obsahovat alespoň 3 takové repetitivní sekvence. Velké množství mutací však způsobuje, že v proteinu většina těchto repetic chybí (Fearnhead et al. 2001). Vazbu β -katenin na tuto doménu zobrazuje obr. 3.8.

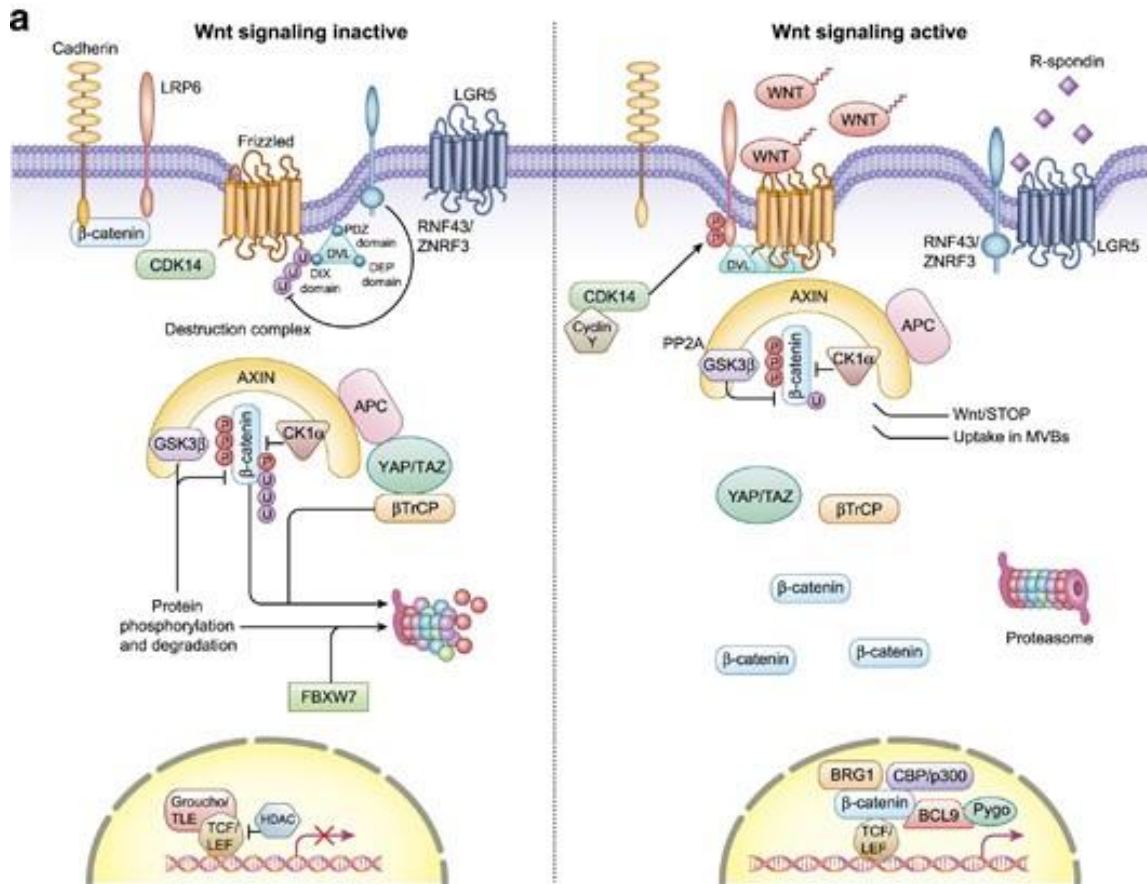
Obr. 3.8: Komplex 20 aa repeats domény APC (žlutá) s molekulou β -kateninu (zelená) (Xing et al. 2004)



S regulací hladiny β -kateninu dále souvisí i *doména SAMP* (Ser-Ala-Met-Pro) repetic, která se částečně překrývá s předchozí doménou. Jedná se o oblast, se kterou interaguje protein axin (obr. 3.9). Jeho vazba na APC společně s vazbou β -kateninu stimuluje další fosforylaci β -kateninu na jeho N-konci pomocí kasein kinázy 1 a glykogensyntázakinázy 3 β , která funguje jako signál pro jeho ubiquitinylnaci a následnou degradaci proteazomem (Fearnhead et al. 2001). V případě, že z jakéhokoliv důvodu nedochází k degradaci β -kateninu, akumuluje se v cytoplazmě a následně je transportován do jádra. Zde interaguje s transkripčními faktory z rodiny TCF/LEF (T-buněčný faktor/lymfoidní zesilovací faktor) stimujícími transkripci genů zodpovědných za proliferaci a invazivitu

nádorových buněk (Haigis 2013). Asociace proteinů APC a β -kateninu má však i funkci v adhezi epiteliálních buněk, která je zprostředkována díky vazbě molekul β -kateninu a E-kadherinu.

Obr. 3.9: Kanonická Wnt signální dráha (Zhan et al. 2017)



V sekvenci proteinu APC dále následuje *bazická doména*. Jak už název sám napovídá, obsahuje motiv se značným množstvím bazických aminokyselin (především argininu a lysinu). V neobvykle vysoké míře je však zastoupen i prolin (Fearnhead et al. 2001). Pomocí těchto reziduí se prostřednictvím β -tubulinu na doménu váží vlákna mikrotubulů. Doména proteinu se tedy mimo jiné podílí na správném průběhu mitózy. Oblast je také zodpovědná za vazbu dalšího cytoskeletálního proteinu aktinu. (Lesko et al. 2014).

S mikrotubuly, i když nepřímou, interaguje i *EB1 vazebná doména*. Protein EB1 (end-binding protein 1) bývá během různých fází buněčného cyklu asociován s centromerem, mitotickým vřeténkem a distálními (+) konci mikrotubulů (Fearnhead et al. 2001). Díky vazbě EB1 proteinu tedy APC napomáhá při segregaci chromozomů, zároveň také směřuje mitotické vřeténko směrem k pólům buňky a ustanovuje tak buněčnou polaritu (Hankey et al. 2018).

Na samotném C-konci proteinu (posledních 72 aminokyselin) se nachází *DLG vazebná doména*, přičemž komplex proteinů DLG (lidský homolog proteinu disc large) a APC hraje roli v negativní regulaci buněčné proliferace (Sotelo et al. 2012). Kromě toho se prostřednictvím C-terminální domény protein APC dokáže také vázat na AT bohaté oblasti DNA a inhibicí replikace tak regulovat vstup buňky do S-fáze buněčného cyklu (Hankey et al. 2018).

I když se protein APC nachází z velké části v cytoplazmě, pomocí armadillo domény a motivů na N-konci dochází k jeho transportu mezi cytoplazmou a jádrem (Lui et al. 2012). V jádře má protein mimo jiné schopnost vázat se přímo na DNA polymerázu β a endonukleázy FEN1 (flap endonukleáza 1) a APE1 (apurinní/apyrimidinní endonukleáza 1) a bránit tak asociaci BER proteinů nutných pro opravu DNA. Doména zodpovědná za tuto vazbu se nachází blízko N-konce proteinu a většina zkrácených proteinů si tak tuto vlastnost v různé míře zachovává. Způsob, jak mutovaný protein mechanismus opravy DNA ovlivňuje, zatím není přesně znám. Např. v buněčné linii LoVo (lidské buňky karcinomu tlustého střeva exprimující zkrácený APC) byla zaznamenána zvýšená aktivita výše uvedených enzymů a urychlená asociace BER proteinů, které vedou k chromozomové nestabilitě a progresi rakovinného bujení. Kromě BER proteinů může APC v jádře dále interagovat s RP32A podjednotkou replikačního proteinu A, který stabilizuje jednořetězcové DNA intermediáty během replikace. Působí také na multiproteinový komplex aktivní během oprav dvouřetězcových zlomů (Hankey et al. 2018).

Paralog APC2

Kromě klasické formy genu *APC* nesou savci včetně člověka také jeho paralog *APC2* (někdy označován jako *APCL*). Nachází se na 19. chromozomu v lokusu 19p13.3 a je dlouhý téměř 27 kbp. Jeho exprese se téměř výhradně omezuje na mozek (Aoki a Taketo 2007). Hlavní izoforma proteinu *APC2* je dlouhá 2303 aminokyselin o celkové molekulární hmotnosti asi 244 kDa. Strukturní homologii s proteinem *APC* vykazuje především v N-koncové a centrální oblasti. Z toho důvodu si *APC2*, i když s menší účinností, ponechal roli antagonisty Wnt signální kaskády. Na rozdíl od *APC* však na svém C-konci nese doménu schopnou vázat p53 vazebný protein 2 (Nakagawa et al. 1998, Giles a Voest 2005, Schneikert et al. 2013).

Vzhledem k tomu, že je *APC2* z naprosté většiny exprimován v mozku, souvislostí mezi mutacemi v tomto genu a FAP onemocněním nebo jinými formami CC/RC se

mnoho studií dosud nezabývalo. Poměrně nedávno však bylo objeveno, že bialelické mutace v *APC2* způsobují jednu z forem Sotosova syndromu (Almuriekhi et al. 2015). Jedná se o vzácnou autozomálně recesivní formu gigantismu charakterizovanou nadměrným růstem v prenatálním i postnatálním období, a to především co se týče mozku (tzv. cerebrální gigantismus). U pacientů se projevuje různým stupněm mentální retardace, zvětšenou hlavou v proporcii ke zbytku těla a typickými obličejovými rysy (především vysoké čelo) (Sotos et al. 1964). Primárně je Sotosův syndrom způsoben mutacemi v genu *NSDI* (jaderný receptor pro protein 1 obsahující SET doménu) kódujícím histonovou methyltransferázu, která se podílí na regulaci transkripce genů zodpovědných za regulaci růstu a vývoje tkání, včetně mozku. Jedním z jejích efektorů je právě gen *APC2*, což vysvětluje proč se bialelické mutace v tomto genu projevují fenotypem Sotosova syndromu (Almuriekhi et al. 2015).

Paralog H3BNH8

Druhý paralog genu *APC* představuje dosud málo prozkoumaný gen *H3BNH8*. Nachází se na 5. chromozomu, je dlouhý přibližně 40,3 kbp a částečně se překrývá s genem *APC*. U pacientů se sporadickým CC/RC byly v tomto genu objeveny somatické mutace (Dashti et al. 2020).

4. Materiály a metody

4.1 Vzorky

Celkem bylo analyzováno 78 vzorků DNA pocházející od nepříbuzných suspektních FAP/AFAP probandů (s výjimkou 2 sourozenců) – četné polypy v kolorektální oblasti, u několika pacientů již malignizované, několik pacientů po profylaktické operaci, pozitivní rodinná anamnéza, extrakolonické příznaky.

Probandům byla na základě kolonoskopického vyšetření a/nebo pozitivní rodinné anamnézy v letech 1993–2004 indikována molekulární diagnostika FAP onemocnění, nicméně žádnou klinicky významnou variantu se u nich tehdy dostupnými metodami nepodařilo zachytit. S vývojem nových metod byly vzorky několikrát re-analyzovány, u probandů zahrnutých do této práce však stále s negativním výsledkem.

Re-analyzovaná DNA byla izolována z periferní krve pacientů vysolovací metodou v letech 1993–2004. Po provedení prvotní diagnostiky byly vzorky uchovávány v mrazicích boxech při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro re-analýzu pak byly vzorky rozmrazeny a uchovávány při teplotě do $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

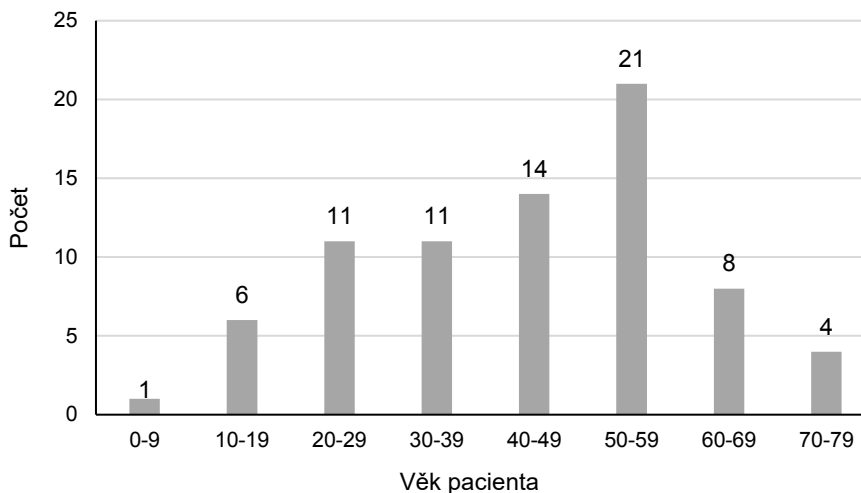
Soubor probandů

Soubor re-analyzovaných probandů charakterizuje tab. 4.1, věkové rozložení pak znázorňuje graf 4.1.

Tab. 4.1: Základní charakteristika souboru probandů

Parametr	Hodnota
Celkový počet probandů	78
<i>Pacienti</i>	76
Muži	56 (74 %)
Ženy	21 (26 %)
Věk v době prvotní diagnostiky:	
Průměrný věk	43 let
Nejfrekventovanější věk (modus)	58 let
<i>Zdraví probandi s pozitivní rodinnou anamnézou</i>	2

Graf 4.1: Věkové rozdělení pacientů v době prvotní diagnostiky



4.2 Chemikálie

Obecné chemikálie

- sterilní voda
- low TE pufr – 10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich)
- ethanol p.a., min. 99,8% (PENTA s.r.o.)

Příprava NGS knihovny, sekvenace

- 10mM Tris-HCl, pH 8, no EDTA (Sigma-Aldrich)
- paramagnetické kuličky Agencourt® AMPure XP, 60 ml (Beckman Coulter)
- sada pro přípravu NGS knihovny – KAPA HTP (High Throughput) Library Preparation Kit (Illumina® platforms), 96 knihoven (Roche):
 - KAPA End Repair Enzyme Mix
 - KAPA End Repair Buffer with dNTPs, 10× zakoncentrovaný
 - KAPA A-Tailing Enzyme
 - KAPA A-Tailing Buffer, 10×
 - KAPA DNA Ligase
 - KAPA Ligation Buffer, 5×
 - KAPA PEG/NaCl SPRI® (Solid Phase Reversible Immobilization) Solution
 - KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 2×
- pracovní roztok adaptorů, 15 μ M (příloha 1)
- pracovní roztok indexů i5 a i7, 25 μ M (příloha 2)
- pracovní roztok oligonukleotidů blokujících indexy, 1 mM (příloha 3)
- Human Cot-1 DNA® 1 mg/ml (Invitrogen)
- paramagnetické kuličky potažené streptavidinem Dynabeads® M-270 Streptavidin (Invitrogen)
- NGS panel CZECANCA v.1.2 (SeqCap® EZ Choice, Nimblegen/Roche)
- sada pro hybridizaci cílových sekvencí s NGS panelem a jejich následnou selekci – NimbleGen SeqCap® EZ Hybridization and Wash Kit (Roche)
 - Hybridization Component A

- Hybridization Buffer, 2×
- Stringent Wash Buffer, 10×
- Wash Buffer I, II a III, 10×
- Bead Wash Buffer, 2,5×
- primery pro obohacení knihovny (příloha 4)
- hydroxid sodný, 10M (Sigma-Aldrich)
- Tris-HCl pufr, 10mM, pH 8.5 (Sigma-Aldrich) – jen v případě sekvenace na NextSeq Illumina® platformě
- kontrolní knihovna PhiX Control v3, 10nM (Illumina®)
- NGS sekvenační sada MiSeq Reagent Kit v3, 150 cyklů (Illumina®)
 - cartridge předem naplněná reagensy pro tvorbu klastrů a sekvenování
 - pufr pro ředění denaturované knihovny HT1 Hybridization Buffer
 - Incorporation Buffer
- NGS sekvenační sada NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5, 150 cyklů (Illumina®)
 - cartridge předem naplněná reagensy pro tvorbu klastrů a sekvenování
 - cartridge předem naplněná pufrů a omývacími roztoky
 - HT1 Hybridization Buffer
- sada pro fluorimetrickou kvantifikaci DNA – Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit, 500 reakcí (Invitrogen):
 - Qubit™ dsDNA HS Reagent, 200× v DMSO
 - Qubit™ dsDNA HS Buffer
 - Qubit™ dsDNA HS Standard #1 (0 ng/μl v TE pufru)
 - Qubit™ dsDNA HS Standard #2 (10 ng/μl v TE pufru)
- sada pro kvantifikaci DNA pomocí čipové kapilární elektroforózy na přístroji 2100 Bioanalyzer – High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies):
 - Agilent High Sensitivity DNA Ladder
 - Agilent High Sensitivity Markers 35/10380 bp
 - Agilent High Sensitivity Dye Concentrate
 - Agilent High Sensitivity Gel Matrix
- 5× HOT FIREPol® EvaGreen® (Solis BioDyne)
- primery pro kontrolu obohacení NGS knihovny, 0,5 μM (příloha 5)

Konfirmace variant nalezených NGS metodou

PCR amplifikace vybraných úseků:

- primery pro vybrané úseky zkoumaných genů (Generi Biotech) (
- příloha 6)
- Combi PPP Master Mix, 2× (Top-Bio)
- chlorid hořečnatý, 25mM (Applied Biosystems)

Long range PCR:

- sada pro long-range PCR – PrimeSTAR® GXL kit (Takara Bio):
 - PrimeSTAR® GXL polymerase, 1,25 U/μl (Takara Bio)

- 5× PrimeSTAR® GXL Buffer, 5× (Takara Bio)
- dNTP Mixture, 2,5 mM/typ (Takara Bio)
- sada pro izolaci DNA z agarózového gelu – S.N.A.P.™ Gel Purification Kit (Thermo Fisher Scientific):
 - roztok jodidu sodného (6,6M jodid sodný, 16mM siřičitan sodný)
 - Binding Buffer (7M guanidinium HCl)
 - Final Wash, 4× (400mM NaCl)

Gelová elektroforéza v agarózovém gelu:

- Tris-borát-EDTA, 10× (Sigma-Aldrich)
- 0,5% až 2% agarózový gel: 0,5–2% (v/v) agaróza + 0,01% (v/v) 10× Gel Red Dye v TBE pufru (1×)
 - agaróza (Sigma-Aldrich)
 - GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10× (Biotium)
- nanášecí barva (loading dye): 0,04% (m/m) bromfenolová modř + 40% (m/m) sacharóza v H₂O
 - bromfenolová modř (Sigma-Aldrich)
 - D(+)-sacharóza (Sigma-Aldrich)
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
- O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)
- MassRuler DNA Ladder Mix, 80 bp až 10 kbp (Thermo Fisher Scientific)

Sekvenování modifikovanou Sangerovou metodou:

- ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific)
- sada BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific):
 - BigDye™ Reaction Mix
 - BigDye™ Terminator Sequencing Buffer, 5×
- EDTA, 0,5M (Sigma-Aldrich)
- octan sodný (Sigma-Aldrich)
- formamid, min. 99,5% (Sigma-Aldrich)

MLPA:

- MLPA sondy – SALSA® MLPA® Probemix (MRC Holland):
 - P043-E1 APC
 - P008-C1 PMS2
- MLPA reagentie – SALSA® MLPA® Reagent Kit (MRC Holland):
 - SALSA MLPA Buffer
 - SALSA Ligase-65
 - SALSA Ligase-65 Buffer A, SALSA Ligase-65 Buffer B
 - SALSA Polymerase
 - SALSA PCR Primers

4.3 Software

- Integrative Genomics Viewer, IGV v.2 (Broad Institute, USA)
- BioEdit v.7 (Tom Hall, Ibis biosciences, USA)
- Coffalyser.Net™ v.210226.1433 (MRC Holland, Nizozemsko)
- Primer BLAST (NCBI, USA) – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Reverse Complement – https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

4.4 Metody

DNA pacientů byla sekvenována pomocí metody NGS na platformách MiSeq a NextSeq (Illumina®) za využití sekvenačního onkopanelu CZEKANCA v.1.2 (Czech Cancer Panel for Clinical Application). Přítomnost zachycených patogenních mutací v genu *APC* a dalších genech související s jiným typem kolorektálních polypóz a predispozice pro tvorbu CC/RC byla následně potvrzena modifikovanou metodou Sangerova sekvenování (bodové mutace a krátké delece nebo inserce), pomocí metody MLPA či long-range PCR (delece, inserce či amplifikace delšího rozsahu).

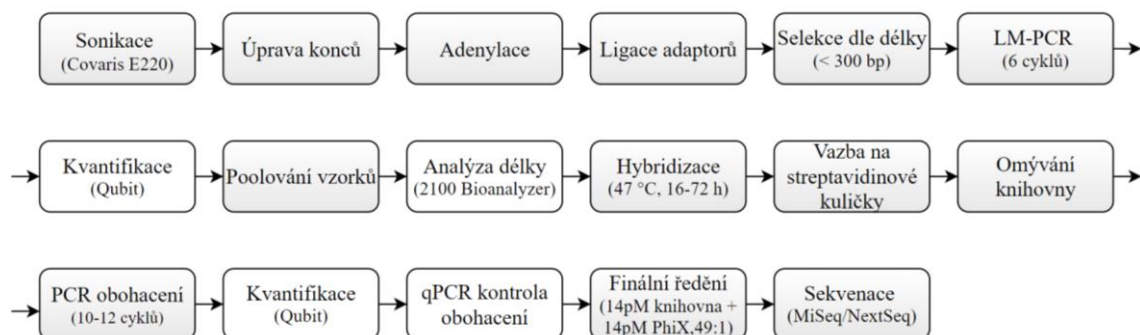
4.4.1 Příprava NGS knihovny

Během jednoho NGS sekvenačního běhu lze analyzovat vždy tolik vzorků, kolik umožní sekvenační kapacita dané platformy a zvolených kitů. Při výpočtu se cílí na minimální pokrytí oblasti panelu 100×, což znamená, že každý úsek vybrané genetické informace by měl mít minimálně 100 překrývajících se čtení. Na platformě MiSeq se tedy sekvenovalo 30 pacientů, u platformy NextSeq lze sekvenovat až 96 pacientů najednou.

Koncentrace DNA ve vzorcích byla před samotným započítím přípravy knihovny změřena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) a následně upravena na hodnotu 100/ µl pomocí low TE pufru (pokud to počáteční koncentrace umožnila).

Jednotlivé kroky přípravy NGS knihovny znázorňuje obr. 4.1.

Obr. 4.1: Schéma přípravy NGS knihovny



Fragmentace DNA

DNA pacientů ve vstupním množství 500 ng (objem doplněn do 53 μ l low TE pufrem) byla fragmentována mechanismem sonikace na přístroji Covaris E220 (Covaris, USA) ve speciálních skleněných mikrozkuvkách (8 microTUBE strip, Genetica). Parametry sonikace (tab. 4.2) byly přitom nastaveny tak, aby vznikaly fragmenty DNA o délce 180–200 bp. Po ukončení fragmentace byl veškerý objem vzorků přenesen do jamek PCR destičky a ze 3 náhodně vybraných vzorků bylo odebráno po 1 μ l pro následnou kontrolu délky fragmentů na přístroji 2100 Bioanalyzer (viz dále).

Tab. 4.2: Parametry sonikace DNA na přístroji Covaris E220

Parametr	Hodnota
Maximální výkon pulzu	175 W
Střída signálu (duty factor)	10 %
Počet pulzů na výboj	200
Doba sonikace jednoho vzorku	155 s
Teplota	7 °C
Hladina vody	15
Objem vzorků	53 μ l

Úprava konců DNA fragmentů

Sonikace DNA vede k tvorbě fragmentů s lepivými konci, které bylo pro další kroky přípravy NGS knihovny nezbytné upravit na tupé. Ke vzorkům bylo přidáno po 20 μ l směsi enzymu a pufru (tab. 4.3) a poté byly inkubovány při teplotě 20 °C (LifeEco Gradient Cycler, KR) po dobu 30 minut.

Tab. 4.3: Směs pro úpravu konců DNA fragmentů

Chemikálie	1×V (μl)	31,5×V (μl)
10× KAPA End Repair Buffer with dNTPs	7	220,5
KAPA End Repair Enzyme Mix	5	157,5
Sterilní voda	8	252
<i>Celkový objem (μl)</i>	<i>20</i>	<i>630</i>

Po úpravě konců byly vzorky přečištěny ethanolem s využitím vazby DNA fragmentů na paramagnetické kuličky. Ke vzorkům bylo napipetováno po 120 μ l paramagnetických kuliček Agencourt® AMPure XP. Směs se nechala inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 5 minut, poté se PCR destička umístila na magnetický stojan a po vyčerpání vzorků byl odsán supernatant. Následně byly fragmenty dvakrát po sobě přečištěny 80% ethanolem, přičemž každé přečištění se skládá z následujících kroků: přidat 190 μ l 80% (v/v) ethanolu, promíchat, inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 30 sekund, umístit na magnetický stojan, odsát supernatant. Na závěr byly vzorky sušeny

při laboratorní teplotě po dobu asi 3 minut (do doby, než se na shlucích kuliček nezačaly tvořit praskliny). Celý výše uvedený postup přečištění vzorků ethanolem s využitím paramagnetických kuliček se během přípravy knihovny ještě několikrát opakuje. Dále proto bude uváděn v textu pouze jako „přečištění 80% ethanolem“.

Adenylace

Pro umožnění vazby adaptorů, která následuje v dalším kroku, byly 3' konce fragmentů adenylvány. Ke vzorkům bylo napipetováno po 50 μ l připravené směsi enzymu a pufru (tab. 4.4) a po promíchání se směsi nechaly inkubovat při teplotě 30 °C po dobu 30 minut. Po ukončení bylo ke vzorkům přidáno po 90 μ l KAPA PEG/NaCl SPRI Solution a po promíchání byla směs inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následně se vzorky přečistily 80% ethanolem stejným způsobem jako po úpravě konců.

Tab. 4.4: Směs pro adenylaci DNA fragmentů

Chemikálie	1×V (μl)	31×V (μl)
10× KAPA A-Tailing Buffer	5	155
KAPA A-Tailing Enzyme	3	93
Sterilní voda	42	1302
<i>Celkový objem (μl)</i>	<i>50</i>	<i>1550</i>

Ligace adaptorů

Po adenylaci byly na konce fragmentů navázány adaptory i5 (na 5' konec) a i7 (na 3' konec) obsahující sekvence komplementární k indexovaným primerům, které jsou do fragmentů zabudovány v pozdější fázi přípravy knihovny. Ke vzorkům bylo napipetováno po 50 μ l směsi DNA ligázy, pufru a adaptorů (tab. 4.5). Reakční směsi se nechaly po dobu 15 minut inkubovat při teplotě 20 °C a následně bylo opět provedeno přečištění vzorků 80% ethanolem. Usušené paramagnetické kuličky s navázanými fragmenty byly resuspendovány ve 100 μ l 10mM Tris-HCl pufru, pH 8,0, no EDTA. Tato směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 2 minut, během kterých došlo k uvolnění fragmentů z kuliček.

Tab. 4.5: Směs pro ligaci adaptorů

Chemikálie	1×V (μl)	31×V (μl)
5× KAPA Ligation buffer	10	310
pracovní roztok adaptorů (15 μ M)	3,5	108,5
KAPA DNA Ligase	5	155
Sterilní voda	31,5	976,5
<i>Celkový objem</i>	<i>50</i>	<i>1550</i>

Selekce fragmentů na základě délky

V tomto kroku byly ze směsi izolovány fragmenty s navázanými adaptory (fragmenty o celkové délce cca 100–500 bp). Selekcce byla provedena pomocí vazby fragmentů na paramagnetické kuličky za přidání roztoku polyethylenglykolu a NaCl. Zvolený poměr PEG/NaCl roztoku a DNA je důležitý, neboť určuje, jak velké fragmenty se na paramagnetických kuličkách zachytí.

Ke vzorkům bylo přidáno po 60 µl KAPA PEG/NaCl SPRI® Solution. Po 5minutové inkubaci při laboratorní teplotě byly vzorky umístěny na magnetický stojan a poté, co se vyčeřily, bylo z každé jamky přeneseno vždy 155 µl supernatantu do čisté PCR destičky. K supernatantu bylo přidáno dalších 20 µl čistých AMPure kuliček a po dalších 5 minutách inkubace byl z jamek destičky po umístění na magnetický stojan odsán supernatant. Na závěr byla peleta kuliček přečištěna ethanolem, přičemž na kuličkách by měly zůstat navázané pouze fragmenty o délce do 300 bp.

Po usušení byly magnetické kuličky resuspendovány ve 26 µl 10mM Tris-HCl, pH 8. Směs se nechala inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 2 minut, během kterých by se DNA fragmenty měly z kuliček uvolnit. Po umístění destičky na magnetický stojan a vyčeření vzorků bylo do nové PCR destičky přeneseno vždy po 23 µl supernatantu obsahujícího uvolněné DNA fragmenty. Zároveň bylo také ze 4 jamek odebráno po 1 µl supernatantu pro analýzu na přístroji 2100 Bioanalyzer (ideálně ze stejných vzorků jako v situaci po fragmentaci + 1 vzorek navíc).

Ligací zprostředkovaná PCR

Pro odlišení DNA jednotlivých pacientů byly fragmenty v rámci ligací zprostředkované PCR reakce (LM PCR z angl. ligation-mediated polymerase chain reaction) označeny primery obsahujícími unikátní sekvenci (tzv. index) o délce 8 bp (viz příloha 1). Ke vzorkům bylo přidáno po 25 µl master mixu (KAPA HiFi HotStar ReadyMix) a 2 µl předem připravených pracovních roztoků indexovaných primerů i5 (D501–D505) a i7 (D701–D706). Indexy byly smíchány a následně pipetovány ke vzorkům tak, aby měl každý vzorek měl svoji unikátní kombinaci indexů (tab. 4.6). V případě přípravy knihovny na NextSeq platformu byla řada těchto indexů rozšířena až na 96 unikátních kombinací. Teplotní program LM PCR reakce znázorňuje tab. 4.7.

Tab. 4.6: Schéma přípravy a pipetování směsi indexů pro značení vzorků

Indexy	D701	D702	D703	D704	D705	D706
D501	1	2	3	4	5	6
D502	7	8	9	10	11	12
D503	13	14	15	16	17	18
D504	19	20	21	22	23	24
D505	25	26	27	28	29	30

Číslo 1-30 odpovídá umístění vzorku v PCR destičce, do kterého byla pipetována daná kombinace indexů. Například do jamky 9 byla napipetována směs indexů D502 a D703.

Tab. 4.7: Teplotní program LM PCR reakce po selekci fragmentů na základě jejich délky

Krok	Teplota (°C)	Doba	Počet opakování
Počáteční denaturace	98	45 s	-
Denaturace	98	15 s	-
Nasednutí primerů	65	30 s	6x
Elongace	72	30 s	-
Závěrečná elongace	72	5 min	-
Chlazení	4	∞	-

Po skončení LM PCR bylo ke vzorkům přidáno po 90 µl paramagnetických kuliček Agencourt® AMPure XP, směs byla inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a následně byly vzorky přečištěny 80% ethanolem. Po přečištění byly kuličky resuspendovány v 52 µl sterilní vody a inkubovány po dobu 2 minut při laboratorní teplotě. S využitím magnetického stojanu pak bylo do čisté PCR destičky přeneseno vždy po 50 µl supernatantu obsahujícího uvolněné fragmenty. Zároveň bylo také z vybraných jamek odebráno po 1 µl zbylého supernatantu pro analýzu fragmentů na přístroji 2100 Bioanalyzer (ideálně stejné vzorky jako pro kontrolu selekce na základě délky fragmentů).

Fluorimetrická kvantifikace DNA fragmentů

Pro vytvoření ekvimolární směsi všech indexovaných vzorků (při kroku tzv. poolování) bylo nutné zjistit jejich koncentraci. Ta byla v tomto kroku stanovena fluorimetricky na přístroji Qubit™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific) pomocí dsDNA HS (high sensitivity) sady (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit 500 assays, Invitrogen). Podle tab. 4.8 byl nejprve připraven zásobní roztok pufru a fluorescenční barvy, ze kterého pak vycházela příprava kalibračních standardů a samotných analyzovaných vzorků.

Tab. 4.8: Příprava roztoků pro fluorimetrickou kvantifikaci DNA ve vzorcích

Roztok	Složení
Zásobní roztok pufru	7,164 ml dsDNA HS Buffer + 36 µl 200× dsDNA HS Reagent
Standard 1 (0 ng/µl)	190 µl pufru + 10 µl dsDNA HS Standard #1
Standard 2 (10 ng/µl)	190 µl pufru + 10 µl dsDNA HS Standard #2
Vzorky 1–30	198 µl pufru + 2 µl vzorku




Poolování vzorků

V 1,5ml LoBind zkumavce (Eppendorf) byly smíchány alikvóty vzorků tak, aby bylo od každého vzorku do knihovny přidáno 33 ng DNA (celkově knihovna obsahuje 1 µg DNA). Ke smíchaným vzorkům bylo přidáno 5 µl Human Cot-1 DNA® (1 mg/ml), která blokuje repetitivní úseky lidské DNA, a 2 µl již předem připravené směsi oligonukleotidů blokujících indexy, kterými jsou DNA fragmenty jednotlivých pacientů označeny. Promíchaná směs byla vysušena ve vyhřívané vakuové sušičce s rotorem (IR Micro-Cenvac, N-Biotek), po dobu 20 až 30 minut. PCR destička se zbytky vzorků byla uschována pro pozdější kontrolu obohacení knihovny.

Analýza délky fragmentů

Před hybridizací vzorků se sekvenačním panelem CZEKANCA v. 1.2 byl proveden kontrolní krok týkající se dané NGS knihovny pomocí čipové formy kapilární elektroforézy na přístroji 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Analyzováno bylo celkem 11 vzorků ve 3 různých fázích přípravy – 3 vzorky po fragmentaci na sonikátoru Covaris E220, 4 vzorky po selekci na základě délky a 4 vzorky po LM PCR (v ideálním případě stejné vzorky).

Do celého objemu gelové matrice (Agilent High Sensitivity DNA Gel Matrix) bylo napipetováno 15 µl koncentrované fluorescenční barvy (Agilent High Sensitivity DNA Dye Concentrate). Směs byla důkladně protřepána a přenesena do mikrozskumavky s filtrem, ve které byla odstředěna (2 240 × g, 15 min, lab. teplota). Gel byl připravován v přebytku s tím, že vystačí na 7 analýz (skladování při 4 °C, trvanlivost 6 týdnů).

Čip (Agilent High Sensitivity DNA Chip) byl podle návodu od výrobce zafixován do plnicí stanice a do zvolených pozic (obr. 4.2) bylo napipetováno 9 µl přefiltrovaného gelu (pozice označené symboly  a ) , 5 µl směsi markerů (Agilent High Sensitivity DNA Markers 35/10380 bp, pozice 1–12), 1 µl velikostního standardu (Agilent High Sensitivity DNA Ladder, pozice označená symbolem ) a na závěr také po 1 µl jednotlivých vzorků (pozice 1–11). Takto připravený čip byl před vložením do přístroje 2100 Bioanalyzer třepán po dobu 1 min na třepačce IKA® MS 3 basic (Schoeller).

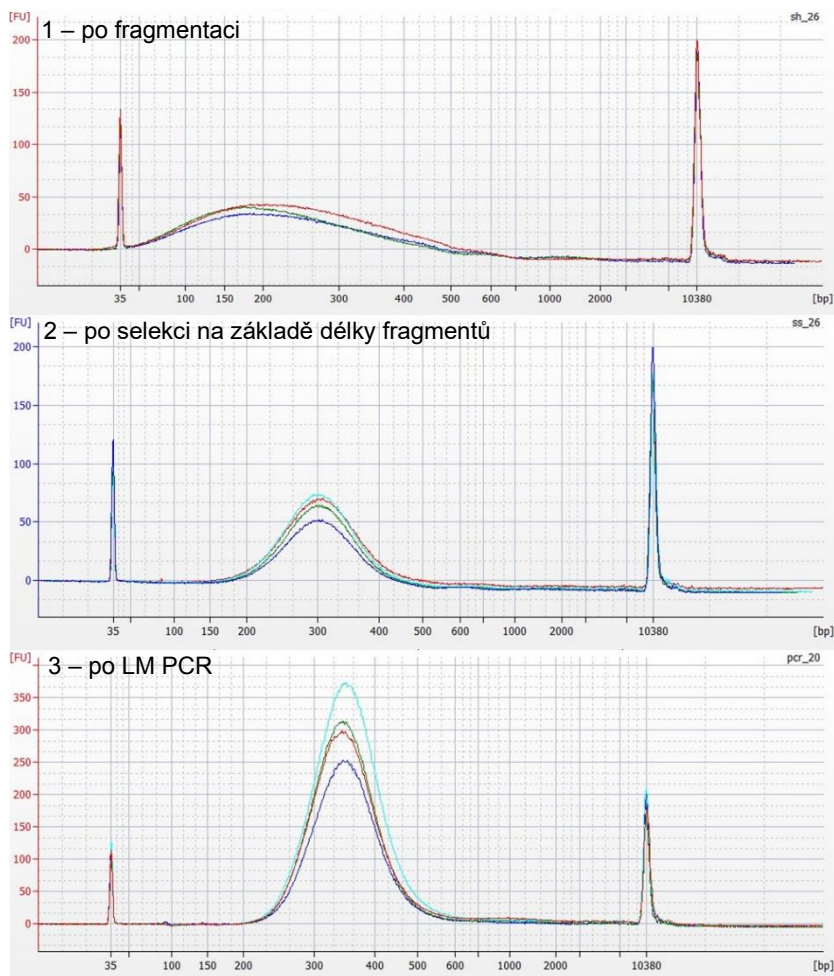
Obr. 4.2: Ukázka čipu pro použití na vysoce citlivou fragmentovou analýzu DNA



Zdroj: <http://www.johnsonbiosignatureslab.com/2016/12/06/ant6/>

Pokud byly kroky v rámci přípravy knihovny provedeny správně, měla by se průměrná délka fragmentů pohybovat přibližně okolo 200 bp po fragmentaci, 300 bp po selekci na základě délky a 350 bp po LM PCR. Zároveň by se měl rozptyl délek fragmentů v průběhu jednotlivých fází přípravy knihovny postupně snižovat (obr. 4.3).

Obr. 4.3: Ukázka chromatogramů z analýzy délky fragmentů na přístroji 2100 Bioanalyzer



Píky 35 a 10380 bp představují kontrolní markery.

Hybridizace s panelem CZEKANCA verze 1.2, zachycení cílových sekvencí

Po usušení bylo k připravované knihovně přidáno 7,5 µl hybridizačního pufru a 3 µl Hybridization Component A ze sady NimbleGen SeqCap® EZ Hybridization and Wash Kit. Směs byla důkladně promíchána a následně vložena na 10 minut do termobloku vyhřátého na 95 °C, aby došlo k denuraci DNA. Poté byl veškerý objem přenesen do zkumavky s rozmraženým panelem CZEKANCA verze 1.2. Promíchaná směs byla vložena do termocyklu vyhřátého na 47 °C (víko předeřáté na 57 °C), ve kterém hybridizace fragmentů se sondami panelu probíhala po dobu 16 hodin (max. 72 h).

Fragmenty hybridizované se sondami byly z roztoku izolovány pomocí biotin-streptavidinové interakce – sondy panelu CZEKANCA v.1.2 jsou značeny biotinem, což umožňuje izolovat cílové sekvence z roztoku pomocí paramagnetických kuliček potažených streptavidinem (Dynabeads® M-270 Streptavidin). Pro očištění kuliček před použitím a následné omývání kuliček s navázanými fragmenty byly použity omývací pufrы ze sady NimbleGen SeqCap® EZ Hybridization and Wash Kit (příprava podle tab. 4.9, přičemž některé pufrы se musí před použitím nechat vytemperovat na teplotu 47 °C).

Tab. 4.9: Složení omývacích pufrů

Pufr	Složení (µl)
Wash Buffer I ¹	270 µl sterilní H ₂ O + 30 µl 10× WB I
Wash Buffer II	180 µl sterilní H ₂ O + 20 µl 10× WB II
Wash Buffer III	180 µl sterilní H ₂ O + 20 µl 10× WB III
Stringent Wash Buffer ²	360 µl sterilní H ₂ O + 40 µl 10× Stringent WB
Bead Wash Buffer	300 µl sterilní H ₂ O + 200 µl 2,5× Bead WB

¹ 100 µl pufru zahřívát na 47 °C, zbylých 200 µl uchovat při laboratorní teplotě

² Veškerý objem zahřívát na 47 °C

Nejprve byl ze 100 µl paramagnetických kuliček v 1,5ml LoBind zkumavce umístěné na magnetický stojan odsán supernatant. Následně byly kuličky opláchnuty připraveným Bead WB puforem – resuspendovat kuličky ve 195 µl Bead WB pufru, protřepat, umístit na magnetický stojan a po vyčeření odsát supernatant. Opláchnutí bylo znovu zopakováno dalšími 195 µl Bead WB pufru a napotřetí jen 100 µl Bead WB pufru. Bezprostředně po posledním odsátí supernatantu byla peleta omytých kuliček resuspendována ve veškerém objemu připravované knihovny, která byla doposud umístěna v termocyklu. Po promíchání se směs nechala v termocyklu inkubovat po dobu 45 minut při teplotě 47 °C s tím, že každých 15 minut byla krátce protřepána (celkem 3×).

Po posledním protřepání následovalo omývání kuliček s navázanou knihovnou. Ke kuličkám bylo přidáno 100 µl vyhřátého WB I pufru a veškerý objem byl přenesen do čisté 1,5ml LoBind zkumavky. Stejným způsobem jako v případě počátečního čištění kuliček byl po umístění na magnetický stojan ze zkumavky odstraněn supernatant. Následně byly kuličky dvakrát opláchnuty 200 µl temperovaného String WB pufru, přičemž se směs kuliček a pufru nechala inkubovat na vodní lázni o teplotě 47 °C po dobu 5 minut a teprve poté se pokračovalo s odsátím supernatantu.

V další fázi bylo provedeno omývání knihovny sérií pufrů o laboratorní teplotě – 200 µl pufru WB I (směs třepat 2 min), 200 µl pufru WB II (směs třepat 1 min) a nakonec 200 µl WB III pufru (směs třepat 30 s). Po posledním odsátí supernatantu byla peleta kuliček s navázanou knihovnou resuspendována v 50 µl sterilní vody.

Obohacení knihovny

Pomocí PCR reakce bylo provedeno obohacení knihovny o sekvence zachycené hybridizací s NGS panelem, a to za využití primerů specifických k technickým sekvencím. Složení reakce uvádí tab. 4.10, teplotní program pak znázorňuje tab. 4.11. Obohacení bylo provedeno ve 2 samostatných PCR zkumavkách a po skončení reakce byl veškerý objem z obou zkumavek smíchán v jedné 1,5ml LoBind zkumavce. Tento postup byl navržen ke zvýšení efektivity PCR reakce.

Tab. 4.10: Složení PCR reakce pro obohacení NGS knihovny

Chemikálie	1×V (µl)
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25
Směs popředních a zpětných primerů	5
NGS knihovna před obohacením	20
<i>Celkový objem</i>	<i>50</i>

Tab. 4.11: Teplotní program PCR reakce pro obohacení knihovny

Krok	Teplota (°C)	Doba	Počet opakování
Počáteční denaturace	98	45 s	-
Denaturace	98	15 s	
Nasednutí primerů	60	40 s	10–12×
Elongace	72	30 s	
Závěrečná elongace	72	1 min	-
Chlazení	4	∞	-

K obohacené knihovně bylo přidáno 180 µl vytemperovaných kuliček Agencourt® AMPure XP (teplota ± 24 °C). Směs se nechala inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 5 minut a poté byl ze zkumavky umístěné na magnetický stojan odstraněn supernatant.

Následovalo přečištění kuliček 80% ethanolem a resuspendování v 52 μ l sterilní vody. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 2 minut, aby došlo k uvolnění knihovny z kuliček. Po umístění na magnetický stojan a vyčeření roztoku bylo 50 μ l supernatantu přemístěno do čisté finální 1,5ml LoBind zkumavky (dobře popsané pro delší uskladnění v mrazáku). Než se vzorek uskladnil byly ještě 2 \times 2 μ l knihovny použity pro kvantifikaci na přístroji Qubit™ a 5 μ l ke kontrole obohacení knihovny pomocí kvantitativní PCR (qPCR).

Fluorimetrická kvantifikace knihovny

Pro finální naředění připravené knihovny pro NGS sekvenaci na Illumina® platformě (MiSeq nebo NextSeq) byla nejprve fluorimetricky změřena její koncentrace pomocí dsDNA HS sady na přístroji Qubit™ (obdobným způsobem jako při měření koncentrace jednotlivých vzorků před jejich poolováním). Tab. 4.12 uvádí složení zásobního roztoku pufru a fluorescenční barvy, kalibračních standardů a samotného analyzovaného vzorku. Koncentrace připraveného roztoku knihovny byla změřena dvakrát a průměrná hodnota pak byla použita pro výsledný výpočet ředění před samotnou sekvenací.

Tab. 4.12: Příprava roztoků pro fluorimetrickou kvantifikaci DNA fragmentů v knihovně

Roztok	Složení
Pufr (zás. roztok)	895,5 μ l Qubit™ dsDNA HS Buffer + 4,5 μ l 200 \times Qubit™ dsDNA HS Reagent
Standard 1 (0 ng/ μ l)	190 μ l obarveného pufru + 10 μ l Qubit™ dsDNA HS Standard #1
Standard 2 (10 ng/ μ l)	190 μ l obarveného pufru + 10 μ l Qubit™ dsDNA HS Standard #2
Knihovna	198 μ l obarveného pufru + 2 μ l knihovny

Kontrola obohacení knihovny pomocí kvantitativní PCR

Před závěrečným naředěním knihovny a sekvenací byl proveden poslední kontrolní krok pro ověření, že se NGS knihovnu podařilo obohatit o oblasti zájmu (dány panelem CZEKANCA v. 1.2). Pomocí qPCR byly sledovány 4 definované oblasti a jejich zastoupení ve vzorcích před hybridizací (knihovna před poolingem vzorků) a po hybridizaci (knihovna před vlastním sekvenováním). Tyto oblasti jsou doporučeny výrobcem sond a pro jednoduchost jsou značeny čísla 37, 47, 68 a 72 (příloha 5). Složení qPCR reakce uvádí tab. 4.13.

Tab. 4.13: Složení qPCR reakce

Chemikálie	1×V (μl)
5× HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix	1,2
DNA (1ng/μl)*	0,4
Sterilní voda	2,4
Směs popředního a zpětného primeru (0,5μM)	2
<i>Celkový objem (μl)</i>	<i>6</i>

* v případě negativní kontroly DNA nahrazena sterilní vodou

Rozložení vzorků v destičce znázorňuje tab. 4.14. Reakce probíhala s celkem 4 různými roztoky DNA (naředěnými na koncentraci 1 ng/μl): $PreN_x$ (směs 4 vzorků před poolováním s co nejpodobnější koncentrací), $PreN_{x-1}$ (stejným způsobem připravená směs vzorků z předchozího sekvenačního běhu), $PostN_x$ (obohacená NGS knihovna), $PostN_{x-1}$ (obohacená NGS knihovna z předchozího sekvenačního běhu). Poslední řada v PCR destičce pak připadá negativní kontrole. Pro každý pár primerů byla reakce provedena v duplikátech. Teplotní program qPCR reakce v cykleru (LightCycler 480, Roche) uvádí tab. 4.15.

Tab. 4.14: Schéma přípravy reakčních směsí pro qPCR kvantifikaci vzorků sekvenačních knihoven

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	37-PreN _{x-1}	47-PreN _{x-1}	68-PreN _{x-1}	72-PreN _{x-1}	37-PreN _{x-1}	47-PreN _{x-1}	68-PreN _{x-1}	72-PreN _{x-1}
B	37-PostN _{x-1}	47-PostN _{x-1}	68-PostN _{x-1}	72-PostN _{x-1}	37-Post _{x-1}	47-PostN _{x-1}	68-PostN _{x-1}	72-PostN _{x-1}
C	37-PreN _x	47-PreN _x	68-PreN _x	72-PreN _x	37-PreN _x	47-PreN _x	68-PreN _x	72-PreN _x
D	37-PostN _x	47-PostN _x	68-PostN _x	72-PostN _x	37-PostN _x	47-PostN _x	68-PostN _x	72-PostN _x
NK	37-NK	47-NK	68-NK	72-NK	37-NK	47-NK	68-NK	72-NK

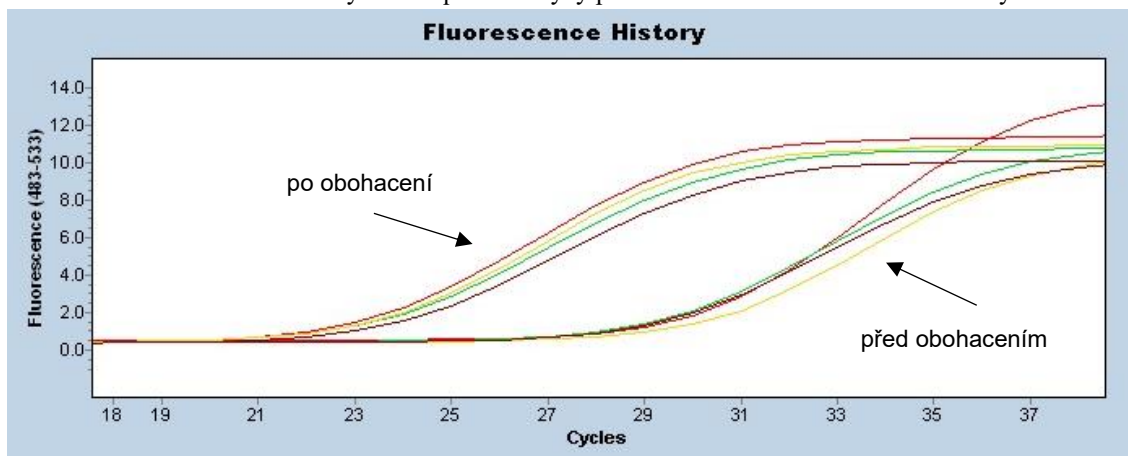
Čísla 37, 47, 68 a 72 označují jednotlivé směsi primerů. Označení „Pre“ a „Post“ vyjadřuje stav NGS knihovny před, resp. po obohacení. „N_{x-1}“ představuje číselné označení knihovny z předchozího sekvenačního běhu, zatímco „N_x“ označuje knihovnu připravovanou v daném sekvenačním běhu. Zkratka NK značí negativní kontrolu.

Tab. 4.15: Teplotní program qPCR reakce

Krok	Teplota (°C)	Doba	Počet opakování
Aktivace polymerázy	95	15 min	-
Denaturace	95	15 s	
Nasednutí primerů	60	25 s	45x
Elongace	72	15 s	
Denaturace	95	5 s	-
Analýza křivek tání	72 → 95		-

Správně obohacená knihovna má vyšší zastoupení cílových oblastí. DNA z obou fází přípravy (před a po hybridizaci) je naředěná na stejnou koncentraci, a proto by měl rozdíl hodnot C_t ukázat, jak moc se podařilo zvýšit zastoupení žádaných oblastí. Pro správně připravenou knihovnu je akceptován rozdíl hodnot C_t o 7–10 cyklů (viz obr. 4.4)

Obr. 4.4: Ukázka výsledků qPCR analýzy pro kontrolu obohacení NGS knihovny



V důsledku obohacení NGS knihovny došlo ke snížení počtu cyklů nutných k překročení meze detekce.

Denaturace a finální ředění knihovny před sekvenací

Před zahájením masivního paralelního sekvenování je vždy nutné samotnou knihovnu zdenaturovat (pomocí NaOH) a naředit (pomocí vody a HT pufru – sloučeniny dodávané výrobcem spolu se sekvenačními kity). Pro sekvenování na platformě MiSeq se knihovna ředí na hodnotu 14pM, u platformy NextSeq se knihovna ředí na 1,5pM. Následující postup se týká sekvenování na platformě MiSeq. U knihovny sekvenované na platformě NextSeq probíhá postup analogicky s drobnými odchylkami.

Hmotnostní koncentrace knihovny, získaná pomocí fluorimetrie na přístroji Qubit™, byla přepočtena na molární koncentraci s tím, že v úvahu byla brána průměrná délka fragmentů knihovny 355 bp ($c = \rho / (660 \cdot 355) \cdot 10^6$ [nM]). Knihovna byla nejprve naředěna na koncentraci 4 nM do celkového objemu 10 μ l (k naředění lze použít sterilní vodu nebo 10mM pufr Tris-HCl, pH 8,5 s 0,1% Tween 20). Takto naředěná knihovna byla denaturována 10 μ l 0,2N roztoku NaOH (nechat inkubovat po dobu 5 minut při laboratorní teplotě). Poté bylo 7 μ l denaturované knihovny naředěno na koncentraci 14 pM pomocí 993 μ l HT1 hybridizačního pufru (HT1 Hybridization Buffer, Illumina®).

Do druhé zkumavky byl připraven 4nM roztok kontrolní knihovny PhiX Control v3 Library (knihovna odvozená z genomu bakteriofága PhiX, která slouží ke kontrole kvality sekvenování a zároveň usnadňuje tvorbu klastrů DNA fragmentů na čipu). Stejně jako v případě NGS knihovny byl roztok denaturován 0,2N roztokem NaOH v poměru objemů 1:1 (standardně 0,5 + 0,5 μ l) a naředěn na koncentraci 14 pM pomocí HT1 hybridizačního pufru.

Závěrečným krokem bylo smíchání 980 µl 14pM knihovny a 20 µl 14pM roztoku PhiX (tedy 2% zastoupení PhiX). Takto připravená knihovna byla přenesena na ledové tříšti na pracoviště disponující daným sekvenátorem (MiSeq – Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu VFN, NextSeq – Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN).

4.4.2 Sekvenace

Samotný proces sekvenování na platformách MiSeq či NextSeq je zcela v kompetenci vyškoleného personálu daného pracoviště. Výstupem jsou datové soubory, které jsou pro definované uživatele dostupné ke stažení z cloudového prostředí BaseSpace (Illumina®).

4.4.3 Analýza sekvenačních dat

Analýza sekvenačních dat byla provedena standardizovaným způsobem podle nastavení zavedeného zkušenou bioinformatičkou Mgr. Petrou Zemánkovou. Analýza kvality dat probíhala v cloudovém prostředí BaseSpace na základě metrik a grafů informujících o hustotě sekvenovaných úseků, celkovém objemu sekvenačních dat, či zastoupení objemu dat jednotlivých pacientů/indexů v daném běhu.

Pro další hodnocení byla přípustná pouze data dosahující *výtěžku* 3,3–3,8 Gb/MiSeq, resp. 16–19 Gb/NextSeq, *počtu čtení* (pair-end) 44–50 milionů/MiSeq, resp. až 260 milionů/NextSeq. Další hodnotící parametr kvality pak představuje tzv. *Q30 hodnota* (Phred quality score), která udává pravděpodobnost špatně odečteného nukleotidu na úrovni 1 nukleotidu z 1000 – tedy kolik % z celkového objemu získaných NGS dat je správně technicky odečteno na hladině 99,9% přesnosti. U tohoto parametru bylo hodnoceno, zda Q30 dosahuje alespoň 85 %/MiSeq, resp. více než 75 %/NextSeq.

Pomocí nastavených pipeline byla hrubá NGS data upravena a následně mapována k referenčnímu genomu hg19 (alias GRCH37 – Genome Reference Consortium Human Build 37, vydaný v roce 2009) vymezeného souborem genů panelu CZECANCA v.1.2 (tzv. soubor *.BED). DNA varianty lišící se od reference jsou evidovány v souboru *.vcf a následně anotovány programem SnpEff (Cingolani et al. 2012). Každé odlišnosti je přitom přidělena informace z dostupných databází týkající se popisu varianty, její četnosti v populacích, případně také její patogenity (ClinVar – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, LOVD – <http://www.lovd.nl/3.0/home>, HGMD® – <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/validate.php> atd.).

Pro finální vyhodnocení dat je nutná prioritizace variant, která sníží počet všech variant pouze na ty, které mají největší váhu pro interpretaci souvislosti mezi genetickým profilem a klinickým obrazem pacienta. Tento proces probíhal na 3 úrovních:

1. Jednonukleotidové varianty (SNV z angl. single nucleotide variant), krátké inserce a delece
2. Středně dlouhé a dlouhé delece, středně dlouhé inserce – pomocí algoritmu Pindel
3. CNV varianty

Jednonukleotidové varianty, krátké inserce a delece

Analýza NGS dat na této úrovni vygenerovala největší počet variant v přepočtu na jednoho pacienta – v průměru zhruba 1500 variant/226 genů. Na data byl dále aplikován filtr, který se týkal několika kritérií:

- *Oblast* – s výjimkou genů *APC* a *MUTYH* byly analyzovány pouze varianty uvnitř exonů a v oblasti sestřihu. V případě genů *APC* a *MUTYH* byly analyzovány varianty ve všech sekvenovaných oblastech – oblast promotoru a jednotlivých exonů transkripční varianty NM_000038.6, resp. NM_001128425 + jejich okolí.
- *Frekvence v populaci* (1000 Genome Project, verze z roku 2015) – na základě definice mutací a polymorfismů byly odfiltrovány varianty s frekvencí výskytu v populaci větší než 0,01.
- *Patogenita* – odfiltrovány byly varianty, které jsou na základě údajů v databázi ClinVar (verze z roku 2017) jednoznačně benigní (velký podíl variant však v této verzi databáze nebyl obsažen).
- *Frekvence v sekvenačním běhu* – bylo předpokládáno, že varianta, která se v rámci jednoho sekvenačního běhu objevila u 6 a více pacientů, pravděpodobně nebude patogenní.

Po aplikování filtru na každého pacienta zůstalo v průměru 14 variant, u kterých byl klinický význam postiženého genu a patogenita varianty posouzeny na základě údajů v aktuálních verzích databází HGMD®, ClinVar, VarSome a odborných publikacích. Souvislost varianty s predispozicí pro rozvoj daného onemocnění je v těchto databázích vyjádřena na základě ACMG systému klasifikace (klasifikace podle amerických institucí American College of Genetics and Genomics a Association for Molecular Pathology), podle které se varianty rozdělují do 5 základních tříd (tab. 4.16).

Tab. 4.16: Klasifikace genetických variant podle ACMG (Richards et al. 2015, Plon et al. 2008)

Třída	Pravděpodobnost patogenicity (%)
1 – benigní	<0,1
2 – pravděpodobně benigní (likely benign)	0,1–4,9
3 – nejasný význam (uncertain significance)	5–94,9
4 – pravděpodobně patogenní (likely pathogenic)	95–99
5 – patogenní (pathogenic)	>99

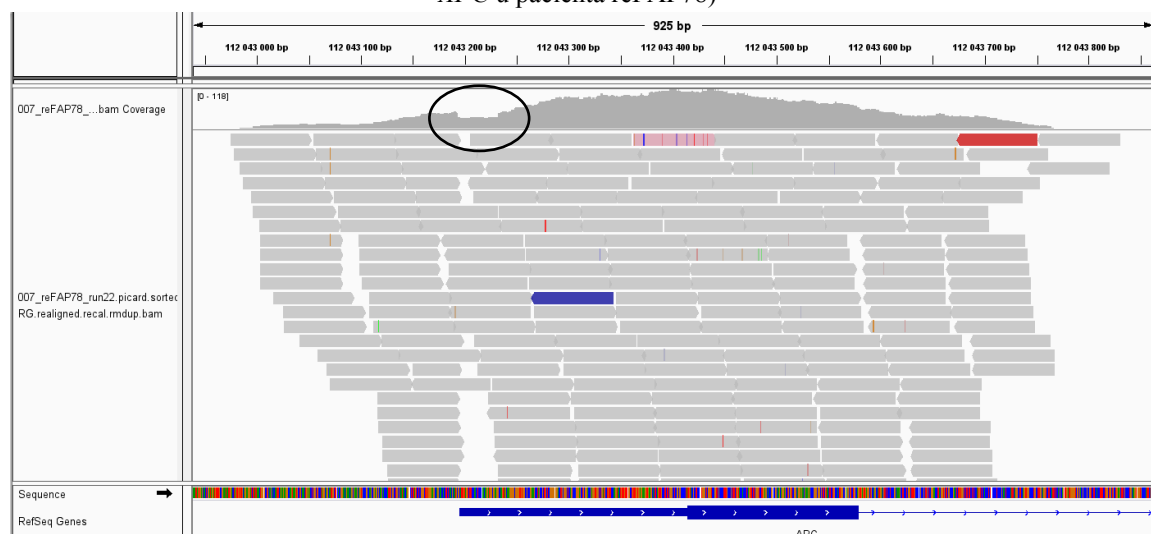
Pindel

Algoritmus programu Pindel umožňuje identifikovat střední a dlouhé delece (až 10 kbp) a středně dlouhé inserce (do 20 bp) (Ye et al. 2009). Výstupní data pak byla přefiltrována na základě počtu čtení mutované sekvence, který musel být roven nebo větší 25 (uměle určená hranice, která odpovídá heterozygotnímu stavu při pokrytí genu 50×). Ze seznamu variant tak byly odstraněny případné sekvenační chyby. Následně byly vybrány pouze varianty nacházející se v klinicky významných genech a jejich přítomnost byla ověřena vizuálně pomocí softwaru IGV (Broad Institute).

Variabilita počtu kopií

CNV analýza umožňuje zachytit delece a amplifikace dlouhého rozsahu na základě odchylky pokrytí analyzovaných sekvencí oproti průměrnému pokrytí všech sekvencí daného sekvenačního běhu. Ve filtračním kroku byly vybrány pouze sekvence s rozdílem pokrytí $\geq 0,45$ (případné duplikace), nebo $\leq -0,6$ (případné delece). Výskyt mutací v klinicky významných genech pak byl opět ověřen vizuálně v softwaru IGV (příklad na obr. 4.5).

Obr. 4.5: Příklad zobrazení CNV varianty pomocí softwaru IGV (zde delece v promotoru 1B v genu *APC* u pacienta reFAP78)



4.4.4 Konfirmace

a) Modifikovaná metoda Sangerova sekvenování

PCR amplifikace vybraných úseků

Složení reakce pro amplifikaci vybraných úseků DNA obsahujících patogenní variantu zachycenou pomocí NGS uvádí tab. 4.17, teplotní program reakce pak tab. 4.18. Seznam použitých primerů obsahuje

příloha 6.

Pro optimalizaci teploty nasedání primerů byla před samotnou amplifikací cílových úseků provedena PCR reakce v teplotním gradientu, při které se teplota ve fázi nasedání primerů pohybovala v rozmezí 50–65 °C (konkrétní rozmezí teplot voleno v závislosti na výrobcem uvedené teplotě tání primerů).

Tab. 4.17: Složení PCR reakce

Chemikálie	1×V (μl)
Sterilní H ₂ O	3
Combi PPP Master Mix (2×)	5
Popřední primer (10 μmol/l)	0,5
Zpětný primer (10 μmol/l)	0,5
DNA (max. 100 ng/μl)	1
<i>Celkový objem (μl)</i>	<i>10</i>

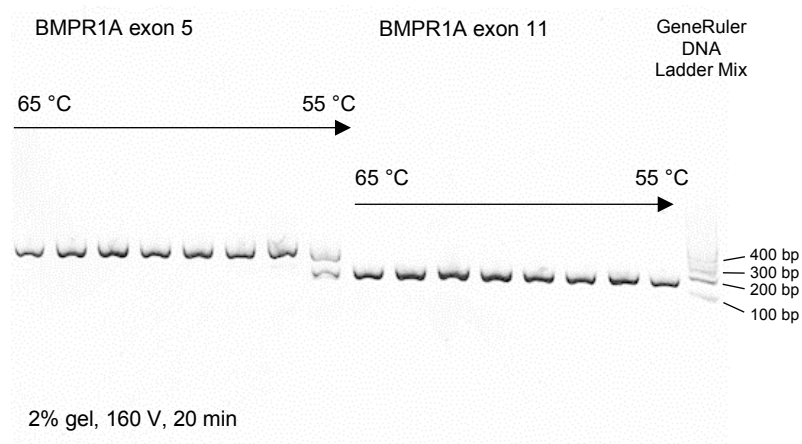
Tab. 4.18: Teplotní program PCR reakce

Krok	Teplota (°C)	Doba	Počet opakování
Aktivace polymerázy	95	10 min	-
Denaturace	95	30 s	-
Nasednutí primerů	50–64	30 s	40x
Elongace	72	30 s	-
Závěrečná elongace	72	7 min	-
Chlazení	20	∞	-

Agarózová elektroforéza

Přítomnost PCR produktů, účinnost a specifita amplifikace byly ověřeny horizontální elektroforézou v 2% agarózovém gelu (standardně 4 μl DNA na vzorek) při konstantním napětí 120 až 160 V po dobu 20 až 30 minut. Výsledky byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (gelový dokumentační systém E-BOX, Vilber) (příklad na obr. 4.6).

Obr. 4.6: Elektroforegram po PCR v teplotním gradientu (optimalizace teploty nasedání primerů)



Přečištění PCR produktů a sekvenční reakce

Pro samotnou sekvenční reakci byly PCR produkty nejprve enzymaticky očištěny od přebývajících primerů a nukleotidů (tab. 4.19 a tab. 4.20).

Tab. 4.19: Složení reakce enzymatického čištění PCR produktů

Chemikálie	1×V (μl)
Sterilní H ₂ O	1,2
PCR produkt	1
ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	0,6
<i>Celkový objem (μl)</i>	<i>2,8</i>

Tab. 4.20: Teplotní program enzymatického čištění PCR produktů

Teplota (°C)	Doba
37	15 min
80	15 min
20	∞

Teprve přečištěné PCR produkty bylo možné použít pro sekvenční reakci (tab. 4.21 a tab. 4.22).

Tab. 4.21: Složení sekvenční reakce

Chemikálie	1×V (μl)
Sterilní H ₂ O	0,8
5× BigDye™ Terminator Sequencing Buffer	1
primer (popřední nebo zpětný)	0,2
BigDye™ Reaction Mix	0,4
Přečištěný PCR produkt	2,8
<i>Celkový objem (μl)</i>	<i>5,2</i>

Tab. 4.22: Teplotní program sekvenační reakce

Teplota (°C)	Doba	Počet opakování
96	3 min	-
96	10 s	
50	5 s	30x
60	4 min	
20	∞	-

Ethanol-acetátová precipitace a sekvenace

Vzniklé fluorescenčně značené produkty byly před analýzou pomocí kapilární elektroforézy přečištěny ethanol-acetátovou precipitací (tab. 4.23). Přečištěné produkty byly analyzovány na přístroji SeqStudio Genetic Analyzer, případně 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), který obsluhuje proškolený personál laboratoře (Markéta Děkanovská, ÚBLG 1.LF UK a VFN). Vyhodnocení sekvenačních dat bylo provedeno pomocí softwaru BioEdit.

Tab. 4.23: Ethanol-acetátová precipitace fragmentů vzniklých reakcí modifikovaného Sangerova sekvenování

Krok/přídavek chemikálie	1×V (μl)	Počet opakování
0,125M EDTA	1,3	-
Ethanol-acetátová směs: 0,12M acetát sodný v 96 % (v/v) ethanolu	30	-
Inkubace (laboratorní teplota, 10–15 min)	-	-
Centrifugace (lab. teplota, 14 100×g, 30 min)	-	-
Odstranit supernatant	-	-
70% (v/v) ethanol	60	
Centrifugace (lab. teplota, 14 100×g, 10 min)	-	2×
Odstranit supernatant	-	-
Vysušení (95 °C, 5–10 min)	-	-
Formamid	30	-
Denaturace (95 °C, 5 min)	-	-
Prudké zmražení (-15 °C)	-	-

b) MLPA analýza

Pro analýzu DNA pacientů pomocí metody MLPA byla využita komerční směs sond SALSA® MLPA® Probemix P043-E1 APC (MRC Holland), která kromě genu *APC* (celkem 29 sond) umožňuje vyšetřit také nejčastější mutace v genu *MUTYH* (6 sond) a *GREM1* (2 sondy).

Vzhledem k obtížné CNV analýze genu *PMS2* (gen pro protein postmeiotické segregace 2) z důvodu přítomnosti vysoce homologních pseudogenů byla u všech pacientů, u kterých nebyla nalezena žádná klinicky významná varianta, provedena také MLPA analýza tohoto genu pomocí komerční směsi sond SALSA® MLPA® Probemix P008-C1 PMS2 (MRC Holland). Gen *PMS2* se metodou MLPA standardně vyšetřuje u pacientů s podezřením na Lynchův syndrom, který představuje jednu z dalších forem

predispozice k tvorbě CC/RC, běžně však bez čtených kolorektálních polypů. V případě re-analýzy FAP suspektních pacientů byla nicméně provedena s cílem zachytit co nejvíce možných variant, které by rozvoj kolorektálních polypóz mohly způsobit.

Standardně bylo v rámci jedné reakce analyzováno 50–200 ng DNA (koncentrace DNA ve vzorcích změřena na přístroji Nanodrop a poté upravena pomocí low TE pufru). Při každém běhu byly spolu se vzorky analyzovány alespoň 2 kontrolní vzorky (zdraví jedinci). Složení jednotlivých reakčních směsí a teplotní program analýzy uvádí tab. 4.24 a tab. 4.25.

Tab. 4.24: Složení reakčních směsí jednotlivých kroků v metodě MLPA

Chemikálie	1×V (μl)
Hybridizace sond	
DNA	2,5
SALSA MLPA Buffer	0,75
SALSA Probe-mix	0,75
<i>Celkový objem</i>	<i>5</i>
Ligace sond	
DNA + hybridizované sondy	5
Sterilní voda	12,5
SALSA Ligase-65 Buffer A	1,5
SALSA Ligase-65 Buffer B	1,5
SALSA Ligase-65	0,5
<i>Celkový objem</i>	<i>21</i>
PCR amplifikace	
DNA + sondy	21
Sterilní voda	3,75
SALSA PCR primers	1
SALSA polymerase	0,25
<i>Celkový objem (μl)</i>	<i>26</i>

Tab. 4.25: Teplotní program v rámci MLPA analýzy (MyCYCLER system, gradient-ENAB, KR2)

Krok	Teplota (°C)	Doba	Počet opakování
Denaturace DNA			
Denaturace	98	5 min	-
Chlazení	25	∞	-
Hybridizace sond			
Denaturace	95	1 min	-
Hybridizace	60	16–20 h	-
Ligační reakce			
Chlazení	54	∞	-
Ligace	54	15 min	-
Denaturace	98	5 min	-
Chlazení	20	∞	-
PCR reakce			
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	60	30 s	35×
Elongace	72	60 s	
Závěrečná elongace	72	20 min	-
Chlazení	15	∞	-

Vzniklé fragmenty byly analyzovány na přístroji 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Markéta Děkanovská, ÚBLG 1.LF UK a VFN). Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí softwaru Coffalyser.Net (MRC Holland).

c) Long-range PCR

LR PCR reakce

V případě konfirmací některých nalezených variant bylo zapotřebí připravit amplikony rozsáhlejší délky (2000–10 000bp). Laboratoř má nejlepší zkušenosti s polymerázou PrimeSTAR® GXL (Takara Bio). Složení a teplotní program LR PCR reakce uvádí tab. 4.26 a tab. 4.27.

Tab. 4.26: Složení LR PCR reakce

Chemikálie	1×V (μl)
Sterilní H ₂ O	3,06
5× PrimeSTAR® GXL Buffer	1
dNTPs	0,4
Popřední primer (F)	0,12
Zpětný primer (R)	0,12
PrimeSTAR® GXL Polymerase (1,25 U/μl)	0,1
DNA	0,3
<i>Celkový objem (μl)</i>	<i>5,1</i>

Tab. 4.27: Teplotní program LR PCR reakce

Krok	Teplota (°C)	Doba	Počet opakování
Počáteční denaturace	98	1 min	-
Denaturace	98	10 s	-
Nasednutí primerů	50–64	15 s	32×
Elongace	68	1 min/kb	-
Závěrečná elongace	72	10 min	-
Chlazení	20	∞	-

Agarózová elektroforéza dlouhých amplikonů

Kontrola přítomnosti a délky vzniklých fragmentů byla provedena pomocí horizontální elektroforézy v 0,5% agarózovém gelu, na který bylo standardně nanášeno 5 μl zředěného PCR produktu ve směsi s nanášecí barvou – 1 μl produktu + 2 μl sterilní H₂O + 1 μl nanášecí barvy (směs 0,04% bromfenolové modře a 40% sacharózy v H₂O). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 160 V po dobu až 2 hodin (v závislosti na délce vznikajících fragmentů a požadavků na rozlišení). Výsledky byly vizualizovány pomocí transiluminátoru (gelový dokumentační systém E-BOX, Vilber).

Izolace fragmentů z gelu a sekvenace

Separované amplikony DNA byly z agarózového gelu izolovány pomocí sady S.N.A.P.TM Gel Purification Kit postupem, který popisuje tab. 4.28. Izolovaná DNA byla následně osekvenována modifikovanou metodou Sangerova sekvenování stejným způsobem jako bylo uvedeno výše, s výjimkou, že sekvenační reakci v tomto případě již nepředcházelo přečištění PCR produktu (reakce tedy probíhaly podle tab. 4.21 až tab. 4.23).

Tab. 4.28: Postup izolace DNA z agarózového gelu

Krok/přídavek chemikálie	1×V (μl)	Počet opakování
1. Rozpuštění gelu		
6,6M jodid sodný	2,5× objem gelu	-
Inkubace (42 až 50 °C, cca 5 min)	-	-
2. Izolace DNA		
Binding Buffer	1,5× objem roztoku	-
Centrifugace ve zkumavce s kolonkou (lab. teplota, 2 000 až 3 000 ×g, 30 s)	-	3×
Odstranit supernatant	-	-
1× Final Wash	400	-
Centrifugace ve zkumavce s kolonkou (lab. teplota, 2 000 až 3 000 ×g, 30 s)	-	2×
Odstranit supernatant	(800)	-
Centrifugace ve zkumavce s kolonkou (lab. teplota, >10 000 ×g, >1 min)	-	-
Přenést kolonku do čisté zkumavky	-	-
Sterilní H ₂ O	40	-
Inkubace (lab. teplota, 1 min)	-	-
Centrifugace ve zkumavce s kolonkou (lab. teplota, >10 000 ×g, >1 min)	-	-
Uchovat supernatant	-	-

5. Výsledky

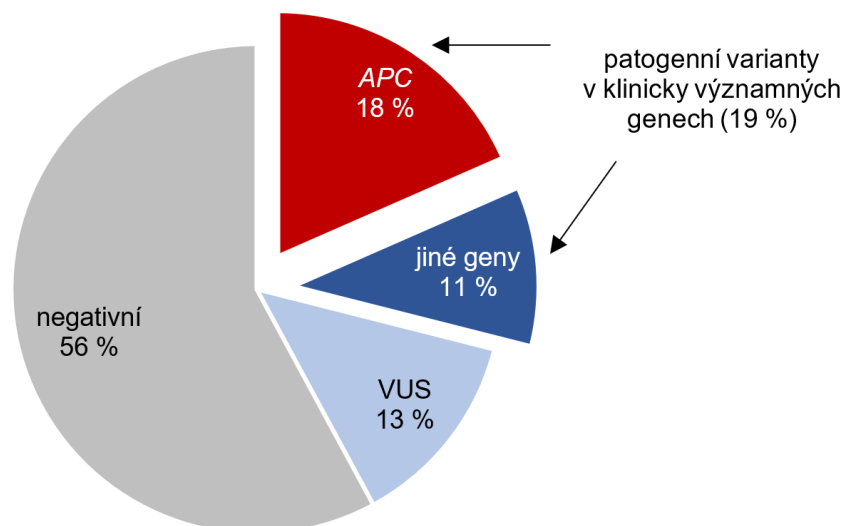
V rámci diplomové práce bylo metodou NGS na platformách MiSeq a NextSeq (Illumina®) re-analizováno 78 vzorků DNA probandů ze souboru suspektních FAP/AFAP probandů laboratoře molekulární genetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN (76 nemocných + 2 zdravé osoby s pozitivní rodinnou anamnézou suspektní FAP). Pro větší přehlednost budou dále v textu jedinci ze skupiny 76 nemocných označováni jako „pacienti“, zatímco skupina všech 78 re-analizovaných jedinců nazývána jako „probandi“.

K obohacení NGS knihovny o cílové sekvence byl využit multigenový panel CZEKANCA v1.2, který umožňuje vyšetřit zejména exony a intron-exonové oblasti celkem 226 genů souvisejících s nádorovou predispozicí, včetně CC/RC. Vzhledem k omezené laboratorní a přístrojové kapacitě z důvodu běžného klinického provozu diagnostických laboratoří VFN byly vzorky pomocí NGS analyzovány celkem v 11 sekvenačních bězích (10× MiSeq, 1× NextSeq).

Až na výjimky, kdy vzorky obsahovaly extrémně nízké množství DNA (vzorky vyřazené z re-analýzy), stáří vzorků (16 až 27 let) analýzu pomocí NGS nijak negativně neovlivnilo. Hodnocení kvality vždy splnilo nastavené parametry a umožnilo následně mapování k referenčnímu genomu hg19. Data umožnila hodnotit jak jednobodové záměny (SNV), tak inserce či delece krátkého (do cca 20bp) i dlouhého rozsahu (CNV – více než 20bp až celo-exonové delece či duplikace).

Z celkového počtu 78 re-analizovaných probandů se u 22 pacientů podařilo patogenní variantu v genu *APC* ($n = 14$), nebo jiném genu relevantním pro diagnostiku kolorektálních polypóz ($n = 8$). U dalších 10 pacientů byly detekovány varianty s nejasným klinickým významem (VUS) v genech hrajících roli v tvorbě kolorektálních polypů a/nebo CC/RC. U některých pacientů bylo přitom současně reportováno více variant. U zbylých 46 probandů (44 pacientů + 2 zdraví probandi) se žádnou patogenní či potenciálně patogenní variantu nalézt nepodařilo. Souhrnný výsledek re-analýzy, zahrnující 76 pacientů, znázorňuje graf 5.1.

Graf 5.1: Souhrnný výsledek re-analýzy FAP suspektních pacientů metodou NGS



VUS – varianta s nejasným klinickým významem

Z celkem 14 zachycených patogenních variant v genu *APC* byly u pacientů detekovány krátké frameshift delece ($n = 5$), nonsense mutace ($n = 3$), delece delšího rozsahu v oblasti promotoru 1B ($n = 2$), sestříhové mutace ($n = 2$), duplikace delšího rozsahu ($n = 1$), krátká frameshift inserce ($n = 1$).

Zatímco v minulosti využití metody molekulární diagnostiky FAP onemocnění spočívaly pouze v analýze genů *APC* a *MUTYH*, metoda NGS v rámci re-analýzy umožnila vyšetřit více klinicky významných genů současně. Patogenní variantu v některém z genů souvisejících s tvorbou kolorektálních polypů a zvýšenou predispozicí k tvorbě CC/RC se tak podařilo zachytit u 8 re-analyzovaných pacientů, konkrétně v genech *BMPRIA* ($n = 2$), *MSH2* ($n = 1$), *PTEN* ($n = 1$), *SMAD4* ($n = 2$) a *STK11* ($n = 2$).

Podstatnou část detekovaných variant tvoří VUS varianty (třída 3 podle ACMG klasifikace) v genech klinicky souvisejících s různými formami zvýšené predispozice k tvorbě CC/RC. V případě patogenních variant v genech *EXO1* (reFAP031), *CHEK2* (reFAP182, příp. i reFAP008) a *TP53* (pacient reFAP114) se sice nejedná o VUS varianty, nicméně klinický význam těchto genů v souvislosti s predispozicí k CC/RC není zcela jednoznačný, a proto byly reportovány spolu s VUS variantami.

Metoda NGS dále umožnila u 4 re-analyzovaných pacientů detekovat a reportovat farmakogeneticky významnou variantu NM_000110(*DPYD*):c.1236G>A (p.Glu412=) související s metabolismem cytostatik na bázi 5-fluorouracilu využívaných pro chemoterapii solidních nádorů (Amstutz et al. 2018).

Podrobný přehled výsledků re-analýzy uvádí tab. 5.1.

Tab. 5.1: Přehled výsledků re-analýzy (1)

Číslo probanda	Věk	Susp. diagnóza	Klinická data	Nález	ACMG klasifikace	Reference
Patogenní varianty v genu APC:						
refAP119	43	FAP	polypóza, po totální proktokolektomii, RA+ (sestra)	APC: delece promotoru 1B chr5:(?_112043414)_(112043579_?)del	?	-
refAP078	36	-	ca kolorekta, primární polypóza, osteomy	APC:delece promotoru 1B chr5:?112043195_?112043232del37	?	-
refAP117	17	FAP	ve 2 letech hepatoblastom, v 17 letech čttná polypóza	NM_000038(APC):c.549_558del (p.Asp183GlufsTer19)	VarSome: 5	nepublikovaná varianta
refAP138	44	FAP	polypóza, ca ovaria, RA+ (dcera)	NM_000038(APC):c.1312+5G>A	HGMD: 4, ClinVar: 5, VarSome: 4	Aretz et al. (2004), Schwarzwová et al. (2013)
refAP001	30	-	polypóza, RA+ (2 sourozenci a všechny ze 4 jejich dětí)	NM_000038(APC):c.1620dup (p.Gln541ThrfsTer19)	HGMD: 5, ClinVar: 5, VarSome: 5	Lagarde et al. (2010)
refAP175	43	-	stovky polypů, RA+ (oba sourozenci polypy, otec probanda CC/RC)	APC: duplikace exonu 15 chr5:(?_112170647)_(112170862_?)dup	?	-
refAP059	25	-	polypóza, RA+ (otec, bratr)	NM_000038(APC):c.C1956C>T (p.His652=)	HGMD: 5, ClinVar: 4/5, VarSome: 4	Aretz et al. (2004), Schwarzwová et al. (2013)
refAP100	33	FAP	polypóza s maligním zvratem, RA+ (matka a matematická dědeček, oba zemřeli mladi)	NM_000038(APC):c.2107del (p.Ala703GlnfsTer15)	ClinVar: 5, VarSome: 5	Friedl and Aretz (2005)
refAP003	32	-	polypóza	NM_000038(APC):c.2299C>T (p.Gln767Ter)	HGMD: 5, ClinVar: 5, VarSome: 5	Jirásek et al. (1997), Aceto et al. (2005)
refAP008	40	-	polypóza	NM_000038(APC):c.2299C>T (p.Gln767Ter)	HGMD: 5, ClinVar: 5, VarSome: 5	Jirásek et al. (1997), Aceto et al. (2005)
refAP479	55	-	polypóza	NM_000038(APC):c.4079del (p.Ser1360PhefsTer55)	VarSome: 5	nepublikovaná varianta
refAP110	53	-	asi 100 polypů v tračníku, okultní krvácení v 50 letech, RA+ (otec CC/RC, smrt ve 39 letech)	NM_000038(APC):c.5826_5829del (p.Asp1942GlufsTer27)	ClinVar: 5, VarSome: 5	Scott et al. (1996), Lamlum et al. (2000), Bisgaard et al. (2004), Vieira et al. (2015)
refAP172	25	-	mnohočetná polypóza do 5 mm žaludku ve věku 12–15 let	NM_000038(APC):c.5826_5829del (p.Asp1942GlufsTer27)	ClinVar: 5, VarSome: 5	Scott et al. (1996), Lamlum et al. (2000), Bisgaard et al. (2004), Vieira et al. (2015)
refAP130	55	-	četná polypóza, hemikolektomie, RA+ (3 děti, bratr malignizovaný polyp střeva)	NM_000038(APC):c.7915G>T (p.Glu2639Ter)	VarSome: 5	nepublikovaná varianta

Tab. 5.1: Přehled výsledků re-analýzy (2)

Číslo probanda	Věk	Susp. diagnóza	Klinická data	Nález	ACMG klasifikace	Reference
Patogenní varianty v ostatních genech s klinickým významem pro diagnostiku kolorektálních polypóz:						
reFAP148	15	-	četná polypóza přičného tračníku a rektosigmoidea (± 13 let), RA+ (bratr rozsáhlá polypóza tračníku v ± 10 letech, paternální babička ca žaludku v 86 letech)	NM_004329(<i>BMPRI1A</i>):c.262G>T (p.Glu88Ter)	HGMD: 5, Clin Var: 5, VarSome: 5	Sayed et al. (2002), Xiong et al. (2015), Susswein et al. (2016)
reFAP159	11	-	četná polypóza (10 let), RA+ (maternální dědeček CC/RC v 61 letech)	NM_004329(<i>BMPRI1A</i>):c.1328G>A (p.Arg443His)	HGMD: 4, Clin Var: 3/4, VarSome: 5	Chubb et al. (2015)
reFAP083	31	-	polypóza, RA + (četný výskyt CC/RC)	NM_000251(<i>MSH2</i>):c.637delC (p.Leu213Ter)	HGMD: 4, VarSome: 5	nepublikovaná varianta
reFAP068	46	-	polypóza GIT	NM_000314(<i>PTEN</i>):c.160_162del (p.Val54del)	Clin Var: 4, VarSome: 4	Ngeow et al. (2014)
reFAP114	21	FAP/s. juvenilní polypózy	CC/RC ve 20 letech	NM_005359(<i>SMAD4</i>):c.593del (p.Pro198GlnfsTer4)	VarSome: 5	nepublikovaná varianta
reFAP053	30	-	polypóza, bez nárůstu počtu v průběhu času	NM_000546(<i>TP53</i>): c.374C>T (p.Thr125Met)	Clin Var: 4/5, VarSome: 5	Kato et al. (2003), Shirts et al. (2016), Nykamp et al. (2017), Evans et al. (2019), Weitzel et al. (2019) a 14 dalších
reFAP081	28	-	polypóza	NM_005359(<i>SMAD4</i>):c.1082G>A (p.Arg361His)	HGMD: 5, Clin Var: 5, VarSome: 5	Kim et al. (2000), McDonald et al. (2020)
reFAP185	51	FAP	polypóza, RA + (dcera polypóza v 15–18 letech)	NM_000455(<i>STK11</i>): c.179dup (p.Tyr60Ter)	HGMD: 4, Clin Var: 5, VarSome: 5	Parc et al. (2003), Bell et al. (2011), Bodian et al. (2014)
				NM_000455(<i>STK11</i>):c.426_427del (p.Val143AlafsTer19)	VarSome: 5	nepublikovaná varianta

Tab. 5.1: Přehled výsledků re-analýzy (3)

Číslo probanda	Věk	Susp. diagnózy	Klinická data	Název	ACMG klasifikace	Reference
Varianty s nejasným klinickým významem:						
refAP031	19	-	endoskopicky 4–5 malých polypů, po kolektomii	NM_006027(<i>EXO1</i>): c.749_750del (p.Ile250SerfsTer39)	VarSome: 5	nepublikovaná varianta
refAP136	37	FAP	ca in situ, sporadický výskyt	NM_006027(<i>EXO1</i>): c.986del (p.Asn329IlefsTer4)	VarSome: 3	nepublikovaná varianta
refAP182	52	-	polypóza	NM_007194(<i>CHEK2</i>): c.470T>C (p.Ile157Thr)	VarSome: 5	Bell et al. (1999), Cybulski et al. (2004), Kilpivaara et al. (2006), Kleibl et al. (2009), Suchy et al. (2010), Cragun et al. (2014), Cremin et al. (2020) a 82 dalších
refAP149	28	Garderův s. adenomy a hypersekrece, soliterní výskyt v rodině (otec ca mozku)	na obličejí a těle fibroadenomy, tubulózní adenomy a hypersekrece, soliterní výskyt v rodině (otec ca mozku)	NM_007194(<i>CHEK2</i>): c.1420C>T (p.Arg474Cys)	ClinVar: 3, VarSome: 4	Cai et al. (2009), Richards et al. (2015), Yurgelun et al. (2015b), Nykamp et al. (2017), Tsacosis et al. (2019) a 9 dalších
refAP103	53	FAP	polypóza, po subtotální kolektomii, RA+ (otec CC/RC se znaky FAP)	NM_000251(<i>MSH2</i>): c.2606C>A (p.Ala869Glu)	ClinVar: 3, VarSome: 3	Lützen et al. (2008), Yehia et al. (2018)
refAP158	38	FAP	četná polypóza, RA+ (sestra CC/RC bez polypů, bratr polypy, otec CC/RC ve 34 letech a ca močového měchýře v 60 letech)	NM_000179(<i>MSH6</i>): c.2932C>A (p.Gln978Lys)	VarSome: 3	nepublikovaná varianta
refAP152	69	FAP	četná polypóza	NM_000535(<i>PMS2</i>): c.1243G>A (p.Val415Met)	ClinVar: 3, VarSome: 3	Rudin et al. (2012), Hu et al. (2016), Zhang et al. (2016), Nykamp et al. (2017), Okkels et al. (2019) a 4 další
refAP105	50	-	četná polypóza, četný výskyt nádorů v rodině, ale jen proband má postiženou oblast střev	v NM_001308632(<i>POLD1</i>): c.2130G>C (p.Gln710His)	ClinVar: 2/3, VarSome: 1	nepublikovaná varianta
refAP101	6	-	zdravý, RA+ (matka, u které PTT odhalil delecí v oblasti APD 5–8*)	NM_006231(<i>POLE</i>): c.4450A>G (p.Ile1484Val)	ClinVar: 3, VarSome: 2	Nykamp et al. (2017)
refAP044	64	-	polypóza střeva i žaludku, CC/RC, RA+ (rodiče ca žaludku, 2 bratři otec ca žaludku)	NM_005359(<i>SMAD4</i>): c.1657T>A (p.Ter553Argext*40)	VarSome: 3	nepublikovaná varianta
Varianty ovlivňující aktivitu dihydroxyrimidin dehydrogenázy (DPD deficit):						
refAP059, refAP083, refAP102, refAP178				NM_000110(<i>DPYD</i>): c.1236G>A (p.Glu412=)	-	Amstutz et al. (2018)

Tab. 5.1: Přehled výsledků re-analýzy (4)

Číslo probanda	Věk	Susp. diagnóza	Klinická data
Probandi s negativním výsledkem re-analýzy:			
reFAP014	36	-	polypóza
reFAP027	26	-	pacient odeslán z revmatologického ústavu (?)
reFAP046	41	-	polypóza
reFAP049	19	-	polypóza
reFAP057	58	-	ca rekta, polypóza sigmoidea, spíš sporadický výskyt (rodiče a děti jsou bez CRC)
reFAP069	48	-	polypóza
reFAP072	29	FAP	polypóza
reFAP075	36	AFAP	smíšená polypóza tlustého střeva, bez RA
reFAP080	50	AFAP	polypóza, RA + (maternální dědeček)
reFAP085a	43	FAP	zdravá, RA + (bratr má FAP a byl pozitivní na PTT 15A–15E*)
reFAP086	60	AFAP	četné polypy, RA + (matka ca tenkého střeva)
reFAP087	24	FAP/Lynchův s.	polypóza, nejprve vyšetřena jako susp Lynch (neg.)
reFAP088	58	-	polypóza
reFAP090	15	-	polypóza
reFAP097	54	-	polypóza v oblasti rektosigmoidea
reFAP098	58	-	četná polypóza, tubulární adenom s displastickým epitelem, bez RA
reFAP102	49	-	okultní krvácení, mnohočetná polypóza, 1× maligní transformace, RA + (bratr polypektomie ve 32 letech)
reFAP109	57	-	adenokarcinom rekta, vícečetné polypy kolem, RA + (bratr CC/RC)
reFAP111	61	-	mnohočetné polypy, adenomy ve středním stádiu dysplazie
reFAP112	58	FAP/Lynchův s.	polypóza, RA+ (v rodokmenu jasná AD zátěž CC/RC nebo ca dělohy – otec a jeho 2 sestry, paternální dědeček)
reFAP113	70	-	mnohočetné adenomy a karcinom, RA + (syn adenom s těžkou dysplazií ve 35 letech)
reFAP120	64	-	četné polypy, ca sigmoidea, hemikolektomie
reFAP121	54	-	střední polypy v 50 letech, RA + (otec CC/RC v 82 letech)
reFAP122	72	AFAP	polypóza
reFAP123	44	-	četná polypóza, parciální kolektomie (80 %) v 39 letech, RA + (otec polypy GIT)

Tab. 5.1: Přehled výsledků re-analýzy – pokračování (5)

Číslo probanda	Věk	Susp. diagnóza	Klinická data
reFAP125	10	-	tumor rekta, soliterní výskyt, v rodině výskyt ca ve vyšším věku (ovaria, prsa)
reFAP131	44	-	četná polypóza, bez RA
reFAP133	62	-	četná polypóza, RA + (matka CC/RC)
reFAP134	42	FAP	četná polypóza, RA+ (otec CC/RC, paternální teta a paternální strýc rovněž CC/RC a četné polypy)
reFAP141	60	FAP	RA + (bratr a otec oba CC/RC a po smrti)
reFAP142	72	AFAP	po resekci tlustého střeva, syn probanda drobný polyp histologicky negativní
reFAP146	58	FAP	suspFAP s pozdním nástupem (57 letech), v části descendens, 2× malignizovaný polyp
reFAP151	67	-	polypóza tračnicku, malignizace, parciální kolektomie, RA + (oba bratři CC/RC a ca žaludku, otec ca jícnu a žaludku, matka CC/RC, synovec po kolektomii z důvodu polypózy)
reFAP154	28	FAP	četná polypóza v délce celého tračnicku
reFAP160	29	FAP	polypóza, sestra reFAP161
reFAP161	28	FAP	polypóza, bratr reFAP160
reFAP163	52	FAP/Lynchův s.	nezhoubný novotvar v přičném tračnicku, nečetná polypóza, RA + (otec i matka CRC (oba v 73 letech), matky sestra rovněž CRC (v 50+ letech))
reFAP165	34	-	při operaci slepého střeva náleží karcinoidu, opakovaný náleží polypů při kolonoskopii, některé s těžkou dysplazií, RA + (otec CC/RC)
reFAP166	44	-	ca sigmoidea v 35 letech, ca rekta ve 42 letech, ve střevě polypy (ne mnoho), RA + (otec zemřel ve 38 letech na ca GIT)
reFAP167	54	-	transplantace ledviny pro opakované ca ledviny, v tračnicku náleží polypů s dysplazií
reFAP168	32	-	npolypóza
reFAP169	55	FAP	ulcerózní colitis + FAP, desítky polypů ve střevě, histologicky tubulovilózní adenomy, bez RA (soliterní náleží v rodině, má zdravá MZ dvojčata)
reFAP170	50	-	v 50 letech adenokarcinom tlustého střeva, 6 polypů, RA + (otec zemřel na CC/RC)
reFAP178	53	AFAP	>20 polypů, po subtotální kolektomii, RA + (otec zemřel na ca GIT v 56 letech)
reFAP184	42	-	polypóza
reFAP186	75	AFAP	ca rekta (73 let), mnohočetná polypóza (75 let)

FAP – familiární adenomatózní polypóza, AFAP – atenuovaná familiární adenomatózní polypóza, ca – karcinom, CC/RC – karcinom tlustého střeva a/nebo konečnicku, RA+ – pozitivní rodinná anamnéza, PTT – protein truncation test, MZ – monozygotní

* oblastí genu APC pojmenované na základě domén tání elektroforéze v gradientovém denaturačním gelu podle studie Olschwang et al. (1993): Restriction of Ocular Fundus Lesions to a Specific Subgroup of APC Mutations in Adenomatous Polyposis Coli Patients. Cell 75: 959–968.

Variety uvedené šedým písmem představují varianty zařazené do kategorie variant s nejasným klinickým významem, které byly nalezeny u pacientů s již zachycenou patogenní variantou v některém z klinicky významných genů.

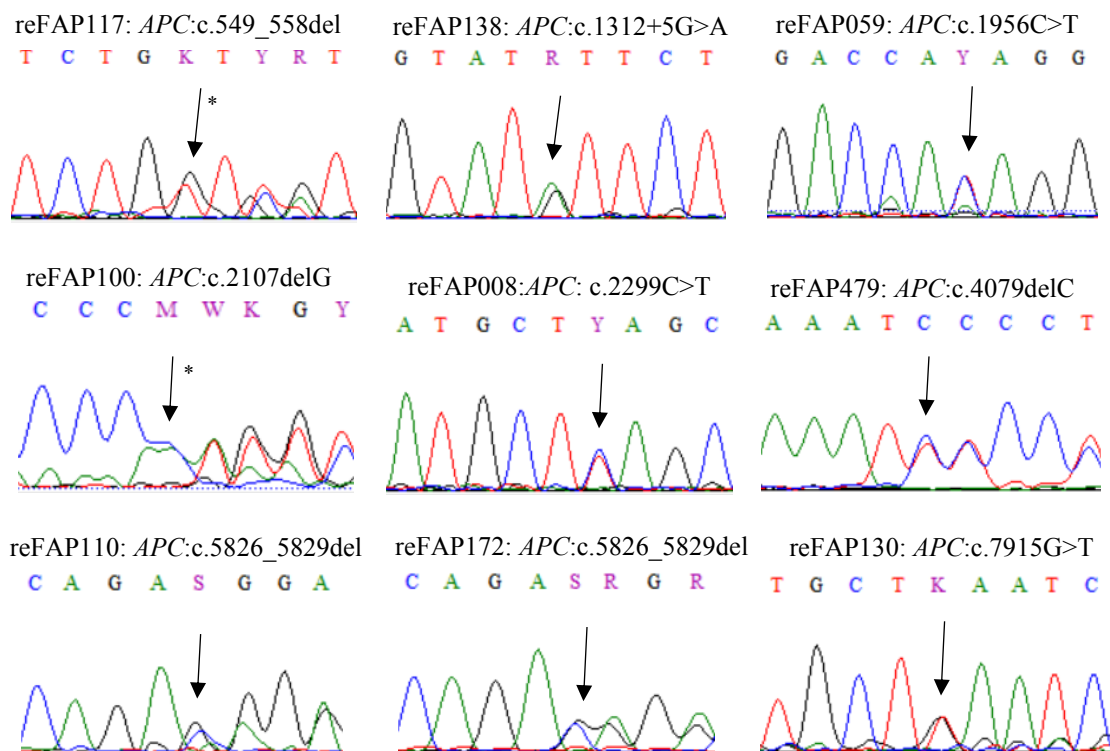
5.1 Konfirmace

V případě záchytu patogenních variant byla provedena konfirmace jejich přítomnosti jinými metodami, a to převážně pomocí modifikovaného Sangerova sekvenování, dále metodami MLPA a long-range PCR (LR PCR). Při konfirmaci byl použit shodný vzorek DNA, ze kterého byla provedena metoda NGS, neboť jiný (skutečně nezávislý), nebyl k dispozici.

Modifikovaná metoda Sangerova sekvenování

Pro konfirmaci přítomnosti patogenních variant s charakterem substitucí a krátkých insercí či delecí byla využita modifikovaná metoda Sangerova sekvenování (obr. 5.1 a obr. 5.2).

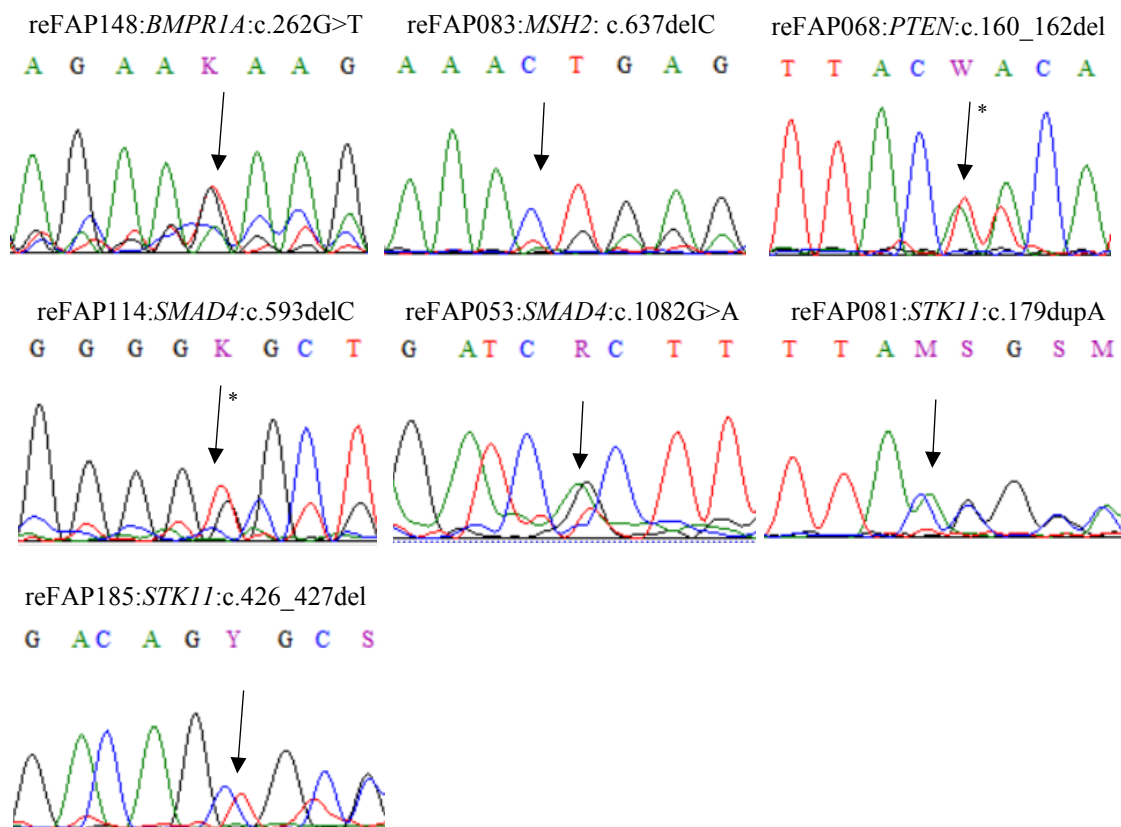
Obr. 5.1: Konfirmace přítomnosti patogenních variant v genu *APC* modifikovanou metodou Sangerova sekvenování



* sekvence získaná s využitím zpětného primeru

Konfirmace variant c.1620dup (reFAP001) a c.2299C>T (reFAP003) v genu *APC* byly provedeny modifikovanou metodou Sangerova sekvenování vedoucí laboratoře Ing. Jitkou Štekovou (obrázek není k dispozici).

Obr. 5.2: Konfirmace přítomnosti patogenních variant v klinicky významných genech modifikovanou metodou Sangerova sekvenování



* sekvence získaná s využitím zpětného primeru

U pacienta reFAP159 se přítomnost patogenní varianty c.1328G>A v genu *BMPRIA* bohužel nepodařilo konfirmovat. Zpětný primer z dostupného páru primerů bohužel nasedá právě do oblasti obsahující tuto variantu. I když se požadovanou sekvencí podařilo naamplifikovat PCR reakcí, sekvenací modifikovanou Sangerovou metodou byla získána pouze sekvence nemutované alely. Z časových důvodů zůstává přítomnost varianty v době publikování této práce nekonfirmovaná. Na základě statistických údajů laboratoře ohledně konfirmace variant zachycených metodou NGS je však možnost, že by se sekvence získaná pomocí modifikovaného Sangerova sekvenování lišila, velmi nepravděpodobná.

MLPA

Přítomnost insercí a delecí delšího rozsahu byly v genu *APC* konfirmovány pomocí metody MLPA (obr. 5.4 až obr. 5.6). Pro analýzu byla využita směs sond SALSA® MLPA® Probemix P043-E1 APC (MRC Holland). Číslování exonů genu *APC* výrobcem sond ($n = 18$) se liší od číslování exonů v rámci této diplomové práce ($n = 16$) z důvodu zahrnutí 2 exonů, které referenční sekvence NM_000038 neobsahuje (*exon 1*, který

odpovídá promotoru 1B a exonu 1 z referenční sekvence NM_001127511, a *exon 3* z referenční sekvence NM_00112710 – exony 1 a 3 na obr. 3.3). Kromě genu *APC* tato směs sond umožňuje potvrdit či vyvrátit přítomnost nejčastějších CNV variant i v genech *MUTYH* a *GREM1*, které také hrají roli v rozvoji dědičných kolorektálních polypóz. Kromě CNV variant umožňuje tato směs sond také vyšetřit přítomnost frekventovaných bodových mutací v genech *APC* (c.3182A>G a c.3927_3931delAAAGA) a *MUTYH* (c.536A>G a c.1187G>A).

Interpretaci možných výsledků MLPA analýzy uvádí tab. 5.2. Výjimku tvoří *MUTYH* sondy 1 a 2, které poskytují signál pouze v přítomnosti uvedených bodových mutací. *APC* sondy 22 a 23, které také slouží k detekci bodových mutací, jsou naopak navrženy pro nemutovaný stav (v případě bodové mutace tedy dojde k hybridizaci sond s nižší frekvencí, což povede ke snížení fluorescenčního signálu).

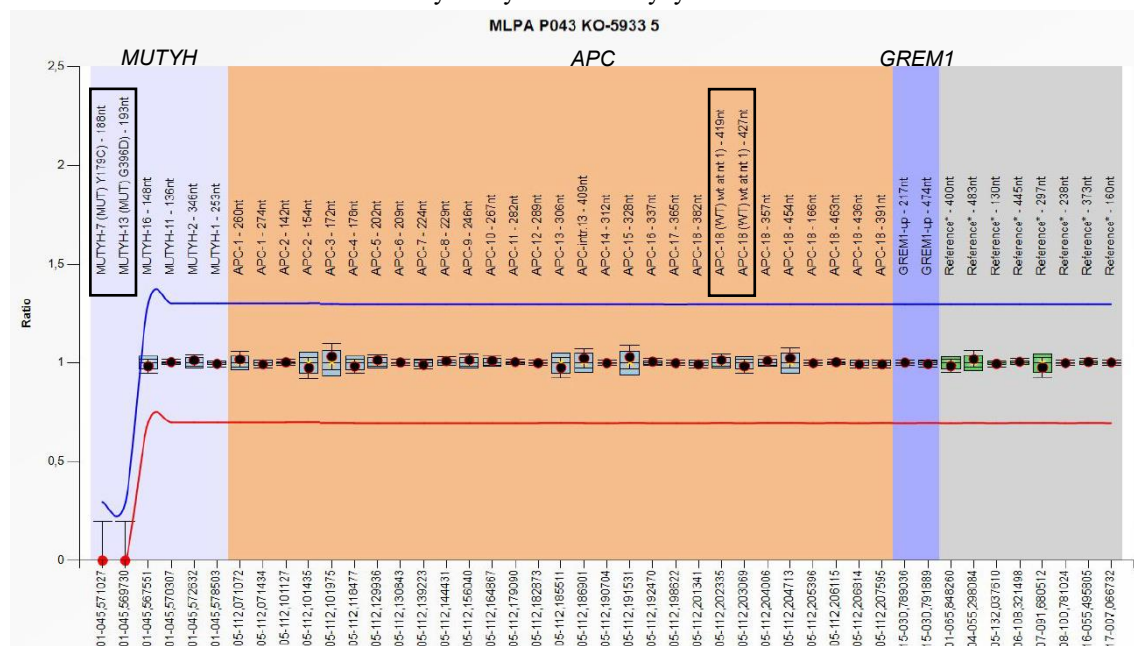
Tab. 5.2: Interpretace výsledků analýzy DNA metodou MLPA

CNV status	Dávkový kvocient*
Norma	0,8–1,2
Delece v homozygotním stavu	0
Delece v heterozygotním stavu	0,4–0,65
Duplikace v heterozygotním stavu	1,3–1,65
Duplikace v homozygotním stavu nebo triplicace v heterozygotním stavu	1,75–2,15
Další amplifikace v různých stavech	>1,65

* Poměr intenzity fluorescence sondy analyzovaného vzorku k intenzitě fluorescence kontrolní DNA.

Obr. 5.3 zobrazuje výsledek MLPA analýzy jednoho z kontrolních vzorků. Barevné oblasti vymezují jednotlivé typy sond – *MUTYH*, *APC*, *GREM1* a referenční sondy (hybridizace s různými lokusy na autozomech). Červená a modrá křivka definují oblast, ve které by se za normálních podmínek (pacient bez CNV varianty) měl dávkový kvocient pohybovat.

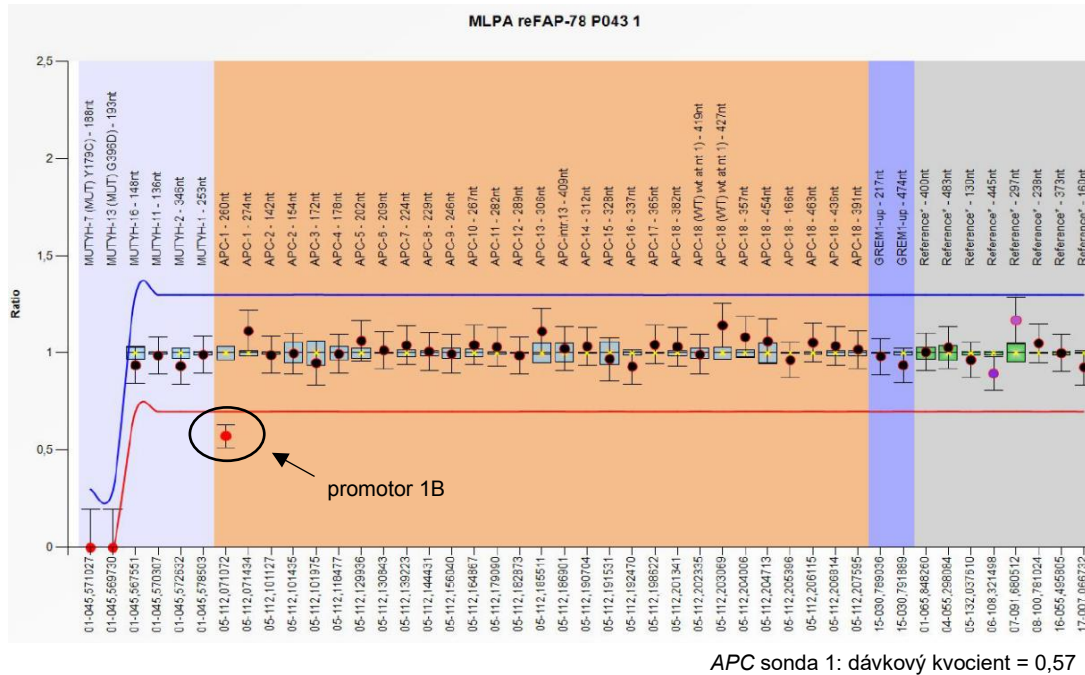
Obr. 5.3: Výsledky MLPA analýzy kontrolního vzorku



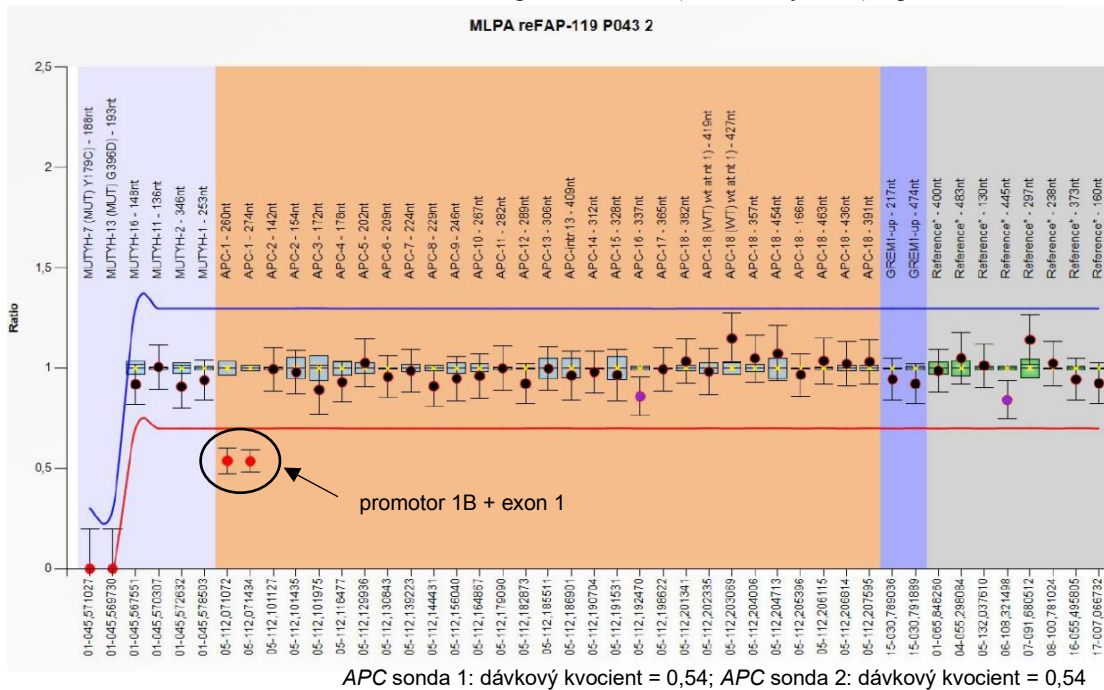
Vyznačené sondy slouží k detekci bodových mutací.

Výsledky konfirmace přítomnosti CNV variant v genu *APC* u re-analizovaných pacientů znázorňují následující obrázky. U pacientů reFAP78 (obr. 5.4) a reFAP119 (obr. 5.5) metoda MLPA potvrdila delecii v oblasti promotoru 1B genu *APC*. U pacienta reFAP119 pak delecce zasahuje delší úsek až do oblasti exonu 1 této referenční sekvence.

Obr. 5.4: MLPA konfirmace delecce v oblasti promotoru 1B (*APC* sonda 1) u pacienta reFAP078

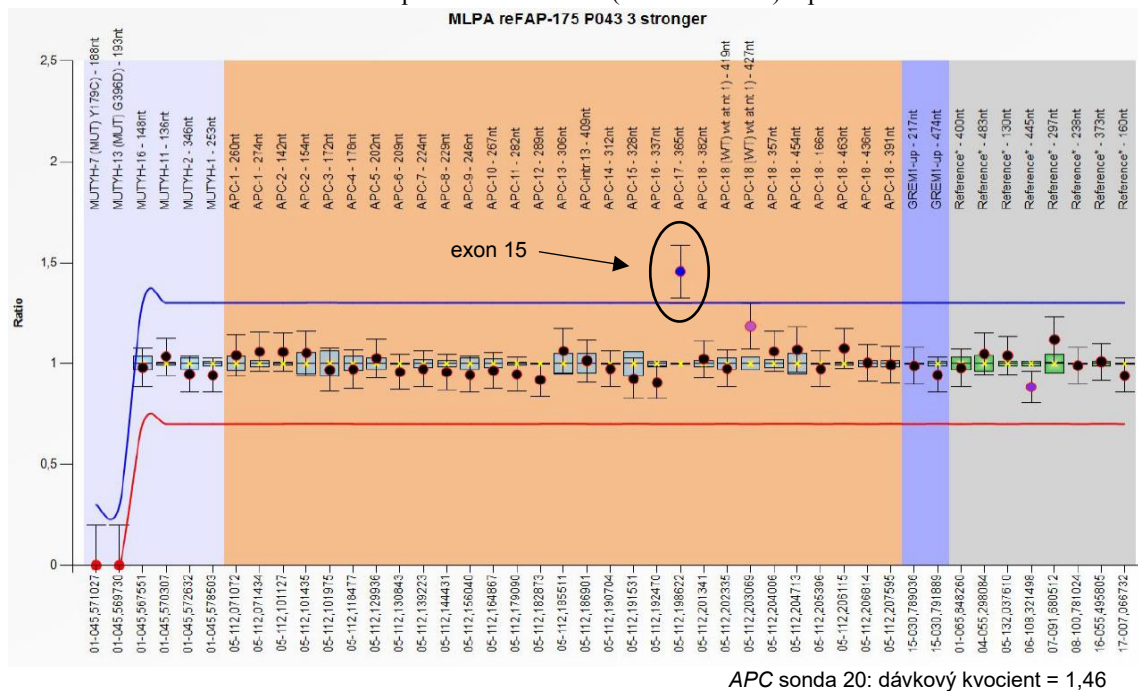


Obr. 5.5: MLPA konfirmace delecce v oblasti promotoru 1B (*APC* sondy 1 a 2) u pacienta reFAP119



U pacienta reFAP175 (obr. 5.6) se metodou MLPA podařilo potvrdit duplikaci úseku v exonu 15. Charakter této duplikace byl dále ověřován metodou LR PCR (viz dále).

Obr. 5.6: MLPA konfirmace duplikace v exonu 15 (*APC* sonda 20) u pacienta reFAP175



Jak již bylo dříve zmíněno, metodou MLPA byl u některých pacientů vyšetřen i gen *PMS2* (Probemix P008 C1 *PMS2* (MRC Holland)). V žádném z analyzovaných vzorků však CNV varianta v genu *PMS2* nebyla detekována.

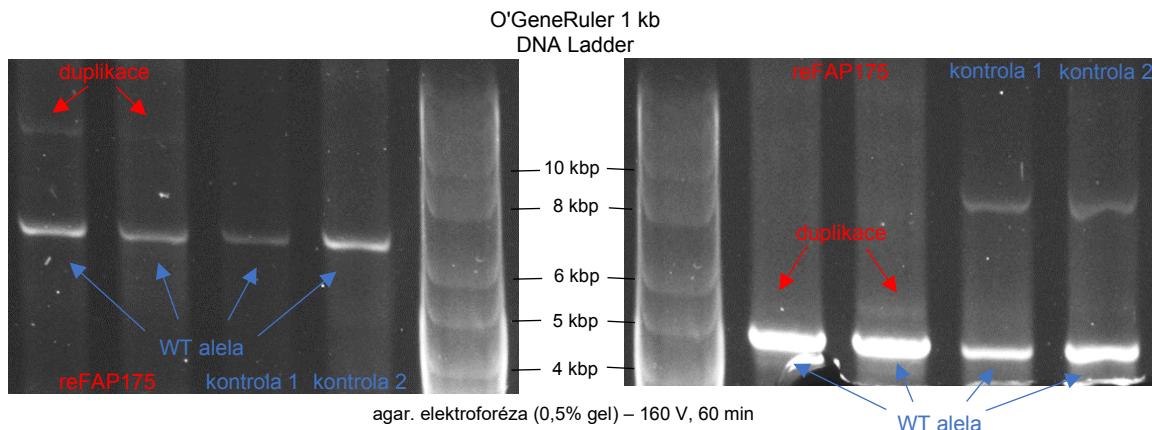
Long-range PCR

Pro zjištění, zda se duplikace v exonu 15 u pacienta reFAP175 nachází v blízkosti za sebou či nikoliv, byla provedena konfirmace také metodou LR PCR. Amplifikovány byly 2 oblasti – od 3' konce exonu 14 po 3' konec exonu 15 (*5' produkt*) a od 5' konce exonu 15 po 5' konec exonu 16 (*3' produkt*). Výsledné produkty byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy v 0,5% agarózovém gelu.

V případě, že se duplikovaný úsek nachází v dané oblasti, měla by se tato CNV varianta na elektroforegramu projevit vždy výskytem 2 pruhů o různých délkách. Tato situace nastala v případě amplifikace obou úseků u vzorku reFAP175, ale nikoliv u obou kontrolních vzorků (obr. 5.7). Kromě pruhu wild type alely (cca 7 kbp v případě *5' produktu* a cca 5 kbp v případě *3' produktu*) se u pacienta reFAP175 vyskytuje také pruh alely obsahující duplikaci (>10 bp pro *5' produkt* a cca 5,5 kbp pro *3' produkt*). Samotný exon 15 je přitom dlouhý 214 bp. Kromě exonu 15 tedy došlo také k duplikaci

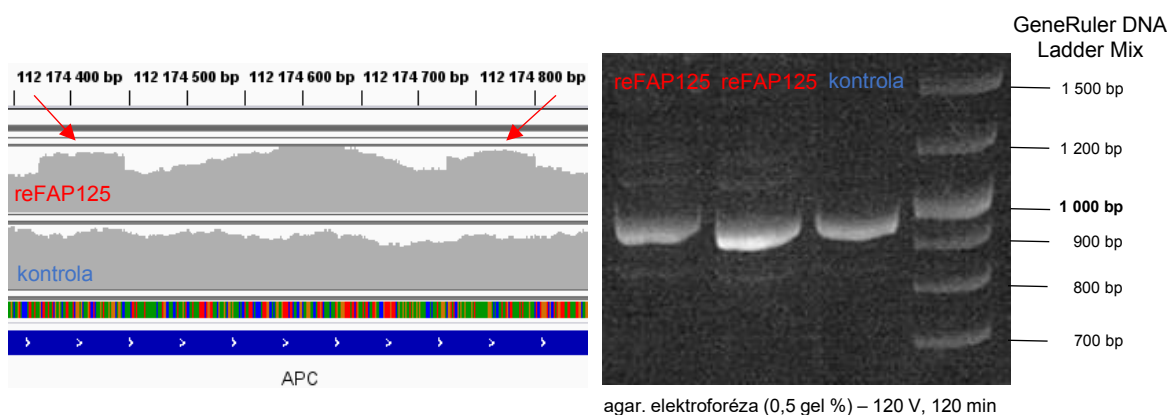
části sekvence intronu v upstream i downstream oblasti, přičemž v případě upstream oblasti je duplikace mnohem rozsáhlejší. Do exonů 14 a 16 již duplikace nezasahuje, což potvrzují také výsledky CNV analýzy.

Obr. 5.7: Konfirmace duplikace exonu 15 genu APC u vzorku reFAP175 agarózovou elektroforézou produktů LR PCR reakce



Metoda LR PCR byla dále provedena i pro amplifikaci delší části exonu 16 genu *APC* u vzorku reFAP125. Při vizuální kontrole v softwaru IGV se totiž zdálo, že by se v tomto exonu mohly vyskytovat 2 duplikace o délce asi 75 bp (obr. 5.8 vlevo), i když na to výsledky CNV analýzy přímo nepoukazovaly. V případě přítomnosti duplikací by LR PCR reakcí měly opět vzniknout 2 produkty – wild type alela (946 bp) a alela s duplikací (cca 1100 bp). LR PCR reakcí však vznikl jediný produkt o stejné délce jako v případě kontrolního vzorku (cca 950 bp), což neodpovídá údajným duplikacím v heterozygotním stavu. Pravděpodobně se tak jednalo pouze o artefakt sekvenování.

Obr. 5.8: Vyloučení přítomnosti duplikací v exonu 16 genu *APC* u vzorku reFAP125 metodou LR PCR



Grafické znázornění údajných duplikací v softwaru IGV (vlevo) a vyloučení jejich přítomnosti metodou LR PCR s následným elektroforetickým rozdělením vzniklých fragmentů (vpravo).

6. Diskuze

Do re-analýzy bylo zařazeno 78 suspektních FAP a AFAP probandů. V původních plánech re-analýza zahrnovala až 100 probandů. Soubor byl ale nakonec zmenšen z důvodu omezení vstupu studentů do laboratoře v rámci protipandemických opatření a dále také kvůli nedostatečnému množství DNA v některých vzorcích.

Klinické údaje

Pro porovnání, zda nalezené patogenní varianty odpovídají fenotypu pacientů, bylo nutné získat jejich klinické údaje (tab. 6.1). Molekulární diagnostika však byla indikována různými lékaři a data proto ne vždy obsahovala stejné množství informací. Kromě informací o polypóze bohužel u mnoha pacientů nebyly další klinické údaje přístupné, a to ani v rámci prvotní diagnostiky. Vzhledem ke stáří vzorků jsou tato data jen obtížně dohledatelná.

Tab. 6.1: Souhrn dostupných klinických údajů pacientů zařazených do re-analýzy

Klinický obraz pacientů	Počet pacientů
Rodinná anamnéza:	
Pozitivní RA nádorových onemocnění GIT	37
Bez pozitivní rodinné anamnézy	3
Bez údajů o rodinné anamnéze	36
Diagnostika CC/RC	17
Profylaktická operace	9
Extrakolonické příznaky:	
Polypóza žaludku	3
Osteomy	1
Hepatoblastom	1
Maligní nádory ovaria	1
Maligní nádory ledviny	1
Fibroadenomy na těle a obličeji	1
Suspektní diagnóza:	
FAP	18
AFAP	7
Gardnerův syndrom (forma FAP)	1
FAP/Lynchův syndrom	3
FAP/juvenilní polypóza	1
Nespecifikováno	46
<i>Celkový počet pacientů (bez zdravých probandů)</i>	<i>76</i>

RA – rodinná anamnéza, GIT – gastrointestinální trakt, FAP – familiární adenomatózní polypóza, AFAP – atenuovaná familiární adenomatózní polypóza, CC/RC karcinom tlustého střeva a/nebo konečníku,

Pro FAP onemocnění je charakteristický nízký věk manifestace, cca 15 let (Jasperson et al. 2017), průměrný věk diagnostiky FAP se pak pohybuje okolo 44 let (Croner et al. 2005). Údaje o věku re-analyzovaných pacientů této statistice odpovídají, s průměrným věkem prvotní diagnostiky 43 let. Nejfrekventovanější věk se pak pohybuje v rozmezí 50–59 let (modus 58 let – viz Graf 4.1).

Již v době prvotní diagnostiky bylo celkem 17 pacientů na základě histopatologického vyšetření diagnostikováno s CC/RC, přičemž průměrný věk těchto pacientů se pohybuje okolo 47 let. Pro FAP onemocnění se uvádí průměrný věk malignizace adenomů 39 let (Fornasarig et al. 2018). Už tento jev by mohl poukazovat na to, že ne všichni tito pacienti skutečně trpí FAP onemocněním. Z důvodu malého počtu probandů je však toto srovnání spíše orientační.

U několika pacientů byly také dostupné informace o extrakolonických projevech. Z uvedených projevů je pro FAP onemocnění charakteristická především polypóza žaludku, tvorba osteomů, hepatoblastomů a kožních lézí (Jasperson et al. 2017).

Kromě pacientů obsahuje soubor re-analyzovaných probandů také 2 zdravé jedince s pozitivní rodinnou anamnézou FAP onemocnění u příbuzných prvního stupně (reFAP085a – bratr, reFAP101 – matka). U těchto probandů tedy existuje 50% pravděpodobnost, že jsou nositeli kauzální mutace pro FAP onemocnění.

Dříve využitá metody molekulární diagnostiky

Pro vyšetření genů *APC* a *MUTYH* byly u probandů využity různé metody, v závislosti na roce diagnostiky (1993–2004). V pozdějších letech (do roku 2014) pak byly vzorky několikrát re-analyzovány modernějšími metodami. Přehled všech metod využitých k analýze vzorků uvádí tab. 6.2. Neplatí však, že by byl soubor v celém rozsahu analyzován všemi uvedenými metodami.

Tab. 6.2: Metody molekulární diagnostiky dříve využitá k analýze studovaných vzorků DNA

APC:

1. **Vazebná analýza** (1993–1997)
2. **DGGE** (1998–2004)
3. **Modif. metoda Sangerova sekvenování** – screening nejčastějších mutací (kodony 1061 a 1309)
4. **PTT** (re-analýza) – screening nonsense mutací
5. **MLPA** (re-analýza) – detekce CNV variant, bez oblasti promotoru 1B

MUTYH:

1. **dHPLC** (re-analýza) – Wave System 4500
2. **HRM** (re-analýza)

APC a MUTYH:

1. **NGS** (re-analýza) – panel FAP MASTR (Multiplicom), platforma MiSeq (Illumina®)

DGGE – elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu, PTT – protein truncation test, MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification, dHPLC – denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HRM – vysokorozlišovací analýza křivek tání, NGS – sekvenování nové generace

Zpočátku byla DNA členů rodin s výskytem FAP onemocnění zkoumána *vazebnou analýzou* za využití vysoce polymorfních mikrosatelitních tandemových repetitivních dinukleotidů CA v blízkosti genu *APC* (30–70 kbp od genu *APC*). Cílem bylo využít lokus D5S346 jako marker pro presymptomatickou diagnostiku FAP. Například Spirio et al. (1993) se za využití tohoto lokusu pokusili predikovat, diagnózu u členů celkem 14 rodin s výskytem FAP onemocnění.

Samotná molekulární diagnostika FAP onemocnění byla zpočátku prováděna *elektroforézou v gradientovém denaturačním gelu* (DGGE z angl. denaturing gradient gel electrophoresis), pomocí které byly v genu *APC* vytipovány exony, či jejich části obsahující mutaci, a to v rozsahu exonů 1–15 a první poloviny exonu 16 (po kodon 1693). Pro amplifikaci byly využívány primery obsahující GC-clamp (úsek bohatý na cytosin a guanin), díky kterým záchytnost metody dosahuje až 95 % (Ferrari et al. 2008). Například ve studii Meldrum et al. (2003) však metoda DGGE ve srovnání s denaturační vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií nedokázala odhalit několik variant na bázi substitucí a jednonukleotidových delecí. Sníženou schopnost rozlišení způsobují amplikony ko-migrující gelem i přesto, že se jejich sekvence mírně liší a měly by tedy vykazovat různou elektroforetickou pohyblivost (Adil 2014).

Pomocí modifikované metody *Sangerova sekvenování* byla DNA pacientů vyšetřena na přítomnost 2 nejčastějších kauzálních mutací v genu *APC* v evropské populaci – frameshift delece c.3183_3187del (p.Lys1061_Gln1062insTer) a c.3927_3931del (p.Glu1309fs). Vzhledem k délce genu *APC* se tato metoda využívala pouze pro tyto 2 oblasti a následně pro confirmaci přítomnosti variant zachycených ostatními zmíněnými metodami. Záchytnost metody dosahuje prakticky 100 %. Mez detekce se ovšem pohybuje okolo 15 až 20 %, což představuje omezení při výskytu genetické mozaiky.

Pro screening mutací vedoucím ke vzniku předčasného stop kodonu (nonsense či frameshiftové mutace), byla využita metoda *protein truncation test* (PTT). Metodou byl preferenčně analyzován poslední exon genu *APC*, který díky své délce umožňuje využít jako vstupní materiál DNA namísto RNA molekuly. Zhruba v polovině tohoto exonu se navíc vyskytuje již dříve zmiňovaná oblast mutačního klastru, ve které u FAP pacientů poměrně často dochází právě k mutacím způsobujícím vznik předčasného stop kodonu (Zhang a Shay 2017). V případě dostupnosti mRNA pak bylo možné vyšetřit i ostatní exony genu *APC*. Citlivost metody PTT se pohybuje okolo 80 %. Na druhou stranu například ve studii Necker et al. (2011) tato metoda v genu *APC* na rozdíl od metod

MLPA a Sangerova sekvenování dokázala odhalit varianty vyskytující se v mozaice na úrovni pod 15 %. V současné době je však tento problém překonán pomocí NGS.

Z důvodu omezené schopnosti metod založených na PCR detekovat dlouhé inserce a delece byla po uvedení komerčně dostupné směsi sond pro gen *APC* řada vzorků re-analyzována metodou MLPA s cílem detekovat CNV varianty. V té době však metodou ještě nebylo možné vyšetřit oblast promotoru 1B, neboť sondy pro tuto oblast byly do směsi zahrnuty až poté, co byly ve studii Rohlin et al. (2011) objeveny jeho delece u rodin pacientů s FAP onemocněním.

Analýza genu *MUTYH* probíhala zejména pomocí *denaturační vysokoúčinné kapalínové chromatografie* (dHPLC z angl. denaturing high performance liquid chromatography) na přístroji Wave system 4500. Pro metodu dHPLC se uvádí záchytnost až 98 % (Ferrari et al. 2008), se schopností detekovat substituce, krátké inserce a delece, a to i v případě genetické mozaiky (Yu et al. 2006).

Kromě dHPLC se k analýze genu *MUTYH* využívala také *vysokorozlišovací analýza křivek tání* (HRM z angl. high resolution melting analysis). Záchytnost metody se údajně blíží 100 % s tím, že metoda byla schopná zachytit varianty vyskytující se v mozaice na úrovni jen 5 % (Taylor 2009). V jiných případech se naopak uvádí omezené rozlišení metody, a to v případě, kdy sekvence obsahující různé varianty vykazují podobnou křivku tání – asi 10 % případů (Wittwer 2009). V kombinaci s dHPLC však tyto metody umožňují spolehlivou analýzu, která by mohla být jedním z důvodů, proč v rámci re-analýzy nebyla v genu *MUTYH* detekována žádná patogenní varianta.

V roce 2014 byly 2 vzorky ze souboru re-analyzovány také pomocí metody NGS na platformě MiSeq (Illumina®) s využitím panelu FAP MASTR, který umožnil obohatit knihovnu o kódující sekvence v genech *APC* a *MUTYH*. Analýza se tedy stále nezaměřovala na oblast promotoru 1B v genu *APC*.

6.1 Patogenní varianty v genu *APC*

Metodou NGS bylo detekováno 14 patogenních variant v genu *APC*. Procentuální zastoupení jednotlivých typů zachycených patogenních variant v genu *APC* v rámci této práce byla porovnána s údaji v databázi HGMD® (tab. 6.3). Srovnání je však spíše orientační, neboť na výsledky práce má významný vliv fakt, že se jedná o re-analýzu. V reportovaných variantách se tak častěji objevují varianty nacházející se v oblastech, na které se molekulární diagnostika v letech 1993–2004 nezaměřovala.

Tab. 6.3: Srovnání procentuálního zastoupení zachycených patogenních *APC* variant s údaji v databázi HGMD®

Typ mutace	Podíl (%)	Podíl v HGMD® (%)
Krátká delece	36 (5 pacientů)	38
Nonsense	21 (3 pac.)	18
Krátká inserce/duplikace	7 (1 pac.)	17
Dlouhé delece	14 (2 pac.)	7
Sestřihová (splicing)	14 (2 pac.)	6
Dlouhá inserce/duplikace	7 (1 pac.)	<1

Podle očekávání tvoří velkou část reportovaných variant v genu *APC* právě varianty nacházející se v oblastech, na které se molekulární diagnostika v letech 1993–2004 nezaměřovala – (1) oblast promotoru 1B, jehož klinická souvislost s FAP onemocněním byla potvrzena teprve poměrně nedávno, (2) a druhá polovina exonu 16. V rámci re-analýzy byly patogenní varianty v těchto oblastech zachyceny celkem u 5 pacientů (2× delece v promotoru 1B, 3× patogenní varianta v druhé polovině exonu 16), kteří dohromady představují 36 % všech pacientů s detekovanou patogenní *APC* variantou. Do výsledků se pak promítá i samotný charakter metod, které byly v minulosti využity k analýze vzorků, především jejich detekční schopnost a různá technická omezení (viz kapitola *Dříve využitá metody molekulární diagnostiky*).

Patogenní varianta v genu *APC* byla zachycena i u jednoho ze 2 probandů, kteří byli v minulosti zahrnuti do re-analýzy metodou NGS za využití panelu FAP MASTR (Multiplicom). Jedná se o pacienta reFAP138, u kterého byla nalezena sestřihová varianta c.1312+5G>A. Důvod, proč tato varianta nebyla v minulosti detekována, je jen obtížně vysvětlitelný. I když se panel FAP MASTR zaměřoval pouze na kódující oblasti genu *APC*, jedná se o variantu, která leží v těsné blízkosti exonu 10 a měla by proto být touto metodou detekovatelná. Kromě panelu však chyba mohla spočívat také v bioinformatickém zpracování dat.

U žádného z re-analyzovaných probandů nebyly v homozygotním stavu detekovány patogenní varianty v genu *MUTYH* způsobující *MUTYH*-asociovanou polypózu. To může být dáno celkovou nižší frekvencí MAP onemocnění v populaci (prevalence 1:20 000 až 1:60 000) oproti FAP onemocnění (prevalence 1:11 300 až 1:37 600) (Half et al. 2009), ale také možnou vyšší záchytností metod dříve použitých k vyšetření genu *MUTYH*.

6.1.1 Genotyp-fenotypová korelace

Na základě pozice kauzální mutace v genu *APC* lze u pacientů do jisté míry predikovat formu FAP onemocnění – klasická, atenuovaná či agresivní FAP. Kromě formy FAP onemocnění by s pozicí mutace měl také korelovat výskyt některých extrakolonických projevů. Bylo proto srovnáno, zda klinický obraz pacientů, u kterých byla zachycena patogenní varianta v genu *APC*, odpovídá genotyp-fenotypové korelaci FAP onemocnění (tab. 6.4).

Tab. 6.4: Genotyp-fenotypová korelace pacientů FAP pacientů

Pacient (věk): fenotyp	Kodon	Možný fenotyp ¹⁻⁴
reFAP117 (17): <i>suspFAP</i> , četná polypóza kolorekta, <u>hepatoblastom</u> (ve 2 letech)	182_185	<i>Klasická FAP</i> . Extrakolonické projevy: nádory štítné žlázy, <u>hepatoblastomy</u> .
reFAP138 (44): <i>suspFAP</i> , četná polypóza kolorekta, karcinom ovaria	437	<i>Klasická FAP</i> . Extrakolonické projevy: CHRPE, hepatoblastomy, nádory štítné žl.
reFAP001 (30): -	541	<i>Klasická FAP</i> . Extrakolonické projevy: CHRPE, hepatoblastomy, nádory štítné žl.
reFAP059 (45): -	652	<i>Klasická FAP</i> . Extrakolonické projevy: CHRPE, gastroduodenální adenomy, hepatoblastomy, nádory štítné žl.
reFAP175 (43): stovky polypů kolorekta	?582_653?	<i>Klasická FAP</i> . Extrakolonické projevy: CHRPE, gastroduodenální adenomy, hepatoblastomy, nádory štítné žl.
reFAP100 (33): <i>suspFAP</i> , četná polypóza kolorekta s maligním zvratem	703	<i>Klasická FAP</i> . Extrakolonické projevy: CHRPE, gastroduodenální adenomy, hepatoblastomy, nádory štítné žl.
reFAP003 (32): - reFAP008 (40): -	767	<i>Klasická FAP</i> . Extrakolonické projevy: CHRPE, gastroduodenální adenomy, hepatoblastomy, nádory štítné žl, osteomy.
reFAP479 (55): -	1360	<i>Agresivní FAP</i> . Extrakolonické projevy: CHRPE, gastroduodenální adenomy, hepatoblastomy, osteomy.
reFAP110 (53): cca 100 polypů v tračníku, okultní krvácení (v 50 letech) reFAP172 (25): mnohočetná polypóza žaludku (ve věku 12–15 let)	1942	<i>Atenuovaná FAP</i> . Extrakolonické projevy: desmoidy.
reFAP130 (55): četná polypóza kolorekta (hemikolektomie)	2639	<i>Atenuovaná FAP</i> . Extrakolonické projevy: desmoidy.

CHRPE – kongenitální hypertrofie retinálního pigmentového epitelu.

Podtržením zvýrazněný text znázorňuje korelaci předpovídaného a zaznamenaného fenotypového projevu.

Zdroje (1–4): Balaguer et al. (2015), Septer et al. (2013), Hagen et al. (2015), Araujo et al. (2019)

Ve skupině pacientů se zachycenou patogenní variantou v genu *APC* by se na základě pozice varianty měly objevit všechny 3 zmíněné formy FAP onemocnění (8× klasická, 3× atenuovaná a 1× agresivní forma). Věk manifestace, a tím pádem i věk diagnostiky atenuované formy FAP onemocnění přitom bývá oproti klasické formě (do které je zahrnuta i agresivní forma) v průměru o 10–15 let vyšší (Half et al. 2009). S ohledem

na nízký počet FAP pozitivních pacientů v re-analýze nelze vyvozovat žádné významné závěry, nicméně pacienti reFAP479 (agresivní FAP, 55 let) a reFAP172 (atenuovaná FAP, 25 let) z této statistiky mírně vybočují.

Pro nedostatek klinických údajů bohužel není možné efektivně srovnat extrakolonické projevy onemocnění s genotyp-fenotypovou korelací pozorovanou v rámci hned několika různých studiích. Otázkou je, zda údaje nejsou dostupné, protože u těchto pacientů v době prvotní diagnostiky nebyly žádné extrakolonické projevy zaznamenány, nebo zda data pouze nebyla předána laboratoři od klinického genetika. Výjimku ohledně dostupnosti klinických údajů představuje snad jen pacient reFAP117, u kterého byl ve věku 2 let diagnostikován hepatoblastom. Fenotyp predikovaný na základě pozice zachycené patogenní *APC* varianty u tohoto pacienta zahrnuje mimo jiné právě i tvorbu hepatoblastomů. U zbylých pacientů lze jen předpokládat, jaký fenotyp by mohli vykazovat.

6.1.2 Delece promotoru 1B

Zajímavou oblast, nejen pro tuto práci, představuje oblast promotoru 1B v genu *APC*, na kterou se žádná z dříve využitých metod analýzy genu *APC* u souboru probandů nezaměřovala. Od doby, kdy byla prokázána klinická souvislost promotoru 1B s FAP onemocněním (Rohlin et al. 2011), bylo v této oblasti zaznamenáno několik kauzálních mutací s charakterem bodových mutací (Li et al. 2016, Yang et al. 2021, Dixon et al. 2021), ale také delecí (Kadiyska et al. 2014, Lin et al. 2015, Snow et al. 2015, Yamaguchi et al. 2016, Marabelli et al. 2017, Araujo et al. 2019). Jedná se jak o relativně krátké delece (v řádu desítek bp) zasahující pouze oblast promotoru, tak i o rozsáhlé delece, které v řadě případů zasahovaly až do oblasti exonu 1B – prvního exonu transkripčních variant kontrolovaných tímto promotorem.

V rámci re-analýzy byly v promotoru 1B zachyceny delece o různé délce u 2 pacientů. Co se rozsahu týče, konkrétní délka delecí nebyla v rámci této práce ověřována. Na základě výsledků MLPA analýzy však bylo potvrzeno, že u pacienta reFAP078 delece zasahuje pouze oblast promotoru 1B, a z výsledků CNV analýzy se lze domnívat, že je tato delece dlouhá 37 bp. V případě pacienta reFAP119 nelze z výsledků CNV analýzy bohužel určit přesný začátek ani konec deletovaného úseku, neboť délka delecí nejspíš překračuje celou sekvenovanou oblast zahrnutou v panelu CZECA-NCA v.1.2. Pomocí metody MLPA se však podařilo potvrdit, že kromě promotoru 1B delece zasahuje i do již

zmíněné oblasti exonu 1B. V rámci dalších studií by tak bylo vhodné přesně definovat pozici a rozsah těchto delecí.

Na základě výsledků uvedených studií by fenotyp pacientů s kauzální mutací v této oblasti měl obecně odpovídat projevům klasické formy FAP onemocnění s tím, že pacienti bývají náchylnější k tvorbě žaludečních polypů. Kromě FAP onemocnění totiž oblast promotoru 1B klinicky souvisí také se syndromem adenokarcinomu žaludku a mnohočetné polypózy žaludku (GAPPS) (Li et al. 2016). Fenotyp pacientů reFAP078 a reFAP119 přibližně odpovídá klasické formě FAP onemocnění (viz tab. 5.1), nicméně ani u jednoho z pacientů se onemocnění v době prvotní diagnostiky neprojevovalo tvorbou žaludečních polypů.

6.1.3 Duplikace exonu 15

Druhý typ CNV varianty v genu *APC*, který byl v rámci re-analýzy detekován, představuje duplikace exonu 15 u pacienta reFAP175. Tato varianta byla primárně nalezena pomocí NGS analýzy a její přítomnost byla následně potvrzena pomocí metody MLPA. Nebylo však jasné, zda se daná duplikovaná oblast nachází uvnitř kódující sekvence genu *APC*, či zda je tento úsek na jiném místě genomu. Jelikož pacient vykazoval stovky polypů tlustého střeva ve věku 43 let, lze předpokládat, že nalezená duplikace exonu 15 genu *APC* se skutečně nachází uvnitř kódující oblasti.

Pro další charakterizaci duplikace byly pomocí LR PCR amplifikovány 2 oblasti – *5' oblast* (ohraničená popředním primerem nasedajícím do exonu 14 a zpětným primerem nasedajícím do duplikovaného exonu 15) a *3' oblast* (ohraničená popředním primerem nasedajícím do duplikovaného exonu 15 a zpětným primerem nasedajícím do posledního 16. exonu genu). Podle očekávání v případě pacienta reFAP175 vznikly v obou oblastech dva amplikony, zatímco v případě v případě obou kontrol (jiné dvě DNA ze souboru reFAP pacientů) vznikl v obou oblastech pouze jeden amplikon. Delší amplikony obsahující duplikaci byly vždy velmi slabé, na agarózovém gelu téměř nepatrné. Na základě orientační délky fragmentů, které elektroforéza umožňuje zjistit, však lze předpokládat, že kromě samotného exonu 15 zasahuje duplikace i do intronové oblasti.

Z agarózového gelu byly následně vyříznuty jednotlivé amplikony pacienta s cílem získat jejich sekvenci modifikovanou Sangerovou metodou. V důsledku velmi nízké koncentrace amplikonu a překryvu více sekvencí se nicméně sekvenci produktu obsahujícího duplikaci bohužel nepodařilo spolehlivě přečíst.

Zatímco delece celého exonu 15 již byly zaznamenány (Aretz et al. 2005, Nielsen et al. 2007, Jiang et al. 2015), jednoduchá duplikace tohoto exonu nebyla v žádné studii publikována. Tato varianta tak nejspíš bude poměrně vzácná. Stejně tak by se ale mohlo jednat o nějakou komplexnější přestavbu zahrnující exon 15. Přestavby v této oblasti již byly dříve zaznamenány, nicméně ve všech případech se zakládaly primárně na delecii exonu 15 (Su et al. 2000, Quadri et al. 2015), případně jen předcházejícího intronu (Tuohy et al. 2010). V rámci dalšího výzkumu by proto bylo žádoucí zaměřit se u pacienta reFAP175 na tuto oblast a získat její sekvenci.

Dále se také nabízí otázka efektu této duplikace. Exon 15 je součástí sekvence kódující domény armadillo repetitivní úseků uvnitř proteinu APC zodpovědnou za vazbu řady faktorů důležitých pro buněčnou adhezi, migraci (Zhang a Shay 2017) a pravděpodobně také apoptózu (Lui et al. 2012). V důsledku duplikace by tak mohlo dojít k narušení struktury této domény s negativním vlivem na její funkci. S ohledem na možnou pozici začátku duplikace by také mohlo dojít k narušení mechanismu sestřihu transkriptu. Pro další objasnění podstaty této varianty by tak bylo vhodné u pacienta reFAP175 (případně u některého příbuzného prvního stupně) dále provést také analýzu mRNA.

6.1.4 Nové patogenní varianty v genu *APC*

V rámci re-analýzy bylo zachyceno několik patogenních variant v genu *APC*, které dosud nebyly v žádné studii publikovány.

První takovou variantu představuje *frameshift delece c.4079del* (p.Ser1360Phefs Ter55). Vzhledem k tomu, že se jedná o dosud nepopsanou variantu, lze její patogenitu pouze předpokládat. Argumenty, které její patogenitu podporují, jsou nicméně silné. Po transkripci genu *APC* z mutované alely obsahující variantu vedoucí ke vzniku předčasného stop kodonu mohou nastat 2 situace – (1) buď je předčasně vzniklý stop kodon v mRNA rozpoznán a dojde k její degradaci mechanismem NMD (Shirts et al. 2014), nebo (2) vzniká zkrácený protein APC.

Pokud by došlo k translaci alternativní APC mRNA, vznikající protein by byl v případě varianty *c.4079del* zkrácen o polovinu své délky. Jeho sekvence by byla zakončena v oblasti domény 20 aa repeats, do které se za normálních podmínek váže β -katenin. Zkrácený protein by ho tak nejspíš vázal se sníženou až zcela nulovou schopností. Vlivem delece by navíc v této doméně také došlo k záměně Ser za Phe v pozici 1360, který představuje jeden z cílů fosforylace nezbytné pro vazbu β -kateninu

(Dephoure et al. 2008). Zkrácený protein si však stále zachovává dimerizační doménu a tvorbou dimerů tak může inaktivovat i protein tvořící se z wild type alely (Zhang and Shay 2017).

O patogenitě varianty dále svědčí také to, že varianta c.4240del (p.Met1413_Val1414insTer) způsobující vznik zkráceného proteinu, lišícího se oproti situaci u pacienta reFAP479 svou délkou jen o 1 aminokyselinu, je považována za patogenní (Miyoshi et al. 1992, Groden et al. 1993, Burger et al. 2011, Ikenoue et al. 2015).

Pozice této varianty naznačuje, že pacient by měl trpět agresivní formou FAP onemocnění, nicméně údaje o jeho klinickém obrazu nejsou bohužel dostupné.

Mezi dosud nepopsané varianty patří také *duplikace exonu 15*, kterou je však nutno blíže charakterizovat. To se týká i dvou různě dlouhých *deleci promotoru 1B*, které byly během re-analýzy nalezeny. Na rozdíl od duplikace exonu 15 však v minulosti bylo zaznamenáno alespoň 7 různých delecí zahrnujících promotor 1B (Marabelli et al. 2017). Dokud tak nebudou u zachycených delecí blíže specifikovány jejich pozice a rozsah, nelze přímo tvrdit, že se jedná o nepopsané varianty.

6.1.5 Mozaicismus u FAP pacientů

Až 20 % případů FAP onemocnění bývá způsobeno *de novo* mutací principem genetického mozaicismu (Hes et al. 2007). U řady studií zaměřených na re-analýzu zdánlivě negativních suspektních FAP pacientů byl pomocí metody NGS objeven somatický mozaicismus (Iwaizumi et al. 2015, Ciavarella et al. 2018, Stormorken et al. 2018, Kim et al. 2019).

V rámci této práce byla analyzována DNA izolovaná z periferní krve pacientů, a tudíž by bylo možné zachytit mozaicismus, který měl původ v časně fázi zárodečného dělení. Zatímco krev je původu mezodermálního, tlusté střevo je tvořeno z endodermu, přičemž tyto zárodečné listy se tvoří okolo třetího týdne vývoje zárodku. Bioinformatická pipeline hodnotící data z NGS sekvenátorů byla přitom nastavena na mez detekce 5 %. Pro záchyt mozaiky by se tak buňky obsahují alternativní alelu v genu *APC* musely v periferní krvi nacházet na hranici alespoň 10 %. U žádného probanda však nebyl mozaicismus v rámci re-analýzy nalezen.

Pro detekci variant z alternativní linie buněk vzniklé až po tvorbě zárodečných listů by bylo nutné analyzovat DNA izolovanou přímo z postižené tkáně (kolorektální polypy, v případě extrakolonických projevů možné také z jiných tkání), což je však, z důvodu re-analytického charakteru práce, nemožné.

6.2 Patogenní varianty v ostatních genech souvisejících s tvorbou kolorektálních polypů

Kromě potvrzení diagnózy FAP onemocnění umožnil multigenový panel CZECANCA v.1.2 přehodnotit suspektní diagnózu u 8 re-analizovaných pacientů, u kterých se pomocí NGS podařilo zachytit patogenní varianty v genech souvisejících s různými dalšími onemocněními spojenými s tvorbou kolorektálních polypů. Tyto syndromy se přitom navzájem od sebe liší především typem polypů (z histologického a morfologického hlediska), jejich četností a rizikem malignizace, průměrným věkem manifestace, extrakolonickými projevy a typem dědičnosti (tab. 6.5).

Na základě výsledků re-analýzy, klinických dat pacientů (v případě dostupnosti) a v literatuře uvedených informací o jednotlivých dědičných onemocněních spojených s tvorbou kolorektálních polypů byla diagnóza zmíněných pacientů přehodnocena následujícím způsobem:

- reFAP083 (*MSH2*): *Lynchův syndrom*;
- reFAP081, reFAP185 (*STK11*): *Peutzův-Jeghersův syndrom*;
- reFAP068 (*PTEN*): *PTEN hamartomatózní tumorový syndrom*;
- reFAP148, reFAP159 (*BMPRIA*): *syndrom juvenilní polypózy* či *hereditární smíšený polypózní syndrom*;
- reFAP053, reFAP114 (*SMAD4*): *syndrom juvenilní polypózy*.

Lynchův syndrom

U pacienta reFAP083 byla nalezena patogenní varianta v genu *MSH2*, jehož produktem je tumor supresorový protein MSH2 (MutS homolog 2) zapojený do oprav chybného párování bazí (MMR). Tento gen vykazuje klinickou souvislost s Lynchovým syndromem. I přesto, že tvorba kolorektálních polypů není pro Lynchův syndrom typická (z čehož vyplývá starší název hereditární nepolypózní kolorektální karcinom), polypy se mohou tvořit jako prekancerózní léze (Buchanan et al. 2010, Idos a Valle 2021), právě jako v případě pacienta reFAP083. Diagnózu dále utvrzuje četný výskyt CC/RC v rodině pacienta.

Kromě Lynchova syndromu je gen *MSH2* spojen také se syndromem konstitučního deficitu MMR genů, který však vykazuje autozomálně recesivní dědičnost, zatímco u pacienta byla nalezena patogenní varianta pouze v heterozygotním stavu.

Tab. 6.5: Diferenciální diagnostika dědičných onemocnění spojených s tvorbou kolorektálních polypů (1)

Onemocnění (prevalence)	Postižený gen	Dědičnost	Hlavní symptomy	Zdroje
Adenomatózní polypózy: Familiární adenomatózní polypóza (FAP) (1:11 300 až 1:37 600)	<i>APC</i>	AD	Adenomy v GIT – tlusté střevo (<i>klasická FAP</i> : 100–1 000, <i>agresivní FAP</i> : >1 000), konečník, žaludek, tenké střevo (zejména duodenum), peritampulární oblast. Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše + pankreas, játra, žlučovody), nádory štítné žlázy, desmoidy, kožní léze, kostní a zubní malformace, CHRPE <ul style="list-style-type: none"> • <i>Gardnerův syndrom</i> – kostní a zubní malformace a nádory. • <i>Turcotův syndrom typ 2</i> – nádory CNS (medulloblastomy, glioblastomy). Riziko CC/RC: 100 %, průměrný věk diagnostiky CC/RC: 39 let.	Half et al. (2009), Bogaert a Prenen (2014), Jasperson et al. (2017)
Atenuovaná FAP (AFAP)	<i>APC</i>	AD	Adenomy v GIT – tlusté střevo (10–100), konečník (méně než při klasické FAP), duodenum, žaludek. Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše + játra), prsu. Riziko CC/RC: 70 %, průměrný věk diagnostiky CC/RC: 56 let.	Half et al. (2009), Bogaert a Prenen (2014)
<i>MUTYH</i> -asociovaná polypóza (MAP) (1:20 000 až 1:60 000)	<i>MUTYH</i>	AR	Adenomy + hyperplastické/serátní polypy + smíšené polypy (hyperplastické + adenomatózní) v GIT – tlusté střevo (10–100 adenomů), duodenum. Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše), ovarií, močový měchýř. ± Nádory prsu, endometria, žaludku, pankreatu, štítné žlázy, rakovina kůže, benigní léze nadledvin, zubní abnormality, CHRPE. Riziko CC/RC: 80 %, průměrný věk diagnostiky CC/RC: 48 let	Half et al. (2009), Nielsen et al. (2011), Nielsen et al. (2019)
Lynchův syndrom (LS) (1:279)	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM</i>	AD	Adenomy v GIT (jako prekancerózní léze) – tlusté střevo, konečník. Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše + žaludek, tenké střevo, pankreas), endometria, ovarií, močových cest, prostaty, ± nádory prsu. <ul style="list-style-type: none"> • <i>Turcotův syndrom typ 1</i> – glioblastomy + některé další nádory CNS. • <i>Muirův-Torřův syndrom</i> – nádory mazových žláz. Riziko CC/RC: 70 %, průměrný věk diagnostiky CC/RC: 42–61 let	Idos and Valle (2021), Buchanan et al. (2010)
Polymeráza spojená s opravnou funkcí polymerázy (PPAP) (prevalence neznámá)	<i>POLE, POLD1</i>	AD	Adenomy v GIT – tlusté střevo (<100) Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše + žaludek, tenké střevo), endometria, ovarií, mozku, prsu. Riziko CC/RC: nezvýšené, průměrný věk diagnostiky CC/RC: neznámý (POLE 50 let, POLD1 35–40 let – Buchanan et al. 2018).	Buchanan et al. (2018)
<i>NTHL1</i> -asociovaná polypóza (NAP) (prevalence neznámá)	<i>NTHL1</i>	AR	Adenomy + serátní/hyperplastické polypy v GIT – tlusté střevo (<100 adenomů), duodenum. Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše), prsu, endometria, děložního čípku, ovarií, močového měchýře, mozku, hematologické malignity. Riziko CC/RC: zvýšené, průměrný věk diagnostiky CC/RC: neznámé (61 let – Grolleman et al. 2019).	Weren et al. (2015), Kuiper et al. (2020), Grolleman et al. (2019)
<i>MSH3</i> -asociovaná polypóza (prevalence neznámá)	<i>MSH3</i>	AR	Adenomy v GIT – tlusté střevo (<100), duodenum. Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše + žaludek), štítné žlázy, mléčných žláz, CNS (astrocytomy) Riziko CC/RC: zvýšené, průměrný věk diagnostiky CC/RC: neznámý.	Adam et al. (2016)

Tab. 6.5: Diferenciální diagnostika dědičných kolorektálních polypóz (2)

Onemocnění (prevalence)	Postižený gen	Dědičnost	Hlavní symptomy	Zdroje
<i>MLH3</i> -asociovaná polypóza (prevalence neznámá)	<i>MLH3</i>	AR	Adenomy v GIT – tlusté střevo (<100). Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše), prsu. Riziko CC/RC: zvýšené, průměrný věk diagnostiky CC/RC: 48–52 let.	Olkinuora et al. (2019)
Syndrom konstitučního deficitu MMR genů (CMMRD) (prevalence neznámá)	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>	AR	Adenomy v GIT – tlusté střevo. Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše + tenké střevo, konečník) mozku, kožní léze, hematologické malignity Riziko CC/RC: 40–70 %, průměrný věk diagnostiky CC/RC: neznámý (16 let – Durno et al. 2015).	Wimmer et al. (2014) Durno et al. (2015)
<u>Hamartomatózní polypózy:</u>				
Peutzův-Jeghersův syndrom (PJS) (1: 50 000 až 1:200 000)	<i>STK11</i>	AD	Hamartomy + adenomy v GIT – tenké střevo, žaludek, tlusté střevo, konečník. Hyperpigmentace kůže (okolo úst, očí a nosních dírek, konečky prstů) a sliznice (dutina ústní). Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše + pankreas), ovarii, vejcovodů, děložního čípku, testes (Sertolliho buňky), prsu. ± Hamartomy v ledvinové pánevi, žlučníku, močovém měchýři, močovodech, horních cestách dýchacích.	McGarrity et al. (2016), Beggs et al. (2010)
Syndrom Cowdenové (CS) (prevalence neznámá, odhad <1:200 000)	<i>PTEN</i>	AD	Lhermittova-Duclosova nemoc (dysplastický gangliocytom mozečku). Mukokutánní léze. U dětí makrocefalie, opožděný psycho motorický vývoj. Hamartomy ± adenomy v GIT – celý GIT (zejména tlusté střevo, konečník). Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše), štítné žlázy, prsu, ledvin, endometria, genitourinárního traktu, lipomy, fibromy. Riziko CC/RC: 16 %, průměrný věk diagnostiky CC/RC: neznámý. Symptomy obdobné syndromu Cowdenové.	Pilarski a Eng (2004), Blumenthal a Dennis (2008), Gosein et al. (2016)
Bannayanův-Rileyho-Ruvalcábův syndrom (BRRS) (prevalence neznámá)	<i>PTEN</i>	AD	Hemangioomy. Pigmentové skvrny na penisu. Riziko CC/RC: zvýšené, průměrný věk diagnostiky CC/RC: neznámý.	Blumenthal a Dennis (2008), Yehia a Eng (2021)
Syndrom juvenilní polypózy (JPS) (1:16 000 až 1:100 000)	<i>BMPRIA, SMAD4</i>	AD	Hamartomy (juvenilní polypy) v GIT – tenké střevo, žaludek, tlusté střevo, konečník. ± Srdeční a vaskulární malformace (zaznamenány u pacientů s patogenními <i>SMAD4</i> variantami). Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše + pankreas) Riziko CC/RC: 40–50 %, průměrný věk diagnostiky CC/RC: 42 let.	Chow and Macrae (2005), Larsen Haidle a Howe (2017)
<u>Serátní polypózy:</u>				
Syndrom serátní polypózy (SPS) (prevalence neznámá)	<i>RNF43</i> + další geny?	neznámá	Serátní + hyperplastické + smíšené polypy v GIT (<100) – tlusté střevo, konečník. Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše). Riziko CC/RC: 40–50 %, průměrný věk diagnostiky CC/RC: neznámý.	Steinhagen a Guillem (2013), Ijspeert et al. (2017)
<u>Smíšené polypózy:</u>				
Hereditární smíšený polypózní syndrom (HMPS) (prevalence neznámá)	<i>BMPRIA, SCG5/GREMI</i>	AD	Adenomy + hamartomy + hyperplastické + smíšené polypy v GIT. Nádorová predispozice – nádory GIT (viz výše), ± rakovina prostaty, desmoidy. Riziko CC/RC: zvýšené, průměrný věk diagnostiky CC/RC: neznámý.	Rozen et al. (2003), Jaeger et al. (2012)

AD – autozomálně dominantní, AR – autozomálně recesivní, GIT – gastrointestinální trakt CC/RC – karcinom tlustého střeva/konečníku, CHRPE – kongenitální hypertrofoje retinálního pigmentového epitelu

Peutzův-Jeghersův syndrom

Peutzův-Jeghersův syndrom způsobují mutace v genu *STK11*. Jak již název vypovídá, protein STK11 (Ser/Thr kináza 11) patří mezi Ser/Thr kinázy, přičemž jeho primárním cílem je AMP-aktivovaná proteinkináza, která je součástí kaskády vedoucí k regulaci metabolismu buňky. V rámci re-analýzy byly patogenní varianty v tomto genu detekovány u pacientů reFAP081 a reFAP185. Kromě adenomů se při tomto onemocnění v gastrointestinálním traktu tvoří také hamartomy. Klinické údaje o charakteru polypů, které byly u těchto pacientů nalezeny, však bohužel nejsou k dispozici, stejně jako informace o extrakolonických projevech.

PTEN hamartomatózní tumorový syndrom

U pacienta reFAP068 byla zachycena patogenní varianta v genu *PTEN* kódujícím fosfatázu PTEN (fosfatázový a tenzinový homolog) zapojené do regulace buněčného cyklu, ale také metabolismu, migrace, či apoptózy. Tento gen hraje roli v řadě dědičných onemocněních souhrnně označených jako *PTEN* hamartomatózní tumorový syndrom, přičemž tvorbu kolorektálních polypů zahrnují syndrom Cowdenové a Bannayanův-Rileyho-Ravulcabův syndrom (Blumenthal a Dennis 2008). Pro nedostatek klinických dat však u pacienta reFAP068 nelze diagnózu blíže určit.

Syndrom juvenilní polypózy

Syndrom juvenilní polypózy bývá způsoben zárodečnými mutacemi v genech *BMPRIA* a *SMAD4*. Produkty těchto genů jsou součástí TGF- β signální dráhy, prostřednictvím které se podílí na regulaci buněčného cyklu, proliferace, diferenciace či apoptózy. Transmembránová Ser/Thr kináza BMPRIA (kostní morfogenetický proteinový receptor, typ 1A) fosforylací aktivuje rodinu SMAD (mothers against decapentaplegic) proteinů, včetně homologu SMAD4, které vytváří heteromerní komplexy a po transportu do jádra působící jako transkripční faktory (Chow a Macrae 2005, Larsen Haidle a Howe 2017). V rámci re-analýzy byly v těchto genech nalezeny celkem 4 patogenní varianty, v každém genu po 2 variantách.

Gen *BMPRIA* je kromě syndromu juvenilní polypózy zodpovědný také za tzv. hereditární smíšený polypózní syndrom, který představuje vzácné onemocnění, o kterém zatím neexistuje příliš mnoho informací. U studovaných pacientů navíc bohužel nejsou dostupné klinické údaje ohledně charakteru kolorektálních polypů ani extrakolonických projevů, které by umožnily diferenciální diagnostiku. Pro oba

pacienty s patogenní variantou v genu *BMPRIA* je nicméně společný nízký věk v době prvotní diagnostiky (reFAP148 – 15 let, reFAP159 – 11 let), který je typický právě pro syndrom juvenilní polypózy (obvykle do 20 let). Hereditární smíšený polypózní syndrom bývá naopak diagnostikován až od třetí dekády života (Miyahara et al. 2020). Diagnózu však z výše uvedených důvodů nelze u pacientů stanovit s jistotou.

V případě genu *SMAD4* je dosud známa pouze souvislost se syndromem juvenilní polypózy. U pacientů s nálezem patogenní varianty v tomto genu opět není k dispozici mnoho klinických údajů. V případě pacienta reFAP114 lze pozorovat extrémně nízký věk diagnostiky CC/RC (21 let). Naopak pacient reFAP053 byl v době prvotní diagnostiky starší než průměrný věk diagnostiky syndromu juvenilní polypózy, což však diagnózu tohoto onemocnění nijak nevylučuje.

6.1.1 Nové patogenní varianty

Stejně jako v případě genu *APC* byly v rámci re-analýzy u pacientů nalezeny dosud nepopsané patogenní varianty i v dalších klinicky významných genech. Ve všech případech se jedná o varianty vedoucí ke vzniku předčasného stop kodonu. Pokud nedojde k degradaci alternativní mRNA mechanismem NMD, vzniká zkrácený protein. To, jak moc bude schopný plnit svoji biologickou funkci, přitom závisí na délce a funkci chybějící sekvence.

Varianta *MSH2:c.637delC* (p.Leu213Ter), která byla zachycena u pacienta reFAP083, vede ke zkrácení proteinu MSH2 o téměř 80 % své délky. Takový protein si zachovává v podstatě pouze DNA vazebnou doménu, zatímco ztrácí všechny domény určené k interakci s ostatními proteiny podílejících se na mechanismu MMR (Deihimi et al. 2017). Výsledný protein tak bude zcela nefunkční, na základě čehož lze předpokládat patogenitu uvedené varianty. Například varianta *c.643C>T* (p.Gln215Ter) způsobující vznik podobně zkráceného proteinu již byla v minulosti zaznamenána u pacientů s Lynchovým syndromem (Bapat et al. 1999).

V případě pacienta reFAP185 byla zachycena dosud nepopsaná varianta *STK11:c.426_427del* (p.Val143AlafsTer19). Jedná se o delecii vedoucí k posunu čtecího rámce se vznikem předčasného stop kodonu, s tím, že vzniklý protein je zkrácen o více než 60 % své délky. Zkrácený protein si sice zachovává N-koncovou doménu obsahující jaderný lokalizační signál, nicméně ztrácí část katalytické kinázové domény a celou C-koncovou regulační doménu s motivem pro prenylacii (Wang et al. 2011). Ve výsledku je tak aktivita kinázy STK11 pravděpodobně výrazně snížena až zcela potlačena. Patogenitu

uvedené varianty lze očekávat již jen na základě toho, že například varianta c.440_441del (p.Arg147LeufsTer15), vedoucí ke vzniku stejně zkráceného proteinu, byla nalezena u rodiny pacientů s Peutzovým-Jeghersovým syndromem (Chen et al. 2017).

Varianta *SMAD4:c.593del* (p.Pro198GlnfsTer4) u pacienta reFAP114 způsobuje zkrácení proteinu SMAD4 o více než 60 %. Takový protein si zachovává N-koncovou doménu zprostředkující vazbu na DNA, ale také interakci s dalšími transkripčními faktory. Ztrácí však část linker domény, která se zapojuje do regulace stability proteinu a regulace jeho transportu, a veškerou C-koncovou doménu účastnící se velké části protein-proteinových interakcí (Pauklin a Vallier 2015). Například varianta c.563del (p.Asn188IlefsTer14), vedoucí ke vzniku zkráceného proteinu SMAD4 o přibližně stejné délce, byla nalezena hned u několika pacientů se syndromem juvenilní polypózy (Handra-Luca et al. 2005, Pyatt et al. 2006, O'Malley et al. 2012).

6.3 Varianty s nejasným klinickým významem

V rámci re-analýzy byly u řady probandů nalezeny VUS varianty (třída 3 podle ACMG klasifikace) v genech souvisejících s tvorbou kolorektálních polypů (*MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *POLD1*, *POLE*, *SMAD4*). Jedná se o takové genetické varianty, jejichž souvislost s daným onemocněním není klinicky prokázána, nicméně pravděpodobnost jejich možného vlivu se odhaduje v rozmezí 5–95 %. Podle doporučení ACMG proto přítomnost VUS varianty neopravňuje k nastavení speciálních klinických postupů jako v případě pacientů s variantami třídy 4 a 5 (Richards et al. 2015, Plon et al. 2008).

Kromě VUS variant byly do této kategorie zařazeny také patogenní varianty v genech *EXO1*, *CHEK2* a *TP53*, které z hlediska kolorektálních polypóz a dědičných forem CC/RC patří mezi geny s nejasným klinickým významem (GUS z angl. gene of uncertain clinical significance). Zatímco klinickou souvislost genů *CHEK2* (gen pro checkpoint kinázu 2) (Kilpivaara et al. 2003, de Jong et al. 2005, Cybulski et al. 2007, Suchy et al. 2010) a *TP53* (gen pro tumor protein 53) (Yurgelun et al. 2015a, Martin-Morales et al. 2018) s postupem času naznačují výsledky stále více studií, v případě genu *EXO1* (gen pro exonukleázu 1) je situace komplikovanější. Některé studie vztah genu *EXO1* k CC/RC naznačují (Wu et al. 2001, Xavier et al. 2019), jiné ho naopak vyvracejí (Alam et al. 2003, Jagmohan-Changur et al. 2003).

U některých ze zachycených variant z této kategorie byla v CZEKANCA databázi (databáze zahrnující genetické varianty 6216 pacientů, kteří podstoupili molekulární diagnostiku nádorového onemocnění, a 2428 zdravých jedinců) zaznamenána vyšší

relativní frekvence výskytu ve skupině pacientů oproti kontrolní skupině, což by nasvědčovalo možnosti jejich souvislosti se zvýšenou nádorovou predispozicí. Konkrétně se jedná o varianty *CHEK2*:c.538C>T (pacienti $1,6 \cdot 10^{-3}$, kontroly $8,2 \cdot 10^{-4}$), *CHEK2*:c.1420C>T (pacienti $1,6 \cdot 10^{-4}$, kontroly 0), *MSH2*:c.2606C>A (pacienti $4,8 \cdot 10^{-4}$, kontroly 0), *POLD1*:c.2939C>T (pacienti $1,6 \cdot 10^{-4}$, kontroly 0), *POLE*: c.4450A>G (pacienti $3,2 \cdot 10^{-4}$, kontroly 0), *EXO1*:c.746_747del (pacienti $1,6 \cdot 10^{-4}$, kontroly 0). Naopak v jednom případě byla vyšší frekvence výskytu dané varianty zaznamenána ve skupině kontrol – *PMS2*:c.1243G>A (pacienti 0, kontroly $1,2 \cdot 10^{-3}$).

6.4 Probandi s negativním výsledkem

Probandi, u kterých se v rámci re-analýzy nepodařilo zachytit žádnou patogenní, či VUS variantu v klinicky významných genech, tvoří 54 % souboru (po odečtení 2 zdravých probandů se jedná o 53 % souboru pacientů). Je nutné zmínit, že probandi v průběhu let prošli re-analýzou zaměřenou na geny *APC* a *MUTYH* již několikrát. Lze tedy předpokládat, že naprostá většina dosud popsáných patogenních variant v genech *APC* a *MUTYH* již byla u probandů zachycena. Případné kauzální mutace, které by při další re-analýze mohly být nalezeny, by tedy měly pocházet především z jiných klinicky významných genů, případně by se mohlo jednat o varianty v genech *APC* či *MUTYH*, které dosud nejsou rozpoznávány jako patogenní.

Co se samotné metodiky týče, panel CZECANCA v.1.2 se zaměřuje především na exony a exon-intronové oblasti 226 genů souvisejících s nádorovou predispozicí. Tyto oblasti jsou přitom vybírány především na základě sekvence hlavních transkripčních variant. Pokud je však prokázána klinická souvislost některých oblastí z minoritních transkripčních variant, je vhodné tyto oblasti také zařadit do NGS panelu, jako tomu bylo například v případě promotoru 1B genu *APC*. Je pravděpodobné, že v budoucnosti budou takové oblasti (ať už regulační, či přímo kódující) dodatečně přidány i pro některé další geny, které tento panel obsahuje, včetně genů se vztahem k CC/RC. Zachyceny by tak navíc mohly být různé varianty ovlivňující expresi studovaných genů. Pro molekulární diagnostiku mívají největší význam především varianty v promotorové oblasti a oblasti ovlivňující sestřih transkriptu.

Další z možných důvodů negativního výsledku re-analýzy by mohly představovat geny, které v panelu CZECANCA v.1.2 nejsou obsaženy. Například následující geny panel zatím vyšetřit neumožňuje, neboť jejich klinický význam související s dědičnými kolorektálními polypózami byl potvrzen teprve v poměrně nedávné době – *NTHL1*

(*NTHL1*-asociovaná polypóza), *RNF43* (syndrom serátní polypózy), *GREM1* (hereditární smíšený polypózní syndrom). Kromě těchto genů existuje také velké množství kandidátních genů patřících mezi GUS geny, u kterých souvislost s daným onemocněním dosud není prokázána. Například v rámci přehledové studie uvádí te Paske et al. (2020) více než 100 GUS genů, které by mohly hrát roli v dědičných polypózních syndromech a CC/RC. Varianty v těchto genech byly zaznamenány u nemocných jedinců s četností od několika členů v rámci jedné rodiny až po několik desítek rodin s celkovým počtem až po několik stovek nálezů.

Kromě monogenních forem kolorektálních polypóz je také možné, že někteří z pacientů s negativním výsledkem trpí některou z polygenních forem CC/RC, což by nejenom vysvětlovalo negativní nález re-analýzy, ale případně také absenci pozitivní rodinné anamnézy. Daca Alvarez et al. (2021) uvádí, že v průměru pouze 13 % případů CC/RC s časným nástupem (před 50. rokem života) lze vysvětlit nálezem vysoce penetrantní patogenní varianty v některém z genů se vztahem k CC/RC. Pozitivní rodinná anamnéza se přitom vyskytuje průměrně u 28 % případů. Velký podíl na dědičných formách CC/RC tak nejspíš má právě akumulace většího počtu variant s nižším efektem spolu s vlivem rizikových environmentálních faktorů.

Stejně jako v případě genů *APC* a *MUTYH*, mohou zdánlivě negativní pacienti nést patogenní variantu pouze v podobě somatické mozaiky. Pokud je mozaika omezena pouze na oblast gastrointestinálního traktu, nelze tyto varianty v DNA izolované z periferní krve detekovat.

Jako poslední, nicméně neméně významné, důvody negativních výsledků re-analýzy je nutné zmínit možnost sporadických forem kolorektálních polypů a CC/RC, a to zejména u pacientů bez pozitivní rodinné anamnézy.

6.5 Varianty v genu *DPYD*

Varianta *DPYD*:c.1236G>A detekovaná u 4 re-analyzovaných probandů patří mezi farmakogenteticky významné varianty důležité pro rozhodování o postupu při chemoterapeutické léčbě solidních nádorů (včetně CC/RC) pomocí 5-fluorouracilu (5-FU). Rychle proliferující nádorové buňky ochotně přijímají 5-FU a uvnitř buněk pak dochází ke konverzi 5-FU na fluoro-deoxyuridin monofosfát, který inhibuje aktivitu thymidylát syntázy podílející se na metabolismu pyrimidinů. Ve výsledku tak dochází k zablokování syntézy DNA.

Jedním z enzymů, zapojených do inaktivace 5-FU, je dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD) kódovaná zmíněným genem *DPYD*. Bylo zjištěno, že řada polymorfismů v genu *DPYD*, děděných autozomálně recesivním vzorem, vede k tvorbě enzymu DPD se sníženou aktivitou, případně až k tvorbě zcela nefunkčního enzymu (Dean a Kane 2012, Wigle et al. 2019). Jedincům se sníženou schopností metabolizovat 5-FU pak při podávání cytostatik na bázi 5-FU hrozí řada nežádoucích účinků způsobených toxicitou neinaktivovaného 5-FU ve zdravé tkáni. Toxicky působí především na srdce (ischemická choroba srdeční, arytmie, srdeční selhání), nervovou soustavu (encefalopatie, svalová neuropatie), GIT (záněty sliznic až tvorba vředů, nevolnost, zvracení, silné průjmy), a krevní elementy (snížený počet neutrofilů, trombocytů a erytrocytů). U variant způsobujících totální inaktivitu DPD může být toxicita až fatální (Dean a Kane 2012). Vyšetřením variant v genu *DPYD* je možné onkologickým pacientům individuálně nastavit dávku 5-FU s cílem omezit nežádoucí účinky, případně terapii 5-FU zcela vyloučit.

Reportovaná varianta c.1236G>A patří mezi jednu ze 4 nejčastějších variant ovlivňujících aktivitu DPD. Způsobuje pouze sníženou aktivitu DPD a v případě chemoterapie 5-FU lze proto toxické účinky potlačit snížením dávky o 25 % (Amstutz et al. 2018). Ve studii Henricks et al. (2018) u pacientů s touto variantou snížení dávky o 25 % nebylo dostačující a pro větší bezpečnost proto autoři navrhují snížení až o 50 %.

6.6 Další postup

Prostřednictvím klinického genetika budou pacienti s detekovanou patogenní variantou v některém z genů se vztahem k tvorbě kolorektálních polypů či jejich příbuzní o této skutečnosti informováni. Každá z reportovaných variant představuje pro rodiny probandů důležitou informaci, díky které je možné zachytit v časném stádiu pomocí screeningových vyšetření a na základě profylaktické operace předejít rozvoji či dalšímu rozšiřování CC/RC. Stejný postup bude zvolen i v případě probandů se zachycenou farmakogeneticky významnou variantou v genu *DPYD*. Na probandy s VUS variantami je klinicky nahlíženo jako na jedince s negativním výsledkem.

Další fáze re-analýzy

U probandů s negativním výsledkem se nabízí několik možností, jakým způsobem by další fáze re-analýzy mohla proběhnout. Jak již bylo dříve zmíněno, předpokládá se, že naprostá většina dosud popsaných variant v genu *APC* již byla zachycena. Další re-

analýza by se proto měla zaměřit především na ostatní klinicky významné geny. Výjimku by však mohly tvořit například některé varianty s negativním vlivem na sestřih pre-mRNA.

Určitý počet případů by mohl být objasněn vyšetřením genů *NTHL1*, *GREM1* a *RNF43*, které jsou zodpovědné za další, i když vzácné, formy kolorektálních polypóz. Dokud však tyto geny nebudou zařazeny do panelu CZECANCA či jiného dostupného NGS panelu, bude nutné zvolit postup modifikovaného Sangerova sekvenování. Zde přichází vhod fakt, že se jedná o poměrně krátké geny – *NTHL1* 6 exonů o délce 1030 bp (NM_002528.7), *GREM1* 2 exony o délce 14575 bp (NM_013372.7), *RNF43* 10 exonů o délce 4522 bp (NM_017763.6). Alternativně by sekvence těchto genů mohly být získány také pomocí celoexomového či celogenomového sekvenování metodou NGS, nicméně taková analýza by musela být provedena v jiné laboratoři, která se na ni specializuje (v laboratoři molekulární genetiky ÚBLG 1. LF UK a VFN se běžně neprovádí).

Přínosné informace by mohla poskytnout analýza klinicky významných genů na úrovni sekvence mRNA, která by pomohla odhalit, zda se v sekvenci genů vyskytují varianty negativně ovlivňující sestřih. Právě tímto způsobem by potenciálně mohly být odhaleny některé další kauzální mutace v genu *APC*. Tato úroveň analýzy však vyžaduje odběr čerstvého biologického materiálu. Vzhledem ke kombinaci věku řady pacientů v době prvotní diagnostiky (před 16–27 lety), jejich tehdejšímu klinickému obrazu a prognóze CC/RC je bohužel pravděpodobné, že řada pacientů již nebude naživu. V případě ochoty zúčastnit se studie by materiál mohl být získán také od nemocných příbuzných.

Varianty somatické mozaiky by bylo možné zachytit analýzou DNA z patologické tkáně – v případě dostupnosti z parafinových bloků, jinak z čerstvé tkáně, kde nastává stejný problém se získáním materiálu jako v případě analýzy RNA.

S postupem času bude pravděpodobně objasněn klinický význam některých GUS genů a VUS variant. Jako poslední možnost lze zmínit také revizi výsledků současné re-analýzy.

7. Souhrn

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) způsobená mutacemi v tumor supresorovém genu *APC* představuje jednu z forem dědičných kolorektálních polypóz s vysokým rizikem malignizace polypů v adenokarcinom tlustého střeva a/nebo konečníku (CC/RC). Molekulární diagnostika FAP přináší důležité informace nejen pro pacienty, ale také pro členy jejich rodiny. Včasná dispenzarizace totiž umožňuje zachytit onemocnění v raném stádiu s dobrou prognózou v případě managementu onemocnění a podstoupení profylaktické operace.

Cílem této práce bylo využít přístup cíleného sekvenování nové generace (NGS) k re-analýze souboru 78 suspektních probandů, u kterých se v minulosti suspektní diagnózu nepodařilo tehdejšími metodami potvrdit. K obohacení NGS knihovny o cílové sekvence byl využit panel CZEKANCA v.1.2 (Czech Cancer Panel for Clinical Application), který umožňuje vyšetřit 226 genů souvisejících se zvýšenou nádorovou predispozicí.

Suspektní diagnózu FAP onemocnění se v rámci re-analýzy podařilo potvrdit u 14 pacientů. Zajímavé nálezy v genu *APC* představují především 2 různé rozsáhlé delece promotoru 1B, duplikace exonu 15 a dosud nepopsaná varianta c.4079del.

U dalších 8 pacientů byla na základě výsledků re-analýzy suspektní diagnóza přehodnocena. Detekovány byly patogenní varianty v genech souvisejících s dalšími dědičnými formami predispozice k tvorbě CC/RC – Lynchovým syndromem, Peutzovým-Jeghersovým syndromem, PTEN-hamartomatózním tumorovým syndromem a syndromem juvenilní polypózy – přičemž varianty *MSH2*:c.637delC, *STK11*:c.426_427del a *SMAD4*:c.593del představují nové, dosud nepublikované varianty.

V případě dalších 10 probandů byly v genech souvisejících s tvorbou kolorektálních polypů detekovány pouze varianty s nejasným klinickým významem a patogenní varianty v genech s nejasným klinickým významem. Na tyto probandy však na základě oficiálních doporučení není nahlíženo stejným způsobem jako na pacienty, u kterých byla zachycena patogenní varianta v klinicky významných genech.

U 4 probandů byla zachycena varianta c.1236G>A v genu *DPYD*, která je spojována se sníženou aktivitou vznikajícího produktu dihydropyrimidin dehydrogenázy, jednoho z enzymů zapojených do metabolismu cytostatika 5-fluorouracilu. U jedinců se sníženou aktivitou tohoto enzymu bývá administrována snížená dávka 5-fluorouracilu, která zabraňuje jeho toxickému účinku na buňky zdravé tkáně.

Metoda NGS se ukázala být účinným nástrojem pro zvýšení diagnostického výtěžku, která umožnila confirmaci či přehodnocení suspektní diagnózy u 29 % pacientů. Zlepšení záchytnosti bylo dosaženo zejména díky možnosti zaměřit se na některé dosud neanalyzované oblasti genu *APC* (promotorová oblast, druhá polovina posledního exonu) a paralelně také vyšetřit řadu dalších klinicky významných genů. V porovnání s předchozími použitými metodami analýzy navíc NGS vykazuje vyšší spolehlivost detekce genetických variant.

Dalšího vylepšení diagnostického výtěžku v příští fázi re-analýzy by mohlo být dosaženo analýzou dalších klinicky souvisejících genů (zejména *NTHL1*, *GREM1*, *RNF43*), které panel CZEKANCA v.1.2 zatím neobsahuje, sekvenací mRNA pro detekci sestřihových variant, ale také analýzou DNA izolované z patologické tkáně pro zachycení potenciálních variant somatické mozaiky. Zároveň je nezbytné, aby se výzkum zaměřil na posouzení významu variant a genů, jejichž klinická souvislost s CC/RC dosud není objasněná.

Seznam použité literatury

1. Aceto, G. et al. (2005): Mutations of *APC* and *MYH* in Unrelated Italian Patients with Adenomatous Polyposis Coli. *Hum. Mutat.* 26(4): 394–394.
2. Adam, R. et al. (2016): Exome Sequencing Identifies Biallelic *MSH3* Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *Am. J. Hum. Genet.* 99(2): 337–351.
3. Adil, E. (2014): Corrective Measures of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Limitations. *J. Environ. Sci. Technol.* 8(1): 1–12.
4. Aihara, H., Kumar, N., Thompson, C. C. (2014): Diagnosis, Surveillance, and Treatment Strategies for Familial Adenomatous Polyposis: Rationale and Update. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 26(3): 255–262.
5. Alam, N. A. et al. (2003): Germline Deletions of *EXO1* Do Not Cause Colorectal Tumors and Lesions Which Are Null for *EXO1* Do Not Have Microsatellite Instability. *Cancer Genet. Cytogenet.* 147(2): 121–127.
6. Almurieghi, M. et al. (2015): Loss-of-Function Mutation in *APC2* Causes Sotos Syndrome Features. *Cell Rep.* 10(9): 1585–1598.
7. Amersi, F., Agustin, M., Ko, C. Y. (2005): Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services. *Clin. Colon Rectal Surg.* 18(3): 133–140.
8. Amstutz, U. et al. (2018): Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clin. Pharmacol. Ther.* 103(2): 210–216.
9. Aoki, K., Taketo, M. M. (2007): Adenomatous Polyposis Coli (*APC*): A Multi-Functional Tumor Suppressor Gene. *J. Cell Sci.* 120(19): 3327–3335.
10. Araujo, L. F., Molfetta, G. A., Vincenzi, O. C., Huber, J., Teixeira, L. A., Ferraz, V. E., Silva, W. A. (2019): Molecular Basis of Familial Adenomatous Polyposis in the Southeast of Brazil: Identification of Six Novel Mutations. *Int. J. Biol. Markers* 34(1): 80–89.
11. Aretz, S., Stienen, D., Uhlhaas, S., Pagenstecher, C., Mangold, E., Caspari, R., Propping, P., Friedl, W. (2005): Large Submicroscopic Genomic *APC* Deletions Are a Common Cause of Typical Familial Adenomatous Polyposis. *J. Med. Genet.* 42(2): 185–192.
12. Aretz, S., Uhlhaas, S., Sun, Y., Pagenstecher, C., Mangold, E., Caspari, R., Möslein, G., Schulmann, K., Propping, P., Friedl, W. (2004): Familial Adenomatous Polyposis: Aberrant Splicing Due to Missense or Silent Mutations in the *APC* Gene. *Hum. Mutat.* 24(5): 370–380.
13. Baena, R., Salinas, P. (2015): Diet and Colorectal Cancer. *Maturitas* 80 (3): 258–264.
14. Balaguer, F., Leoz, M., Carballal, S., Moreira, L., Ocaña, T. (2015): The Genetic Basis of Familial Adenomatous Polyposis and Its Implications for Clinical Practice and Risk Management. *Appl. Clin. Genet.* 16(8): 95–107.
15. Baldino, M. E., Koth, V. S., Silva, D. N., Figueiredo, M. A., Salum, F. G., Cherubini, K. (2019): Gardner Syndrome with Maxillofacial Manifestation: A Case Report. *Spec. Care Dentist.* 39(1): 65–71.
16. Bapat, B. V. et al. (1999): Family History Characteristics, Tumor Microsatellite Instability and Germline *MSH2* and *MLH1* Mutations in Hereditary Colorectal Cancer. *Hum. Genet.* 104(2): 167–176.
17. Beggs, A. D. et al. (2010): Peutz-Jeghers Syndrome: A Systematic Review and Recommendations for Management. *Gut* 59(7): 975–986.
18. Bell, C. J. et al. (2011): Carrier Testing for Severe Childhood Recessive Diseases by Next-Generation Sequencing. *Sci. Transl. Med.* 3(65): 1–16.
19. Bell, D. W. et al. (1999): Heterozygous Germ Line *hCHK2* Mutations in Li-Fraumeni Syndrome. *Science* 286(5449): 2528–2531.
20. Bertario, L., Russo, A., Sala, P., Varesco, L., Crucianelli, R., Frattini, M., Pierotti, M. A., Radice, P. (2004): *APC* Genotype Is Not a Prognostic Factor in Familial Adenomatous Polyposis Patients With Colorectal Cancer. *Dis. Colon Rectum* 47(10): 1662–1669.
21. Bisgaard, M. L., Ripa, R. S., Bülow, S. (2004): Mutation Analysis of the Adenomatous Polyposis Coli (*APC*) Gene in Danish Patients with Familial Adenomatous Polyposis (FAP). *Hum. Mutat.* 23(5):1–5.
22. Blumenthal, G. M., Dennis, P. A. (2008): *PTEN* Hamartoma Tumor Syndromes. *Eur. J. Hum. Genet.* 16(11): 1289–1300.
23. Bodian, D. L., McCutcheon, J. N., Kothiyal, P., Huddleston, K. C., Iyer, R. K., Vockley, J. G., Niederhuber, J. E. (2014): Germline Variation in Cancer-Susceptibility Genes in a Healthy, Ancestrally Diverse Cohort: Implications for Individual Genome Sequencing. *PLoS ONE* 9(4): 1–12.
24. Bogaert, J., Prenen, H. (2014): Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Ann. Gastroenterol.* 27(1): 9–14.

25. Buchanan, D. D. et al. (2018): Risk of Colorectal Cancer for Carriers of a Germ-Line Mutation in *POLE* or *POLD1*. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 20(8): 890–895.
26. Buchanan, D. D., Roberts, A., Walsh, M. D., Parry, S., Young, J. P. (2010): Lessons from Lynch Syndrome: A Tumor Biology-Based Approach to Familial Colorectal Cancer. *Future Oncol.* 6(4): 539–549.
27. Burger, B., Cattani, N., Trueb, S., de Lorenzo, R., Albertini, M., Bontognali, E., Itin, C., Schaub, N., Itin, P. H., Heinimann, K. (2011): Prevalence of Skin Lesions in Familial Adenomatous Polyposis: A Marker for Presymptomatic Diagnosis? *The Oncologist* 16(12): 1698–1705.
28. Busbait, S., Al-Babtain, A., Tawfeeq, Y., AlJehani, Y., Al-Buainain, H. (2019): Turcot’s Syndrome Presenting as an Acute Abdomen. *J. Pediatr. Surg. Case Rep.* 40(1): 17–19.
29. Cai, Z., Chehab, N. H., Pavletich, N. P. (2009): Structure and Activation Mechanism of the CHK2 DNA Damage Checkpoint Kinase. *Mol. Cell* 35(6): 818–829.
30. Carson, D. J., Santoro, I. M., Groden, J. (2004): Isoforms of the APC Tumor Suppressor and Their Ability to Inhibit Cell Growth and Tumorigenicity. *Oncogene* 23(42): 7144–7148.
31. de Chadarevian, J.-P., Dunn, S., Malatack, J. J., Ganguly, A., Blecker, U., Punnett, H. H. (2002): Chromosome Rearrangement with No Apparent Gene Mutation in Familial Adenomatous Polyposis and Hepatocellular Neoplasia. *Pediatr. Dev. Pathol.* 5(1): 69–75.
32. Charames, G. S. (2002): A Novel Aberrant Splice Site Mutation in the *APC* Gene. *J. Med. Genet.* 39(10): 754–757.
33. Charames, G. S. et al. (2008): A Large Novel Deletion in the *APC* Promoter Region Causes Gene Silencing and Leads to Classical Familial Adenomatous Polyposis in a Manitoba Mennonite Kindred. *Hum. Genet.* 124(5): 535–541.
34. Cheah, P. Y., Wong, Y. H., Koh, P. K., Loi, C., Chew, M. H., Tang, C. L. (2014): A Novel Indel in Exon 9 of *APC* Upregulates a “skip Exon 9” Isoform and Causes Very Severe Familial Adenomatous Polyposis. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 22(6): 833–836.
35. Cheah, P. Y., Wong, Y. H., Loi, C., Koh, P. K., Tang, C. L. (2012): Why Does This *APC* Exon 9 Mutation Causes Severe and Not Attenuated Familial Adenomatous Polyposis (FAP) *In: Molecular and Cellular Biology. American Association for Cancer Research*, 4011–4011.
36. Chen, J.-H., Zheng, J.-J., Guo, Q., Liu, C., Luo, B., Tang, S.-B., Cheng, J.-D., Huang, E.-W. (2017): A Novel Mutation in the *STK11* Gene Causes Heritable Peutz-Jeghers Syndrome – a Case Report. *BMC Med. Genet.* 18(1): 1–6.
37. Chow, E., Macrae, F. (2005): A Review of Juvenile Polyposis Syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20(11): 1634–1640.
38. Chubb, D., Broderick, P., Frampton, M., Kinnersley, B., Sherborne, A., Penegar, S., Lloyd, A., Ma, Y. P., Dobbins, S. E., Houlston, R. S. (2015): Genetic Diagnosis of High-Penetrance Susceptibility for Colorectal Cancer (CRC) Is Achievable for a High Proportion of Familial CRC by Exome Sequencing. *J. Clin. Oncol.* 33(5): 426–432.
39. Ciavarella, M. et al. (2018): Somatic *APC* Mosaicism and Oligogenic Inheritance in Genetically Unsolved Colorectal Adenomatous Polyposis Patients. *Eur. J. Hum. Genet.* 26(3): 387–395.
40. Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S. J., Lu, X., Ruden, D. M. (2012): A Program for Annotating and Predicting the Effects of Single Nucleotide Polymorphisms, SnpEff: SNPs in the Genome of *Drosophila Melanogaster* Strain W1118; Iso-2; Iso-3. *Fly (Austin)* 6(2): 80–92.
41. Crabtree, M., Sieber, O. M., Lipton, L., Hodgson, S. V., Lamlum, H., Thomas, H. J. W., Neale, K., Phillips, R. K. S., Heinimann, K., Tomlinson, I. P. M. (2003): Refining the Relation between ‘First Hits’ and ‘Second Hits’ at the *APC* Locus: The ‘Loose Fit’ Model and Evidence for Differences in Somatic Mutation Spectra among Patients. *Oncogene* 22(27): 4257–4265.
42. Cragun, D., Radford, C., Dolinsky, J. S., Caldwell, M., Chao, E., Pal, T. (2014): Panel-Based Testing for Inherited Colorectal Cancer: A Descriptive Study of Clinical Testing Performed by a US Laboratory. *Clin. Genet.* 86(6): 510–520.
43. Cremin, C. et al. (2020): Burden of Hereditary Cancer Susceptibility in Unselected Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Referred for Germline Screening. *Cancer Med.* 9 (11): 4004–4013.
44. Croner, R. S., Brueckl, W. M., Reingruber, B., Hohenberger, W., Guenther, K. (2005): Age and Manifestation Related Symptoms in Familial Adenomatous Polyposis. *BMC Cancer* 5(1): 1–7.
45. Cui, D. H., Jiang, K. D., Jiang, S. D., Xu, Y. F., Yao, H. (2005): The Tumor Suppressor Adenomatous Polyposis Coli Gene Is Associated with Susceptibility to Schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 10(7): 669–677.
46. Cybulski, C. et al. (2004): *CHEK2* Is a Multiorgan Cancer Susceptibility Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 75(6): 1131–1135.

47. Cybulski, C. et al. (2007): Germline *CHEK2* Mutations and Colorectal Cancer Risk: Different Effects of a Missense and Truncating Mutations? *Eur. J. Hum. Genet.* 15(2): 237–241.
48. Daca Alvarez, M., Quintana, I., Terradas, M., Mur, P., Balaguer, F., Valle, L. (2021): The Inherited and Familial Component of Early-Onset Colorectal Cancer. *Cells* 10(3): 1–19.
49. Dashti, H., Dehzangi, A., Bayati, M., Breen, J., Lovell, N., Ebrahimi, D., Rabiee, H. R., Alinejad-Rokny, H. (2020): Integrative Analysis of Mutated Genes and Mutational Processes Reveals Seven Colorectal Cancer Subtypes [Preprint].
50. Dean, L., Kane, M. (2012): Fluorouracil Therapy and DPYD Genotype *In*: Pratt, V. M., Scott, S. A., Pirmohamed, M., Esquivel, B., Kane, M. S., Kattman, B. L., Malheiro, A. J. (eds.): *Medical Genetics Summaries* [Internet]. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).
51. Deihimi, S. et al. (2017): *BRCA2*, *EGFR*, and *NTRK* Mutations in Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancers with *MSH2* or *MLH1* Mutations. *Oncotarget* 8(25): 39945–39962.
52. Dephoure, N., Zhou, C., Villén, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J., Gygi, S. P. (2008): A Quantitative Atlas of Mitotic Phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(31): 10762–10767.
53. Dipro, S., Al-Otaibi, F., Alzahrani, A., Ulhaq, A., Al Shail, E. (2012): Turcot Syndrome: A Synchronous Clinical Presentation of Glioblastoma Multiforme and Adenocarcinoma of the Colon. *Case Rep. Oncol. Med.* 2012: 1–6.
54. Dixon, K., Senz, J., Kaurah, P., Huntsman, D. G., Schrader, K. A. (2021): Rare *APC* Promoter 1B Variants in Gastric Cancer Kindreds Unselected for Fundic Gland Polyposis. *Gut* 70(7): 1415–1416.
55. Dong, X. et al. (2003): Mutations in *CHEK2* Associated with Prostate Cancer Risk. *Am. J. Hum. Genet.* 72(2): 270–280.
56. Durno, C. A. et al. (2015): Phenotypic and Genotypic Characterisation of Biallelic Mismatch Repair Deficiency (BMMR-D) Syndrome. *Eur. J. Cancer* 51(8): 977–983.
57. Evans, D. G., Turnbull, C., Woodward, E. R. (2019): Concern Regarding Classification of Germline *TP53* Variants as Likely Pathogenic. *Hum. Mutat.* 40(6): 828–831.
58. Fagerberg, L. et al. (2014): Analysis of the Human Tissue-Specific Expression by Genome-Wide Integration of Transcriptomics and Antibody-Based Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 13(2):397–406.
59. Fearnhead, N., Crabtree, M., Bodmer, W. (2001): The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.* 10(7): 721–733.
60. Ferrari, M., Cremonesi, L., Stenirri, S. (2008): 2. Post-Natal Molecular Diagnosis of Inherited Diseases. *EJIFCC* 19(1): 7–12.
61. Forero, D. A., González-Giraldo, Y. (2020): Integrative In Silico Analysis of Genome-Wide DNA Methylation Profiles in Schizophrenia. *J. Mol. Neurosci* 70(11): 1887–1893.
62. Fornasari, M., Magris, R., De Re, V., Bidoli, E., Canzonieri, V., Maiero, S., Viel, A., Cannizzaro, R. (2018): Molecular and Pathological Features of Gastric Cancer in Lynch Syndrome and Familial Adenomatous Polyposis. *Int. J. Mol. Sci.* 19(6): 1–12.
63. Fostira, F., Yannoukakos, D. (2010): A Distinct Mutation on the Alternative Splice Site of *APC* Exon 9 Results in Attenuated Familial Adenomatous Polyposis Phenotype. *Fam. Cancer* 9(3): 395–400.
64. Friedl, W. (2001): Can *APC* Mutation Analysis Contribute to Therapeutic Decisions in Familial Adenomatous Polyposis? Experience from 680 FAP Families. *Gut* 48(4): 515–521.
65. Friedl, W., Aretz, S. (2005): Familial Adenomatous Polyposis: Experience from a Study of 1164 Unrelated German Polyposis Patients. *Hered. Cancer Clin. Pract.* 3(3): 95–114.
66. Gardner, E. J. (1962): Follow-up Study of a Family Group Exhibiting Dominant Inheritance for a Syndrome Including Intestinal Polyps, Osteomas, Fibromas and Epidermal Cysts. *Am. J. Hum. Genet.* 14: 376–390.
67. Giles, R. H., Voest, E. E. (2005): Tumor Suppressors *APC* and *VHL*: Gatekeepers of the Intestine and Kidney *In*: Macieira-Coelho, A. (ed.): *Developmental Biology of Neoplastic Growth. Progress in Molecular and Subcellular Biology.* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 151–181.
68. Gosein, M. A., Narinesingh, D., Nixon, C. A.-A. C., Goli, S. R., Maharaj, P., Sinanan, A. (2016): Multi-Organ Benign and Malignant Tumors: Recognizing Cowden Syndrome: A Case Report and Review of the Literature. *BMC Res. Notes* 9(1): 1–7.
69. Groden, J., Gelbert, L., Thliveris, A., Nelson, L., Robertson, M., Joslyn, G., Samowitz, W., Spirio, L., Carlson, M., Burt, R. (1993): Mutational Analysis of Patients with Adenomatous Polyposis: Identical Inactivating Mutations in Unrelated Individuals. *Am. J. Hum. Genet.* 52(2): 263–272.
70. Grolleman, J. E. et al. (2019): Mutational Signature Analysis Reveals *NTHL1* Deficiency to Cause a Multi-Tumor Phenotype. *Cancer Cell* 35(2): 256–266.
71. Groves, C., Lamlum, H., Crabtree, M., Williamson, J., Taylor, C., Bass, S., Cuthbert-Heavens, D., Hodgson, S., Phillips, R., Tomlinson, I. (2002): Mutation Cluster Region, Association Between

- Germline and Somatic Mutations and Genotype-Phenotype Correlation in Upper Gastrointestinal Familial Adenomatous Polyposis. *Am. J. Pathol.* 160(6): 2055–2061.
72. Gupta, S. et al. (2019): NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal, Version 2.2019. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 17(9): 1032–1041.
 73. Hagen, C. E., Setia, N., Lauwers, G. Y. (2015): Familial Adenomatous Polyposis: A Review of Gastrointestinal Manifestations. *Diagn. Histopathol.* 21(4): 152–160.
 74. Haigis, K. M. (2013): *Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer*. Springer, New York-Heidelberg-Dordrecht-London.
 75. Half, E., Bercovich, D., Rozen, P. (2009): Familial Adenomatous Polyposis. *Orphanet J. Rare Dis.* 4(1): 1–23.
 76. Hamilton, S. R. et al. (1995): The Molecular Basis of Turcot's Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 332 (13): 839–847.
 77. Handra-Luca, A., Condroyer, C., de Moncuit, C., Tepper, M., Fléjou, J.-F., Thomas, G., Olschwang, S. (2005): Vessels' Morphology in *SMAD4* and *BMPRIA*-Related Juvenile Polyposis. *Am. J. Med. Genet. A.* 138A(2): 113–117.
 78. Hankey, W., Frankel, W. L., Groden, J. (2018): Functions of the *APC* Tumor Suppressor Protein Dependent and Independent of Canonical WNT Signaling: Implications for Therapeutic Targeting. *Cancer Metastasis Rev.* 37(1): 159–172.
 79. Haumaier, F., Sterlacci, W., Vieth, M. (2017): Histological and Molecular Classification of Gastrointestinal Polyps. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 31(4): 369–379.
 80. Hegde, M., Mao, R., Samowitz, W., Ganguly, A. (2014): ACMG Technical Standards and Guidelines for Genetic Testing for Inherited Colorectal Cancer (Lynch Syndrome, Familial Adenomatous Polyposis, and MYH-Associated Polyposis). *Genet. Med.* 16(1): 101–116.
 81. Henricks, L. M. et al. (2018): *DPYD* Genotype-Guided Dose Individualisation of Fluoropyrimidine Therapy in Patients with Cancer: A Prospective Safety Analysis. *Lancet Oncol.* 19(11): 1459–1467.
 82. Hes, F. J., Nielsen, M., Bik, E. C., Konvalinka, D., Wijnen, J. T., Bakker, E., Vasen, H. F. A., Breuning, M. H., Tops, C. M. J. (2007): Somatic *APC* Mosaicism: An Underestimated Cause of Polyposis Coli. *Gut* 57(1): 71–76.
 83. Hockey, K. A., Mulcahy, M. T., Montgomery, P., Levitt, S. (1989): Deletion of Chromosome 5q and Familial Adenomatous Polyposis. *J. Med. Genet.* 26(1): 61–62.
 84. Hu, C., Hart, S. N., Bamlet, W. R., Moore, R. M., Nandakumar, K., Eckloff, B. W., Lee, Y. K., Petersen, G. M., McWilliams, R. R., Couch, F. J. (2016): Prevalence of Pathogenic Mutations in Cancer Predisposition Genes among Pancreatic Cancer Patients. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 25(1): 207–211.
 85. Ichinoe, A. (2004): Identification and Characterization of Two Forms of Mouse *MUTYH* Proteins Encoded by Alternatively Spliced Transcripts. *Nucleic Acids Res.* 32(2): 477–487.
 86. Idos, G., Valle, L. (2021): Lynch Syndrome *In*: Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J., Mirzaa, G., Amemiya, A. (eds.): *GeneReviews®* [Internet]. University of Washington, Seattle (WA).
 87. Ijspeert, J. E. G. et al. (2017): Clinical Risk Factors of Colorectal Cancer in Patients with Serrated Polyposis Syndrome: A Multicentre Cohort Analysis. *Gut* 66(2): 278–284.
 88. Ikenoue, T. et al. (2015): Attenuated Familial Adenomatous Polyposis with Desmoids Caused by an APC Mutation. *Hum. Genome Var.* 2: 1–3.
 89. Imura, T., Wang, X., Noda, T., Sofroniew, M. V., Fushiki, S. (2010): Adenomatous Polyposis Coli Is Essential for Both Neuronal Differentiation and Maintenance of Adult Neural Stem Cells in Subventricular Zone and Hippocampus. *STEM CELLS* 28(11): 2053–2064.
 90. International Agency for Research on Cancer. Colorectal Cancer. 2020.
 91. Iwaizumi, M. et al. (2015): A Novel *APC* Mosaicism in a Patient with Familial Adenomatous Polyposis. *Hum. Genome Var.* 2(1): 1–4.
 92. Jaeger, E. et al. (2012): Hereditary Mixed Polyposis Syndrome Is Caused by a 40-Kb Upstream Duplication That Leads to Increased and Ectopic Expression of the BMP Antagonist GREM1. *Nat. Genet.* 44(6): 699–703.
 93. Jagmohan-Changur, S. et al. (2003): *EXO1* Variants Occur Commonly in Normal Population: Evidence against a Role in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer Res* 63(1): 154–158.
 94. Jaspersen, K. W., Patel, S. G., Ahnen, D. J. (2017): APC-Associated Polyposis Conditions *In*: Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J., Stephens, K., Amemiya, A. (eds.): *GeneReviews®* [Internet]. University of Washington, Seattle (WA).
 95. Jelsig, A., Qvist, N., Brusgaard, K., Nielsen, C., Hansen, T., Ousager, L. (2014): Hamartomatous Polyposis Syndromes: A Review. *Orphanet J. Rare Dis.* 9(1): 1–10.

96. Jiang, S.-S. et al. (2015): A Novel Pathogenic Germline Mutation in the Adenomatous Polyposis Coli Gene in a Chinese Family with Familial Adenomatous Coli. *Oncotarget* 6(29): 27267–27274.
97. Jirásek, V., Olschwang, S., Boisson, C., Janda, J., Thomas, G., Martásek, P. (1997): Familial adenomatous polyposis coli in the Czech population. I. Detection of an additional 3 mutations out of a total of 7 in exon 15 of the *APC* gene. *Cas. Lek. Cesk.* 136(23): 733–738.
98. de Jong, M. M. et al. (2005): Colorectal Cancer and the *CHEK2* 1100delC Mutation. *Genes. Chromosomes Cancer* 43(4): 377–382.
99. Kadiyska, T. K., Todorov, T. P., Bichev, S. N., Vazharova, R. V., Nossikoff, A. V., Savov, A. S., Mitev, V. I. (2014): *APC* Promoter 1B Deletion in Familial Polyposis-Implications for Mutation-Negative Families. *Clin. Genet.* 85(5): 452–457.
100. Kaneyasu, T. et al. (2020): Prevalence of Disease-Causing Genes in Japanese Patients with *BRCA1/2*-Wildtype Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *NPJ Breast Cancer* 6: 1–13.
101. Kariv, R., Caspi, M., Fliss-Isakov, N., Shorer, Y., Shor, Y., Rosner, G., Brazowski, E., Beer, G., Cohen, S., Rosin-Arbesfeld, R. (2020): Resorting the Function of the Colorectal Cancer Gatekeeper Adenomatous Polyposis Coli. *Int. J. Cancer* 146(4): 1064–1074.
102. Kato, S., Han, S.-Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., Ishioka, C. (2003): Understanding the Function-Structure and Function-Mutation Relationships of P53 Tumor Suppressor Protein by High-Resolution Missense Mutation Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(14): 8424–8429.
103. Khattab, A., Monga, D. K. (2020): Turcot Syndrome *In: StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
104. Kilpivaara, O., Alhopuro, P., Vahteristo, P., Aaltonen, L. A., Nevanlinna, H. (2006): *CHEK2* I157T Associates with Familial and Sporadic Colorectal Cancer. *J. Med. Genet.* 43(7): 1–4.
105. Kilpivaara, O., Laiho, P., Aaltonen, L. A., Nevanlinna, H. (2003): *CHEK2* 1100delC and Colorectal Cancer. *J. Med. Genet.* 40 (10): 1–3.
106. Kim, B., Giardiello, F. M. (2011): Chemoprevention in Familial Adenomatous Polyposis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25(4–5): 607–622.
107. Kim, B., Won, D., Jang, M., Kim, H., Choi, J. R., Kim, T. I., Lee, S.-T. (2019): Next-Generation Sequencing with Comprehensive Bioinformatics Analysis Facilitates Somatic Mosaic *APC* Gene Mutation Detection in Patients with Familial Adenomatous Polyposis. *BMC Med. Genomics* 12(1): 1–7.
108. Kim, I. J., Ku, J. L., Yoon, K. A., Heo, S. C., Jeong, S. Y., Choi, H. S., Hong, K. H., Yang, S. K., Park, J. G. (2000): Germline Mutations of the *Dpc4* Gene in Korean Juvenile Polyposis Patients. *Int. J. Cancer* 86(4): 529–532.
109. Kleibl, Z., Havranek, O., Hlavata, I., Novotny, J., Sevcik, J., Pohlreich, P., Soucek, P. (2009): The *CHEK2* Gene I157T Mutation and Other Alterations in Its Proximity Increase the Risk of Sporadic Colorectal Cancer in the Czech Population. *Eur. J. Cancer* 45(4): 618–624.
110. Kuiper, R. P., Nielsen, M., De Voer, R. M., Hoogerbrugge, N. (2020): *NTHL1* Tumor Syndrome *In: Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J., Mirzaa, G., Amemiya, A. (eds.): GeneReviews®* [Internet]. University of Washington, Seattle (WA).
111. Kunttas-Tatli, E., Roberts, D. M., McCartney, B. M. (2014): Self-Association of the *APC* Tumor Suppressor Is Required for the Assembly, Stability, and Activity of the Wnt Signaling Destruction Complex. *Mol. Biol. Cell* 25(21): 3424–3436.
112. Lagarde, A. et al. (2010): Germline *APC* Mutation Spectrum Derived from 863 Genomic Variations Identified through a 15-Year Medical Genetics Service to French Patients with FAP. *J. Med. Genet.* 47(10): 721–722.
113. Lamlum, H. et al. (1999): The Type of Somatic Mutation at *APC* in Familial Adenomatous Polyposis Is Determined by the Site of the Germline Mutation: A New Facet to Knudson’s “two-Hit” Hypothesis. *Nat. Med.* 5(9): 1071–1075.
114. Lamlum, H. et al. (2000): Germline *APC* Variants in Patients with Multiple Colorectal Adenomas, with Evidence for the Particular Importance of E1317Q. *Hum. Mol. Genet.* 9(15): 2215–2221.
115. Larsen Haidle, J., Howe, J. R. (2017): Juvenile Polyposis Syndrome *In: Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J., Mirzaa, G., Amemiya, A. (eds.): GeneReviews®* [Internet]. University of Washington, Seattle (WA).
116. Lesko, A., Goss, K., Prospero, J. (2014): Exploiting *APC* Function as a Novel Cancer Therapy. *Curr. Drug Targets* 15(1): 90–102.
117. Li, J. et al. (2016): Point Mutations in Exon 1B of *APC* Reveal Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach as a Familial Adenomatous Polyposis Variant. *Am. J. Hum. Genet.* 98(5): 830–842.

118. Lin, Y., Lin, S., Baxter, M. D., Lin, L., Kennedy, S. M., Zhang, Z., Goodfellow, P. J., Chapman, W. C., Davidson, N. O. (2015): Novel *APC* Promoter and Exon 1B Deletion and Allelic Silencing in Three Mutation-Negative Classic Familial Adenomatous Polyposis Families. *Genome Med.* 7(1): 1–9.
119. Lui, C., Mills, K., Brocardo, M. G., Sharma, M., Henderson, B. R. (2012): *APC* as a Mobile Scaffold: Regulation and Function at the Nucleus, Centrosomes, and Mitochondria. *IUBMB Life* 64(3): 209–214.
120. Lützen, A., de Wind, N., Georgijevic, D., Nielsen, F. C., Rasmussen, L. J. (2008): Functional Analysis of HNPCC-Related Missense Mutations in *MSH2*. *Mutat. Res.* 645(1–2): 44–55.
121. Marabelli, M., Gismondi, V., Ricci, M. T., Vetro, A., Abou Khouzam, R., Rea, V., Vitellaro, M., Zuffardi, O., Varesco, L., Ranzani, G. N. (2017): A Novel *APC* Promoter 1B Deletion Shows a Founder Effect in Italian Patients with Classical Familial Adenomatous Polyposis Phenotype. *Genes Chromosomes Cancer* 56(12): 846–854.
122. Martin-Morales, L. et al. (2018): Novel Genetic Mutations Detected by Multigene Panel Are Associated with Hereditary Colorectal Cancer Predisposition. *PLOS ONE* 13(9): 1–14.
123. McDonald, J., Bayrak-Toydemir, P., DeMille, D., Wooderchak-Donahue, W., Whitehead, K. (2020): Curaçao Diagnostic Criteria for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Is Highly Predictive of a Pathogenic Variant in *ENG* or *ACVRL1* (*HHT1* and *HHT2*). *Genet. Med.* 22(7): 1201–1205.
124. McGarrity, T. J., Amos, C. I., Baker, M. J. (2016): Peutz-Jeghers Syndrome *In: Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J., Mirzaa, G., Amemiya, A. (eds.): GeneReviews® [Internet]. University of Washington, Seattle (WA).*
125. Meldrum, C. J., McPhillips, M., Crooks, R., Thomas, L., Edkins, T., Creegan, R., Miller, E., Agrez, M., Scott, R. J. (2003): A Comparison Between Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Denaturing High Performance Liquid Chromatography in Detecting Mutations in Genes Associated with Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) and the Identification of 9 New Mutations Previously Unidentified by DGGE. *Hered. Cancer Clin. Pract.* 1(1): 39–48.
126. Mueller, J., Kanter-Smoler, G., Nygren, A. O. H., Errami, A., Grönberg, H., Holmberg, E., Björk, J., Wahlström, J., Nordling, M. (2004): Identification of Genomic Deletions of the *APC* Gene in Familial Adenomatous Polyposis by Two Independent Quantitative Techniques. *Genet. Test.* 8 (3): 248–256.
127. Miyahara, Y. et al. (2020): A Novel Germline *BMPRIA* Variant (c.72_73delGA) in a Japanese Family with Hereditary Mixed Polyposis Syndrome. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 50(7): 826–829.
128. Miyoshi, Y., Ando, H., Nagase, H., Nishisho, I., Horii, A., Miki, Y., Mori, T., Utsunomiya, J., Baba, S., Petersen, G. (1992): Germ-Line Mutations of the *APC* Gene in 53 Familial Adenomatous Polyposis Patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(10): 4452–4456.
129. Nakagawa, H., Murata, Y., Koyama, K., Fujiyama, A., Miyoshi, Y., Monden, M., Akiyama, T., Nakamura, Y. (1998): Identification of a Brain-Specific *APC* Homologue, *APCL*, and Its Interaction with β -Catenin. *Cancer Res.* 58(22): 5176–5181.
130. Nakamura, T., Ishikawa, H., Sakai, T., Ayabe, M., Wakabayashi, K., Mutoh, M., Matsuura, N. (2019): Effect of Physical Fitness on Colorectal Tumor Development in Patients with Familial Adenomatous Polyposis: *Medicine (Baltimore)* 98(38): 1–7.
131. Necker, J., Kovac, M., Attenhofer, M., Reichlin, B., Heinimann, K. (2011): Detection of *APC* Germ Line Mosaicism in Patients with de Novo Familial Adenomatous Polyposis: A Plea for the Protein Truncation Test. *J. Med. Genet.* 48(8): 526–529.
132. Ngeow, J., Stanuch, K., Mester, J. L., Barnholtz-Sloan, J. S., Eng, C. (2014): Second Malignant Neoplasms in Patients With Cowden Syndrome With Underlying Germline *PTEN* Mutations. *J. Clin. Oncol.* 32(17): 1818–1824.
133. Nielsen, M., Bik, E., Hes, F. J., Breuning, M. H., Vasen, H. F. A., Bakker, E., Tops, C. M. J., Weiss, M. M. (2007): Genotype–Phenotype Correlations in 19 Dutch Cases with *APC* Gene Deletions and a Literature Review. *Eur. J. Hum. Genet.* 15(10): 1034–1042.
134. Nielsen, M., Infante, E., Brand, R. (2019): *MUTYH* Polyposis *In: Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J., Mirzaa, G., Amemiya, A. (eds.): GeneReviews® [Internet]. University of Washington, Seattle (WA).*
135. Nielsen, M., Morreau, H., Vasen, H. F. A., Hes, F. J. (2011): *MUTYH*-Associated Polyposis (MAP). *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 79(1): 1–16.
136. Nykamp, K. et al. (2017): Sherlock: A Comprehensive Refinement of the ACMG–AMP Variant Classification Criteria. *Genet. Med.* 19(10): 1105–1117.
137. Okkels, H., Lagerstedt-Robinson, K., Wikman, F. P., Hansen, T. V. O., Lolas, I., Lindberg, L. J., Krarup, H. B. (2019): Detection of *PMS2* Mutations by Screening Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer Families from Denmark and Sweden. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 23(9): 688–695.
138. Olkinuora, A. et al. (2019): Biallelic Germline Nonsense Variant of *MLH3* Underlies Polyposis Predisposition. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 21(8): 1868–1873.

139. O'Malley, M., LaGuardia, L., Kalady, M. F., Parambil, J., Heald, B., Eng, C., Church, J., Burke, C. A. (2012): The Prevalence of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia in Juvenile Polyposis Syndrome. *Dis. Colon Rectum* 55(8): 886–892.
140. Pagenstecher, C., Gadzicki, D., Stienen, D., Uhlhaas, S., Mangold, E., Rahner, N., Arslan-Kirchner, M., Propping, P., Friedl, W., Aretz, S. (2007): A Complex Rearrangement in the *APC* Gene Uncovered by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *J. Mol. Diagn.* 9(1): 122–126.
141. Parc, Y., Boisson, C., Thomas, G., Olschwang, S. (2003): Cancer Risk in 348 French *MSH2* or *MLH1* Gene Carriers. *J. Med. Genet.* 40(3): 208–213.
142. Pasanisi, P. et al. (2019): A Pilot Low-Inflammatory Dietary Intervention to Reduce Inflammation and Improve Quality of Life in Patients With Familial Adenomatous Polyposis: Protocol Description and Preliminary Results. *Integr. Cancer Ther.* 18: 1–11.
143. te Paske, I. B. A. W., Ligtenberg, M. J. L., Hoogerbrugge, N., de Voer, R. M. (2020): Candidate Gene Discovery in Hereditary Colorectal Cancer and Polyposis Syndromes—Considerations for Future Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 21(22): 1–20.
144. Patel, S. G., Ahnen, D. J. (2012): Familial Colon Cancer Syndromes: An Update of a Rapidly Evolving Field. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 14(5): 428–438.
145. Pauklin, S., Vallier, L. (2015): Activin/Nodal Signalling in Stem Cells. *Development* 142(4): 607–619.
146. Pilarski, R., Eng, C. (2004): Will the Real Cowden Syndrome Please Stand up (Again)? Expanding Mutational and Clinical Spectra of the *PTEN* Hamartoma Tumour Syndrome. *J. Med. Genet.* 41(5): 323–326.
147. Plevová, P., Štekrová, J., Kohoutová, M., Novotný, J., Šachlová, M., Petráková, K., Foretová, L. (2009): Familiární Adenomatózní Polypóza. *Klin. Onkol.* 22: 16–19.
148. Plon, S. E. et al. (2008): Sequence Variant Classification and Reporting: Recommendations for Improving the Interpretation of Cancer Susceptibility Genetic Test Results. *Hum. Mutat.* 29(11): 1282–1291.
149. Pyatt, R. E., Pilarski, R., Prior, T. W. (2006): Mutation Screening in Juvenile Polyposis Syndrome. *J. Mol. Diagn. JMD* 8(1): 84–88.
150. Quadri, M., Vetro, A., Gismondi, V., Marabelli, M., Bertario, L., Sala, P., Varesco, L., Zuffardi, O., Ranzani, G. N. (2015): *APC* Rearrangements in Familial Adenomatous Polyposis: Heterogeneity of Deletion Lengths and Breakpoint Sequences Underlies Similar Phenotypes. *Fam. Cancer* 14(1): 41–49.
151. Raedle, J., Friedl, W., Engels, H., Koenig, R., Trojan, J., Zeuzem, S. (2001): A *de Novo* Deletion of Chromosome 5q Causing Familial Adenomatous Polyposis, Dysmorphic Features, and Mild Mental Retardation. *Am. J. Gastroenterol.* 96(10): 3016–3020.
152. Richards, S. et al. (2015): Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 17(5): 405–424.
153. Rohlin, A., Engwall, Y., Fritzell, K., Göransson, K., Bergsten, A., Einbeigi, Z., Nilbert, M., Karlsson, P., Björk, J., Nordling, M. (2011): Inactivation of Promoter 1B of *APC* Causes Partial Gene Silencing: Evidence for a Significant Role of the Promoter in Regulation and Causative of Familial Adenomatous Polyposis. *Oncogene* 30(50): 4977–4989.
154. Rosenberg, M. M., Yang, F., Mohn, J. L., Storer, E. K., Jacob, M. H. (2010): The Postsynaptic Adenomatous Polyposis Coli (APC) Multiprotein Complex Is Required for Localizing Neurologin and Neurexin to Neuronal Nicotinic Synapses in Vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30(33): 11073–11085.
155. Rowan, A. J., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopoulou, A., Bicknell, D., Bodmer, W. F., Tomlinson, I. P. M. (2000): *APC* Mutations in Sporadic Colorectal Tumors: A Mutational “Hotspot” and Interdependence of the “Two Hits.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(7): 3352–3357.
156. Rozen, P., Samuel, Z., Brazowski, E. (2003): A Prospective Study of the Clinical, Genetic, Screening, and Pathologic Features of a Family with Hereditary Mixed Polyposis Syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 98(10): 2317–2320.
157. Rudin, C. M. et al. (2012): Comprehensive Genomic Analysis Identifies *SOX2* as a Frequently Amplified Gene in Small-Cell Lung Cancer. *Nat. Genet.* 44(10): 1111–1116.
158. Sayed, M. G. et al. (2002): Germline *SMAD4* Or *BMPRIA* Mutations and Phenotype of Juvenile Polyposis. *Ann. Surg. Oncol.* 9(9): 901–906.
159. Schneikert, J., Vijaya Chandra, S. H., Ruppert, J. G., Ray, S., Wenzel, E. M., Behrens, J. (2013): Functional Comparison of Human Adenomatous Polyposis Coli (APC) and APC-Like in Targeting Beta-Catenin for Degradation. *PLoS ONE* 8(7): 1–12.

160. Schnitzler, M., Koorey, D., Dwight, T., Tomaras, C., Macrae, F., Marsh, D., Robinson, B. (1998): Frequency of Codon 1061 and Codon 1309 *APC* Mutations in Australian Familial Adenomatous Polyposis Patients. *Hum. Mutat.* 11 (S1): 56–57.
161. Schwarzová, L., Štekrová, J., Florianová, M., Novotný, A., Schneiderová, M., Lněnička, P., Kebrdlová, V., Kotlas, J., Veselá, K., Kohoutová, M. (2013): Novel Mutations of the *APC* Gene and Genetic Consequences of Splicing Mutations in the Czech FAP Families. *Fam. Cancer* 12(1): 35–42.
162. Scott, R. J., Froggatt, N. J., Trembath, R. C., Evans, D. G., Hodgson, S. V., Maher, E. R. (1996): Familial Infiltrative Fibromatosis (Desmoid Tumours) (MIM135290) Caused by a Recurrent 3' *APC* Gene Mutation. *Hum. Mol. Genet.* 5(12): 1921–1924.
163. Septer, S., Slowik, V., Morgan, R., Dai, H., Attard, T. (2013): Thyroid Cancer Complicating Familial Adenomatous Polyposis: Mutation Spectrum of at-Risk Individuals. *Hered. Cancer Clin. Pract.* 11(1): 1–6.
164. Shirts, B. H. et al. (2014): Deep Sequencing with Intronic Capture Enables Identification of an *APC* Exon 10 Inversion in a Patient with Polyposis. *Genet. Med.* 16(10): 783–786.
165. Shirts, B. H. et al. (2016): Improving Performance of Multigene Panels for Genomic Analysis of Cancer Predisposition. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 18(10): 974–981.
166. Snow, A. K., Tuohy, T. M. F., Sargent, N. R., Smith, L. J., Burt, R. W., Neklason, D. W. (2015): *APC* Promoter 1B Deletion in Seven American Families with Familial Adenomatous Polyposis. *Clin. Genet.* 88(4): 360–365.
167. Sotelo, N. S., Valiente, M., Gil, A., Pulido, R. (2012): A Functional Network of the Tumor Suppressors APC, HDlg, and PTEN, That Relies on Recognition of Specific PDZ-Domains. *J. Cell. Biochem.* 113(8): 2661–2670.
168. Sotos, J. F., Dodge, P. R., Muirhead, D., Crawford, J. D., Talbot, N. B. (1964): Cerebral Gigantism in Childhood: A Syndrome of Excessively Rapid Growth with Acromegalic Features and a Nonprogressive Neurologic Disorder. *N. Engl. J. Med.* 271(3): 109–116.
169. Spirio, L., Nelson, L., Ward, K., Burt, R., White, R., Leppert, M. (1993): A CA-Repeat Polymorphism Close to the Adenomatous Polyposis Coli (*APC*) Gene Offers Improved Diagnostic Testing for Familial APC. *Am. J. Hum. Genet.* 52(2): 286–296.
170. Steinhagen, E., Guillem, J. G. (2013): Colorectal Polyps and Polyposis Syndromes *In: Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract.* Elsevier, Philadelphia (PA), 2030–2050.
171. Stormorken, A. T., Berg, T., Norum, O.-J., Hølmekbakk, T., Aaberg, K., Steigen, S. E., Grindedal, E. M. (2018): *APC* Mosaicism in a Young Woman with Desmoid Type Fibromatosis and Familial Adenomatous Polyposis. *Fam. Cancer* 17(4): 539–543.
172. Su, L.-K., Steinbach, G., Sawyer, J. C., Hindi, M., Ward, P. A., Lynch, P. M. (2000): Genomic Rearrangements of the *APC* Tumor-Suppressor Gene in Familial Adenomatous Polyposis. *Hum. Genet.* 106(1): 101–107.
173. Suchy, J. et al. (2010): *CHEK2* Mutations and HNPCC-Related Colorectal Cancer. *Int. J. Cancer* 126(12): 3005–3009.
174. Susswein, L. R. et al. (2016): Pathogenic and Likely Pathogenic Variant Prevalence among the First 10,000 Patients Referred for next-Generation Cancer Panel Testing. *Genet. Med.* 18(8): 823–832.
175. Taylor, C. F. (2009): Mutation Scanning Using High-Resolution Melting. *Biochem. Soc. Trans.* 37(2): 433–437.
176. Thliveris, A., Samowitz, W., Matsunami, N., Groden, J., White, R. (1994): Demonstration of Promoter Activity and Alternative Splicing in the Region 5' to Exon 1 of the *APC* Gene. *Cancer Res.* 54(11): 2991–2995.
177. Trna, J., Stibůrek, O., Klímová, K., Mišejková, M., Šlapák, J., Robek, O. (2010): Familiární Adenomatózní Polypóza – Doporučení pro Screening a Dispenzarizaci. *Intern. Med. Pract.* 12(3): 145–147.
178. Tsaousis, G. N. et al. (2019): Analysis of Hereditary Cancer Syndromes by Using a Panel of Genes: Novel and Multiple Pathogenic Mutations. *BMC Cancer* 19(1): 1–19.
179. Tuohy, T. M. F., Done, M. W., Lewandowski, M. S., Shires, P. M., Saraiya, D. S., Huang, S. C., Neklason, D. W., Burt, R. W. (2010): Large Intron 14 Rearrangement in *APC* Results in Splice Defect and Attenuated FAP. *Hum. Genet.* 127(3): 359–369.
180. Turcot, J., Despres, J. P., St Pierre, F. (1959): Malignant Tumors of the Central Nervous System Associated with Familial Polyposis of the Colon: Report of Two Cases. *Dis. Colon Rectum* 2: 465–468.
181. Van Der Luijt, R. B. et al. (1995): Molecular, Cytogenetic, and Phenotypic Studies of a Constitutional Reciprocal Translocation t(5;10)(q22;q25) Responsible for Familial Adenomatous Polyposis in a Dutch Pedigree. *Genes. Chromosomes Cancer* 13(3): 192–202.

182. Vieira, J., Pinto, C., Afonso, M., do Bom Sucesso, M., Lopes, P., Pinheiro, M., Veiga, I., Henrique, R., Teixeira, M. R. (2015): Identification of Previously Unrecognized FAP in Children with Gardner Fibroma. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 23(5): 715–718.
183. Wang, Z., Chen, Y., Wu, B., Zheng, H., He, J., Jiang, B. (2011): A Novel Mutation in *STK11* Gene Is Associated with Peutz-Jeghers Syndrome in Chinese Patients. *BMC Med. Genet.* 12 (1):1–5.
184. Weitzel, J. N. et al. (2019): Pathogenic and Likely Pathogenic Variants in *PALB2*, *CHEK2*, and Other Known Breast Cancer Susceptibility Genes among 1054 BRCA-Negative Hispanics with Breast Cancer. *Cancer* 125(16): 2829–2836.
185. Weren, R. D. A. et al. (2015): A Germline Homozygous Mutation in the Base-Excision Repair Gene *NTHL1* Causes Adenomatous Polyposis and Colorectal Cancer. *Nat. Genet.* 47(6): 668–671.
186. Wigle, T. J., Tsvetkova, E. V., Welch, S. A., Kim, R. B. (2019): DPYD and Fluorouracil-Based Chemotherapy: Mini Review and Case Report. *Pharmaceutics* 11(5): 1–17.
187. Wimmer, K. et al. (2014): Diagnostic Criteria for Constitutional Mismatch Repair Deficiency Syndrome: Suggestions of the European Consortium “care for CMMRD” (C4CMMRD). *J. Med. Genet.* 51(6): 355–365.
188. Wittwer, C. T. (2009): High-Resolution DNA Melting Analysis: Advancements and Limitations. *Hum. Mutat.* 30(6): 857–859.
189. Worthley, D. L. et al. (2012): Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach (GAPPS): A New Autosomal Dominant Syndrome. *Gut* 61(5): 774–779.
190. Wu, Y. et al. (2001): Germline Mutations of *EXO1* Gene in Patients with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC) and Atypical HNPCC Forms. *Gastroenterology* 120(7): 1580–1587.
191. Xavier, A., Olsen, M. F., Lavik, L. A., Johansen, J., Singh, A. K., Sjursen, W., Scott, R. J., Talseth-Palmer, B. A. (2019): Comprehensive Mismatch Repair Gene Panel Identifies Variants in Patients with Lynch-like Syndrome. *Mol. Genet. Genomic Med.* 7(8): 1–10.
192. Xing, Y., Clements, W. K., Le Trong, I., Hinds, T. R., Stenkamp, R., Kimelman, D., Xu, W. (2004): Crystal Structure of a β -Catenin/APC Complex Reveals a Critical Role for APC Phosphorylation in APC Function. *Mol. Cell* 15(4): 523–533.
193. Xiong, H. Y. et al. (2015): The Human Splicing Code Reveals New Insights into the Genetic Determinants of Disease. *Science* 347 (6218): 144–151.
194. Yamaguchi, K. et al. (2016): Reduced Expression of *APC-1B* but Not *APC-1A* by the Deletion of Promoter 1B Is Responsible for Familial Adenomatous Polyposis. *Sci. Rep.* 6(1): 1–8.
195. Yang, M., Zhu, L., Zhu, L., Xu, D., Yuan, Y. (2021): Role of a Rare Variant in *APC* Gene Promoter 1B Region in Classic Familial Adenomatous Polyposis. *Digestion* 102(4): 527–533.
196. Ye, K., Schulz, M. H., Long, Q., Apweiler, R., Ning, Z. (2009): Pindel: A Pattern Growth Approach to Detect Break Points of Large Deletions and Medium Sized Insertions from Paired-End Short Reads. *Bioinformatics* 25(21): 2865–2871.
197. Yehia, L., Eng, C. (2021): *PTEN* Hamartoma Tumor Syndrome *In*: Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J., Mirzaa, G., Amemiya, A. (eds.): GeneReviews® [Internet]. University of Washington, Seattle (WA).
198. Yehia, L., Ni, Y., Sesock, K., Niazi, F., Fletcher, B., Chen, H. J. L., LaFramboise, T., Eng, C. (2018): Unexpected Cancer-Predisposition Gene Variants in Cowden Syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome Patients without Underlying Germline *PTEN* Mutations. *PLoS Genet.* 14(4): 1–17.
199. Yu, B., Sawyer, N. A., Chiu, C., Oefner, P. J., Underhill, P. A. (2006): DNA Mutation Detection Using Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC). *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 48(1): 1–14.
200. Yurgelun, M. B. et al. (2015a): Germline *TP53* Mutations in Patients With Early-Onset Colorectal Cancer in the Colon Cancer Family Registry. *JAMA Oncol.* 1(2): 214–221.
201. Yurgelun, M. B., Allen, B., Kaldate, R. R., Bowles, K. R., Judkins, T., Kaushik, P., Roa, B. B., Wenstrup, R. J., Hartman, A.-R., Syngal, S. (2015b): Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients With Suspected Lynch Syndrome. *Gastroenterology* 149(3): 1–19.
202. Zhan, T., Rindtorff, N., Boutros, M. (2017): Wnt Signaling in Cancer. *Oncogene* 36(11): 1461–1473.
203. Zhang, J., Nichols, K. E., Downing, J. R. (2016): Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *N. Engl. J. Med.* 374 (14): 1390–1391.
204. Zhang, L., Shay, J. W. (2017): Multiple Roles of *APC* and Its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 109(8): 1–10.

Seznam obrázků

Obr. 3.1: Adenomatózní polypy tlustého střeva	6
Obr. 3.2: Různé formy proktokolektomie	9
Obr. 3.3: Gen <i>APC</i> a jeho transkripční varianty.....	14
Obr. 3.4: Míra exprese genu <i>APC</i> v různých tkáních.....	15
Obr. 3.5: Poloha a frekvence mutací v genu <i>APC</i> u pacientů s FAP onemocněním	16
Obr. 3.6: Genotyp-fenotypová korelace mutací v genu <i>APC</i> (Balaguer et al. 2015)	19
Obr. 3.7: Jednotlivé domény proteinu APC a jejich hlavní interakční partneři	20
Obr. 3.8: Komplex 20 aa repeats domény APC s molekulou β -kateninu.....	21
Obr. 3.9: Kanonická Wnt signální dráha.....	22
Obr. 4.1: Schéma přípravy NGS knihovny	29
Obr. 4.2: Ukázka čipu pro použití na vysoce citlivou fragmentovou analýzu DNA	35
Obr. 4.3: Ukázka chromatogramů z analýzy délky fragmentů na přístroji 2100 Bioanalyzer	35
Obr. 4.4: Ukázka výsledků qPCR analýzy pro kontrolu obohacení NGS knihovny	40
Obr. 4.5: Příklad zobrazení CNV varianty pomocí softwaru IGV	43
Obr. 4.6: Elektroforegram po PCR v teplotním gradientu).....	45
Obr. 5.1: Konfirmace přítomnosti patogenních variant v genu <i>APC</i> modifikovanou metodou Sangerova sekvenování.....	57
Obr. 5.2: Konfirmace přítomnosti patogenních variant v klinicky významných genech modifikovanou metodou Sangerova sekvenování	58
Obr. 5.3: Výsledky MLPA analýzy kontrolního vzorku	59
Obr. 5.4: MLPA konfirmace delece v oblasti promotoru 1B u pacienta reFAP078	60
Obr. 5.5: MLPA konfirmace delece v oblasti promotoru 1B u pacienta reFAP119.....	60
Obr. 5.6: MLPA konfirmace duplikace v exonu 15 u pacienta reFAP175.....	61
Obr. 5.7: Konfirmace duplikace exonu 15 genu <i>APC</i> u vzorku reFAP175 agarózovou elektroforézou produktů LR PCR reakce	62
Obr. 5.8: Vyloučení přítomnosti duplikací v exonu 16 genu <i>APC</i> u vzorku reFAP125 metodou LR PCR	62

Seznam tabulek

Tab. 3.1: Přehled dědičných polypózních syndromů tlustého střeva a konečníku	4
Tab. 3.2: Procentuální podíl patogenních mutací v genu <i>APC</i> u pacientů s FAP onemocněním	17
Tab. 3.3: Procentuální podíl jednotlivých typů genových variant v genu <i>APC</i>	17
Tab. 4.1: Základní charakteristika souboru probandů	25
Tab. 4.2: Parametry sonikace DNA na přístroji Covaris E220	30
Tab. 4.3: Směs pro úpravu konců DNA fragmentů	30
Tab. 4.4: Směs pro adenylaci DNA fragmentů	31
Tab. 4.5: Směs pro ligaci adaptorů	31
Tab. 4.6: Schéma přípravy a pipetování směsi indexů pro značení vzorků	33
Tab. 4.7: Teplotní program LM PCR reakce po selekci fragmentů na základě jejich délky	33
Tab. 4.8: Příprava roztoků pro fluorimetrickou kvantifikaci DNA ve vzorcích	33
Tab. 4.9: Složení omývacích pufrů	36
Tab. 4.10: Složení PCR reakce pro obohacení NGS knihovny	37
Tab. 4.11: Teplotní program PCR reakce pro obohacení knihovny	37
Tab. 4.12: Příprava roztoků pro fluorimetrickou kvantifikaci DNA fragmentů v knihovně	38
Tab. 4.13: Složení qPCR reakce	39
Tab. 4.14: Schéma přípravy reakčních směsí pro qPCR kvantifikaci vzorků sekvenčních knihoven	39
Tab. 4.15: Teplotní program qPCR reakce	39
Tab. 4.16: Klasifikace genetických variant podle ACMG	43
Tab. 4.17: Složení PCR reakce	44
Tab. 4.18: Teplotní program PCR reakce	44
Tab. 4.19: Složení reakce enzymatického čištění PCR produktů	45
Tab. 4.20: Teplotní program enzymatického čištění PCR produktů	45
Tab. 4.21: Složení sekvenační reakce	45
Tab. 4.22: Teplotní program sekvenační reakce	46
Tab. 4.23: Ethanol-acetátová precipitace fragmentů vzniklých reakcí Sangerova sekvenování	46
Tab. 4.24: Složení reakčních směsí jednotlivých kroků v metodě MLPA	47
Tab. 4.25: Teplotní program v rámci MLPA analýzy	47
Tab. 4.26: Složení LR PCR reakce	48
Tab. 4.27: Teplotní program LR PCR reakce	48
Tab. 4.28: Postup izolace DNA z agarózového gelu	49
Tab. 5.1: Přehled výsledků re-analýzy	52
Tab. 5.2: Interpretace výsledků analýzy DNA metodou MLPA	59
Tab. 6.1: Souhrn dostupných klinických údajů pacientů zařazených do re-analýzy	63
Tab. 6.2: Metody molekulární diagnostiky dříve využitě k analýze studovaných vzorků DNA	64
Tab. 6.3: Srovnání procentuálního zastoupení zachycených patogenních <i>APC</i> variant s údaji v databázi HGMD®	67
Tab. 6.4: Genotyp-fenotypová korelace pacientů FAP pacientů	68
Tab. 6.5: Diferenciální diagnostika dědičných onemocnění spojených s tvorbou kolorektálních polypů ..	74

Seznam grafů

Graf 4.1: Věkové rozdělení souboru pacientů v době jejich prvotní diagnostiky	26
Graf 5.1: Souhrnný výsledek re-analýzy FAP suspektních pacientů metodou NGS.....	51

Seznam příloh

Příloha 1: Sekvence i5 a i7 adaptorů.....	I
Příloha 2: Sekvence indexovaných primerů použitých pro unikátní označení vzorků jednotlivých pacientů při přípravě NGS knihovny.....	I
Příloha 3: Sekvence oligonukleotidů pro zablokování indexů.....	II
Příloha 4: Sekvence primerů pro obohacení NGS knihovny	II
Příloha 5: Sekvence primerů pro kontrolu obohacení NGS knihovny pomocí qPCR.....	III
Příloha 6: Sekvence primerů využitých pro confirmaci přítomnosti patogenních variant	III

Přílohy

Příloha 1: Sekvence i5 a i7 adaptorů

Adaptor	Sekvence (5'→3')
i5	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
i7	pGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC

Symbol * představuje fosfotiátovou vazbu. p označuje 5' fosfát.

Příloha 2: Sekvence indexovaných primerů použitých pro unikátní označení vzorků jednotlivých pacientů při přípravě NGS knihovny

Indexovaný primer	Sekvence (5'→3')
i5_D501	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT <u>TATAGCCT</u> ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
i5_D502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>ATAGAGGC</u> ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
i5_D503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>CTATCCT</u> ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
i5_D504	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>GGCTCTGA</u> ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
i5_D505	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>AGGCGAAG</u> ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
i5_D506	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT <u>TAATCTTA</u> ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
i5_D507	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>CAGGACGT</u> ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
i5_D508	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>GTACTGAC</u> ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
i7_D701_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CGAGTAAT</u> GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT*C
i7_D702_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TCTCCGGA</u> GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT*C
i7_D703_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>AATGAGCG</u> GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT*C
i7_D704_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GGAATCTC</u> GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT*C
i7_D705_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TTCTGAAT</u> GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT*C
i7_D706_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>ACGAATTC</u> GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT*C
i7_D707_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>AGCTTCAGG</u> TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT*C
i7_D708_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GCGCATTAG</u> TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT*C

Zvýrazněné části představují unikátní sekvenci jednotlivých indexů. Symbol * znázorňuje fosfotiátovou vazbu.

Příloha 3: Sekvence oligonukleotidů pro zablokování indexů

Oligonukleotid	Sekvence (5'→3')
block_P5_D501	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
block_P5_D502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGCACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
block_P5_D503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTATCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
block_P5_D504	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCTGAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
block_P5_D505	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGCGAAGACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
block_P5_D506	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAATCTTAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
block_P5_D507	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGGACGTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
block_P5_D508	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTACTGACACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
block_P5_D701_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC
block_P5_D702_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCGGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC
block_P5_D703_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAATGAGCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC
block_P5_D704_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAATCTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC
block_P5_D705_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC
block_P5_D706_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAATTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC
block_P5_D707_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTTCAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC
block_P5_D708_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCATTAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC

Příloha 4: Sekvence primerů pro obohacení NGS knihovny

Primer	Sekvence (5'→3')
PCR2_i5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
PCR2_i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT

Příloha 5: Sekvence primerů pro kontrolu obohacení NGS knihovny pomocí qPCR

Primer	Sekvence F (5'→3')	Sekvence R (5'→3')
qPCR_NSC-0237F	CGCATTCCTCATCCCAGTATG	AAAGGACTTGGTGCAGAGTTCAG
qPCR_NSC-0247F	CCCACCGCCTTCGACAT	CCTGCTTACTGTGGGCTCTTG
qPCR_NSC-0268F	CTCGCTTAACCAGACTCATCTACTGT	ACTTGGCTCAGCTGTATGAAGGT
qPCR_NSC-0272F	CAGCCCCAGCTCAGGTACAG	ATGATGCGAGTGCTGATGATG

Příloha 6: Sekvence primerů využitých pro confirmaci přítomnosti patogenních variant

Primer	Sekvence F (5'→3')	Sekvence R (5'→3')	Délka produktu (bp)	Pozice v genomu (hg19)	t _{an} (°C)
APC ex6	TACAAGATATTGATACTTTTTTA	TGTAATTCATTTTATTCCTAATAGCTC	215	chr5: 112116448–112116662	55
APC ex10	AGTCGTAATTTTGTCTTAAACTC	GCTTTGAAACATGCACTACGAT	458	chr5:112154626–112155083	60
APC ex15LR	TTTTGAGGAATTTGTCTTGCGGAGC	GAGATTCCACAAAGTTCCACATGCATTA	8787	chr5:112164466–112173325	60
APC ex15	TAGATGACCCATATTCTGTTTC	CTTTAAAAGTAATATAAAACTC	276	chr5:112170619–112170893	54
APC ex16.2	GAACCTTGTGGAATCTCTCA	TTGCTGGATGGTAGTTGCCT	604	chr5:112173336–112173890	55
APC ex16LR	CTGCCATACACATTCAAACAC	CTGACCACTTCTACTCTGTGC	946	chr5:112174071–112175017	57
APC ex16.8	AAAGACATACCAGACAGAGGG	CTTTTTTGGCATTGCGGAGCT	339	chr5:112177103–112177441	60
APC ex16.10	AGTAAATGCTGCAGTTCAGAGG	TTTGATTCTTTAGGCTGCTCT	225	chr5:112175704–112175928	55
APC ex16.16	AAAGACATACCAGACAGAGGG	CTTTTTTGGCATTGCGGAGCT	339	chr5:112177103–112177441	55
BMPR1A ex5	AGGGTTGTCACTGGCCTTTT	CCTGGGGGAAATCGATGCTT	388	chr10:88651669–88652056	65
BMPR1A ex11	TGGCCCTCAACTTGGACCTT	ATACAACGACGAGCCATCTCC	206	chr10:88681239–88681444	65
MSH2 ex3	TTAGGCTTCTCCTGGCAATC	GGCCTGGAATCTCCTCTATCAC	323	chr2: 47637229–47637551	60
PTEN ex2	CCAGAAGTGAGTGGGCAGAG	TCACAAAGTATCTTTTTCTGTGGCT	1492	chr10:89652476–89653968	60
SMAD4 ex5	CTTTGAGGGACAGCCATCGT	GTTTACTTACTTGGAGTTTCCCCC	270	chr18:48581191–48581460	60
SMAD4 ex9	GGTTCCTTCAAGCTGCCCTA	CACCGACAATTAAGATGGAGTGCT	291	chr18:48591857–48592148	60
STK11 ex1	TCCACCGAGGTCATCTACCA	TTGCCTGAGTGAAAGTCCGT	394	chr19:1207003–1207398	60
STK11 ex3	TGAGCTGTGTGTCCTTAGCG	TATCAGGACAAGCAGTGTGGC	209	chr19:1219297–1219505	65