

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Zuzana Snížková

Studium nových příčinných genů ve vývoji karcinomů štítné žlázy

The study of new causal genes in the development of thyroid cancer

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Josef Včelák

Praha 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a uvedla všechny zdroje. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 9. ledna 2020

Zuzana Snížková

Abstrakt

Karcinom štítné žlázy je nejčastější malignitou v endokrinologii. Ačkoliv se usilovně hledá genetické pozadí tohoto onemocnění, ne u všech karcinomů se nalezne genetická příčina. Mezi hlavní mutované geny především u papilárního karcinomu štítné žlázy (PTC) patří *BRAF* gen a *RAS* geny. V malém procentu karcinomů se nalézají mutace v *TERT*, *EIF1AX*, *CHEK2* a *PPM1D* genech, které mohou také ovlivňovat agresivitu karcinomu a další prognózu pacienta.

Cílem bakalářské práce bylo shrnutí současných poznatků o minoritních příčinných genech u karcinomů štítné žlázy ve světové literatuře a molekulárně-genetická analýza genu *EIF1AX* (1., 2., 5. a 6. exonu) u vzorků zamražených tkání karcinomů štítné žlázy pomocí moderních metod NGS (sekvenování nové generace a ověření nalezených variant) s následným statistickým a bioinformatickým zpracováním dat.

Bakalářská práce byla podporována grantem AZV 16-32665A.

Klíčová slova: štítná žláza, karcinom, gen, sekvenování, EIF1AX

Poděkování:

Ráda bych poděkovala oběma mým školitelům RNDr. Šarce Dvořákové, PhD. a Mgr. Josefu Včelákovi za vstřícné a trpělivé vedení bakalářské práce. Poděkování patří i vyučujícím naší fakulty, rodině a přátelům za podporu při studiu.

Abstract

Thyroid cancer is the most common malignancy of the endocrine system. Although there is searching for the genetic background of this disease, no genetic causes in all carcinomas are found. Among main mutated genes mainly in papillary thyroid carcinoma (PTC) belong *BRAF* and *RAS* genes. In small percent of carcinomas are found mutations in *TERT*, *EIF1AX*, *CHEK2* and *PPM1D* genes that could also influence aggressiveness of carcinoma and further prognosis of patient.

The goal of this work was summary of actual knowledge about minor causal genes in thyroid carcinoma in the world literature and molecular-genetic analysis of gene *EIF1AX* (exons 1, 2, 5 and 6) in samples of snap-frozen tissues of thyroid carcinomas using modern method of NGS (next-generation sequencing and evaluation of found variants) with following statistical and bioinformatic processed data). This work was support by grant AZV 16-32665A.

Key words: thyroid, carcinoma, gene, sequencing, EIF1AX

Obsah

Úvod...	1
1 Teoretická část.....	2
1.1 Štítná žláza.....	2
1.2 Karcinomy štítné žlázy	6
1.3 Genetické faktory – <i>BRAF</i> , <i>RAS</i> , <i>RET</i> , <i>TERT</i>	10
1.4 MAP kinasová signalizační dráha	13
1.5 Nové geny pro karcinomy štítné žlázy	13
1.6 Metody užívané v molekulární biologii.....	16
1.6.1 Stanovení kvantity nukleových kyselin fluorospektrofotometricky	16
1.6.2 Polymerasová řetězová reakce	16
1.6.3 Elektroforéza nukleových kyselin.....	18
1.6.4 Sekvence nové generace – NGS.....	19
1.6.5 Bioinformatická analýza sekvenačních dat.....	22
2 Experimentální část	23
2.1 Příprava vzorku a PCR	23
2.2 Sekvence nové generace (NGS).....	26
2.3 Bioinformatické vyhodnocení sekvenačních dat – MiSeq Reporter, IGV	28
2.4 Výsledky a diskuse	29
2.4.1 Studovaný soubor.....	29
2.4.2 Záchyt mutací v <i>EIF1AX</i>	31
2.4.3 Klinický obraz zachycených variant v <i>EIF1AX</i> genu	33
3 Závěr.....	36
Reference.....	37
Seznam užitých zkratk.....	42

Úvod

Pro bakalářskou práci jsem si toto téma zvolila, protože mě obor endokrinologie velice zajímá.

Karcinomy štítné žlázy jsou velice aktuálním tématem v klinické praxi, a to nejen v České republice, ale i po celém světě. Patří k nejčastějším endokrinním malignitám a jejich výskyt stále roste v celosvětovém měřítku. Výzkum příčinných genů a jejich mutací, které mohou ovlivnit agresivitu karcinomu, napomáhá personalizovat léčbu konkrétních pacientů [Vu-Phan, D., 2014].

Teoretická část této práce je zaměřena na obecné informace o štítné žláze a druzích karcinomů štítné žlázy. Dále na genetickou podstatu karcinomů, nové geny a na gen *EIF1AX*, který je předmětem experimentální části této bakalářské práce. Zahrnuje jeho strukturu, funkci a nejčastěji se vyskytující mutace, s ohledem na výzkum po celém světě.

Experimentální část obsahuje výsledky analýz vzorků tkání ze souboru pacientů, v jejichž DNA byly hledány případné mutace v již zmiňovaném genu *EIF1AX*. Cílem tohoto výzkumu bylo potvrdit a porovnat získané informace s celosvětovými daty.

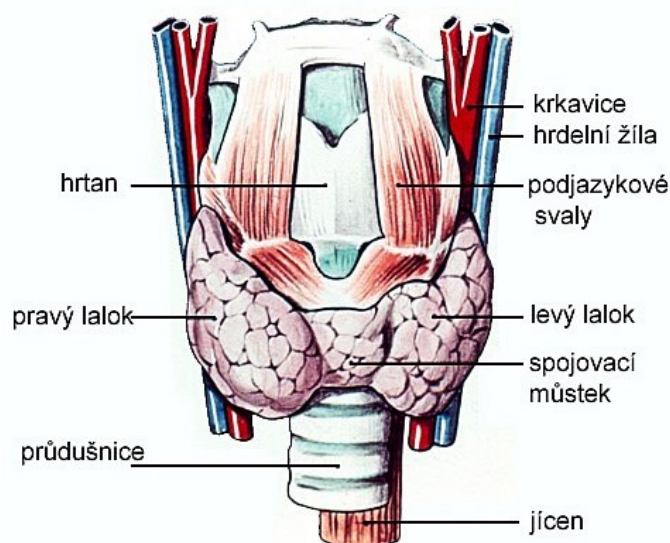
Práce v klinické laboratoři mi dala mnoho zkušeností. Naučila jsem se systematicky pracovat s velkým množstvím vzorků a s klinickými vzorky, jejichž náchylnost ke kontaminaci je vysoká. Vyzkoušela jsem si mnoho metodik, které mohu uplatnit v následujícím studiu a případně při práci v laboratoři. Při vykonávání práce jsem se zároveň naučila používat nové, velice moderních přístroje a programy na bioinformatické vyhodnocení dat.

1 Teoretická část

1.1 Štítná žláza

Štítná žláza se skládá ze dvou laloků (pravého a levého) spojených příčným můstkem tzv. *isthmus glandulae thyroideae* a tvoří tak písmeno H. Je uložena po bocích hrtanu a horní části průdušnice. Na zadních stranách laloků se nacházejí příštítná tělíska. Štítná žláza je dlouhá až 8 cm a široká až 4 cm. Hmotnost *glandula thyroidea* se pohybuje kolem 30–40 g. Rozměry štítné žlázy se však liší dle pohlaví a věku. Štítná žláza je obalena vazivovým pouzdrém, které se nazývá *Capsula fibrosa* a je děleno na dva listy (*capsula propria* a *capsula externa*). Povrch štítné žlázy je hladký a má červenofialovou barvu, která je ovlivněna množstvím krve v cévách. Fixování štítné žlázy je zajištěno vazivem k hrtanu a průdušnici, dále pak spojením pouzdra s okolním vazivem [Čihák, R., 2002].

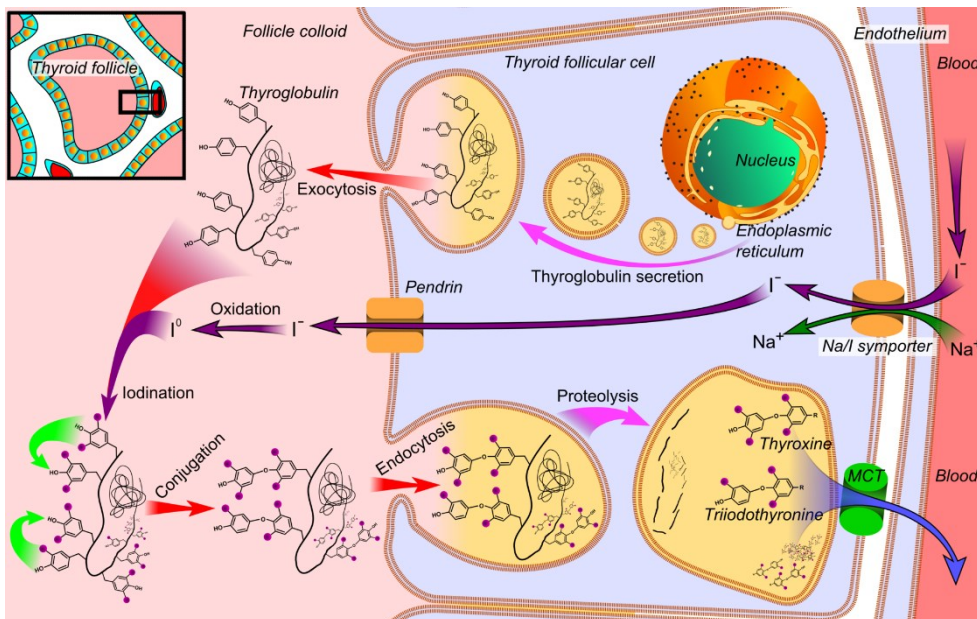
Z *capsula propria* odstupují vazivová septa a tvoří tak stroma štítné žlázy. Žláza je tvořena *lobuli*, které se dělí na váčky *folliculi*. Folikuly jsou nepravidelné kulovité uzavřené váčky, jejichž stěnu tvoří vrstva epitelových buněk [Čihák, R., 2002]. Velikost folikulů se pohybuje od 20 do 200 μm . Výška těchto buněk se mění dle funkčního stavu. Pokud je žláza hypofunkční, buňky jsou nízké a ploché, při normální funkčnosti jsou buňky kubické. Naopak při hyperfunkci jsou buňky cylindrické [Jiskra, J., 2011].



Obrázek 1 – Anatomie štítné žlázy – zobrazení uspořádání štítné žlázy [převzato a upraveno www.falco-petrovickyvittr.webnode.cz]

Dutina neboli nitro folikul, je vyplněno homogenní viskózní tekutinou zvanou *koloid*, která je produktem folikulárních buněk a obsahuje *thyroglobulin* a *trijodthyronin* [Jiskra, J., 2011].

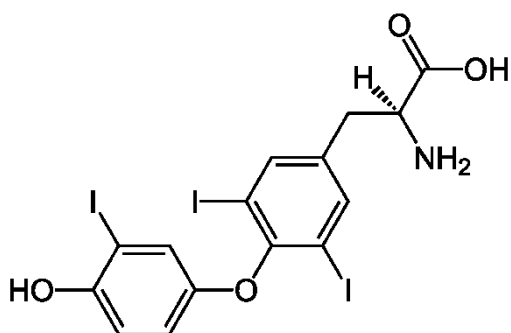
Štítná žláza produkuje velké množství hormonů, které jsou syntetizovány ve folikulech. Syntéza začíná produkcí prekursoru - glykoproteinu thyroglobulinu s následnou jodací jeho tyrosinových zbytků. Z něho se proteolýzou získávají majoritní hormony *trijodthyronin* a *thyroxin* (viz. Obrázek 2) [Jiskra, J., 2011].



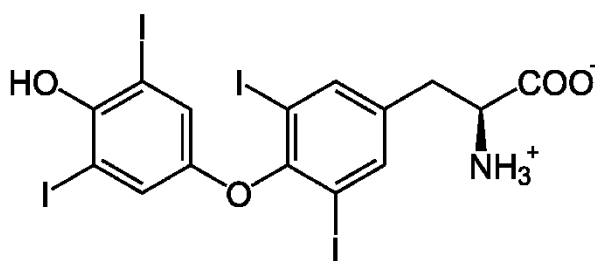
Obrázek 2 – syntéza hormonů štítné žlázy. Thyroglobulin je syntetizován v drsném endoplazmatickém retikulu. Dále pokračuje sekreční cestou a exocytózou vstupuje do koloidu v lumen štítné žlázy. V průběhu je aktivně pumpován jodid do buňky Na/I pumpou. Tento jodid vstupuje do folikulární lumen z cytoplazmy transportním pendrinem. V koloidu je jodid oxidován na jod pomocí thyroïdní peroxidázy. Jelikož je jod velice reaktivní, joduje thyroglobulin na tyrosinových zbytcích proteinového řetězce. Spojením sousedních zbytků vznikne komplex, který znovu vstupuje do folikulární buňky endocytózou. Proteolýza uvolňuje různými proteázami thyroxinové a trijodthyroninové molekuly, jež vstupují do krve. [převzato z www.wikiskripta.eu].

Trijodthyronin neboli T3 obsahující tři atomy jodu, je aktivovanou formou prohormonu *thyroxinu* – T4, který obsahuje atomy jodu čtyři. Jsou to tedy jodované deriváty aminokyseliny tyrosinu [www.fblt.cz]. *Trijodthyronin* se stává účinným hormonem díky odštěpení jednoho atomu jodu z hormonu *thyroxin* pomocí enzymu *dejodasy* [Jiskra, J., 2011].

T3 i T4 jsou lipofilní hormony. Jsou navázány na plazmatických proteinech, a tak jsou transportovány krví. V takto navázané formě nejsou hormony fyziologicky účinné [www.fblt.cz].

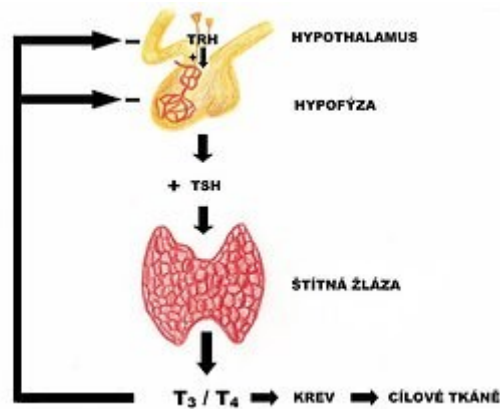


Obrázek 3 – strukturní vzorec trijodthyroninu [převzato www.cs.wikipedia.org]



Obrázek 4 – strukturní vzorec thyroxinu [převzato www.cs.wikipedia.org]

Tvorba i distribuce hormonů uvolňovaných ze štítné žlázy je řízena thyreostimulačním hormonem hypofýzy *thyreotropinem*, TSH. Syntéza a uvolňování TSH z adenohipofýzy je aktivováno z hypothalamu uvolněním *thyreotropin uvolňujícího hormonu*, TRH (z ang. *thyreotropin releasing hormone*). Jejich vylučování je řízeno na principu negativní zpětné vazby (viz. obrázek 5), tzn., že hormony štítné žlázy zpětnovazebně ovlivňují sekreci TSH i TRH [www.fblt.cz]. Po vazbě cirkulujícího TSH na TSH receptor, což je receptor ze skupiny G protein aktivujících receptorů, stoupají intracelulární hladiny cyklického 3',5'-adenosinmonofosfátu, cAMP. cAMP aktivuje všechny funkční aspekty štítné žlázy, včetně pumpování jodu; syntézy *thyroglobulinu*, jodace, endocytózy a proteolýzy; aktivita peroxidázy a uvolňování hormonů. [Brent GA., 2012].



Obrázek 5 – negativní zpětná vazba endokrinního systému. TRH uvolněné v hypothalamu stimuluje hypofýzu, odkud se uvolňuje TSH. TSH poté působí na štítnou žlázu, která následně vylučuje hormony T₃ a T₄ do krevního řečiště. Krví se poté hormony, navázané na plazmatických proteinech dostávají do cílové tkáně, kde se stávají volnými hormony a jsou fyziologicky účinné. [převzato a upraveno www.akutne.cz].

Řízení funkce štítné žlázy je ale komplexnější a je ovlivňováno i dalším působením. Jako příklad lze uvést hormon *somatostatin* (hormon inhibující růstový hormon). Tvoří se v hypothalamu a v D-buňkách endokrinní části pankreatu. *Somatostatin* je hormon tlumící sekreci růstového hormonu a sekreci *thyrotropinu* v adenohypofýze [Guillemin, R., 2008]

Účinky hormonů štítné žlázy jsou velmi komplexní a řídí řadu fyziologických procesů v lidském těle, výrazně ovlivňují růst a vývoj organismu. Účinný je zejména trijodtyronin, který se váže na jaderné receptory tzv. TR receptory (Thyroid Hormone Receptors), a ovlivňuje tak syntézu řady mRNA, čímž zprostředkovává různé metabolické účinky v buňce.

Hormony štítné žlázy tím přispívají ke zvýšení bazálního metabolismu. Část účinku hormonů štítné žlázy je dána metabolismem mastných kyselin, které jimi byly mobilizovány. Hormony štítné žlázy dále zvyšují aktivitu membránové Na⁺ /K⁺ - ATPázy v mnohých tkáních [Čihák, R., 2002].

Kromě folikulárních buněk štítné žlázy se ve stěnách folikulů nacházejí rozptýlené parafolikulární buňky (C-buňky). C-buňky formou sekrečních granul produkují polypeptidový hormon *kalcitonin*, který ovlivňuje metabolismus vápníku a fosforu [Čihák, R., 2002]. Kalcitonin vyvolává snížení obsahu vápníku v krvi a podporuje jeho ukládání do kostí. Působí jako antagonist parathormonu (PTH) produkovanému buňkami hlavními příštítných tělísek [Dylevský, I., 2009].

1.2 Karcinomy štítné žlázy

Karcinomy štítné žlázy se vyvíjí ze dvou různých typů buněk štítné žlázy, jak bylo zmíněno v odstavci 1.1. Nádory vzniklé z folikulárních buněk tvoří více než 90 % případů. Tyto karcinomy se dále dělí na 4 hlavní typy, které se od sebe liší histologickou výstavbou a buněčnou morfologií. Buňky parafolikulární představují 3-5 % všech karcinomů a zastupují jeden ze vzácných typů karcinomů štítné žlázy. [Cote, G.J., 2015]

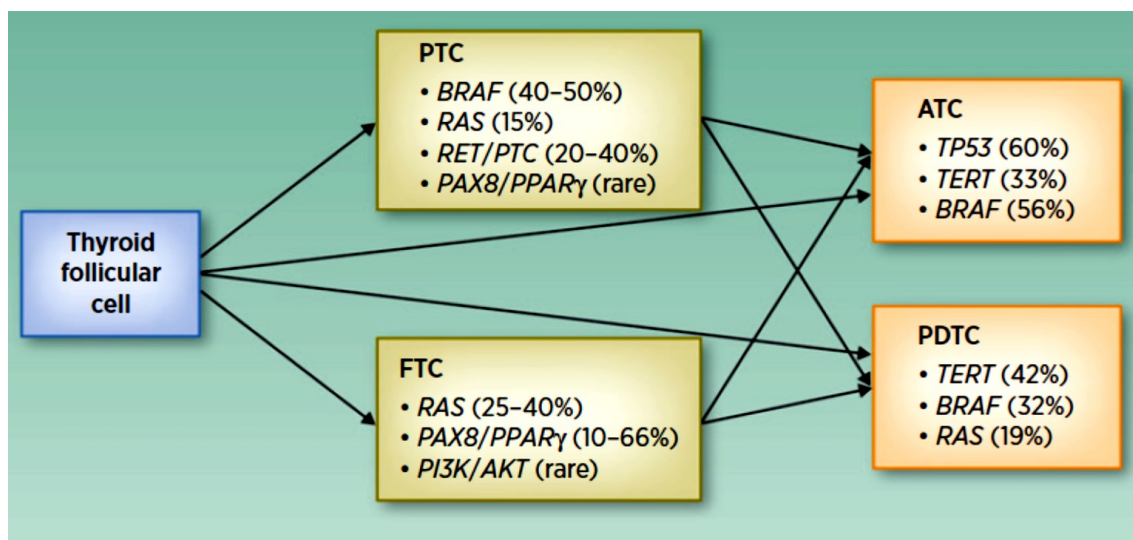
Diferencované karcinomy vzniklé z folikulárních buněk se hromadně nazývají dobře diferencované karcinomy štítné žlázy (WDTC, well-differentiated thyroid carcinomas). Do této skupiny se řadí dva podtypy: papilární karcinom štítné žlázy (PTC) a folikulární karcinom štítné žlázy (FTC). PTC je nejčastějším histologickým typem karcinomu. Výskyt tohoto typu je až u 90 % pacientů mezi 40-60 lety. Rizikovější skupinou jsou ženy, u nichž je nález PTC obvyklejší než u mužů. Tento typ rakoviny může dediferencovat do anaplastického karcinomu (ATC), který patří k nejagresivnějším formám karcinomu štítné žlázy [Cancer Genome Atlas Program Office, 2014].

Kromě genetických faktorů je rakovina štítné žlázy ovlivněna množstvím spotřebovaného jodu, který má na funkci štítné žlázy velký vliv. Dále také ionizující záření, kterému byl člověk v dětství vystaven [Ron, E., 1995].

Papilární karcinom má mnoho variant, většinou jsou spojeny s mutacemi ovlivňujícími MAPK signalizační dráhu (viz. kapitola 1.4), např. změny v genech *BRAF*, *RET* nebo *RAS* [Zaballos, A., 2017]. PTC často metastazuje do lymfatických uzlin, vzdálené metastázy se objevují nejčastěji v plicích. Prognóza je však velice dobrá a u většiny pacientů dochází k vyléčení rakoviny. Záleží však na věku i pohlaví daného pacienta [Bendlová, B., 2016].

Folikulární karcinom je druhý nejčastěji se vyskytující typ karcinomu, který se objevuje až v 10 % všech případů nádorů štítné žlázy [Yoo, S.K., 2016]. Tento typ karcinomu je oproti PTC agresivnější. Hlavní mutace FTC jsou mutace v genu *RAS* [Zaballos, A., 2017].

Dalšími dvěma typy karcinomů vzniklých z folikulárních buněk jsou karcinomy nízce diferencované (PDTC, poorly differentiated thyroid carcinoma) a karcinomy anaplastické (ATC, anaplastic thyroid carcinoma). Oba tyto typy se řadí mezi nejagresivnější formy rakoviny štítné žlázy. ATC se vyskytuje až u 2 % pacientů s rakovinou štítné žlázy [Molinaro, E., 2017]. U ATC můžeme pozorovat rychlý nárůst nádorového uzlu. Často také metastazuje do okolních tkání i do vzdálenějších orgánů. U pacientů s ATC dochází ke smrti do půl roku od diagnózy. Vhodná léčba pro tyto pacienty zatím není dostupná [Vu-Phan, D., 2014].

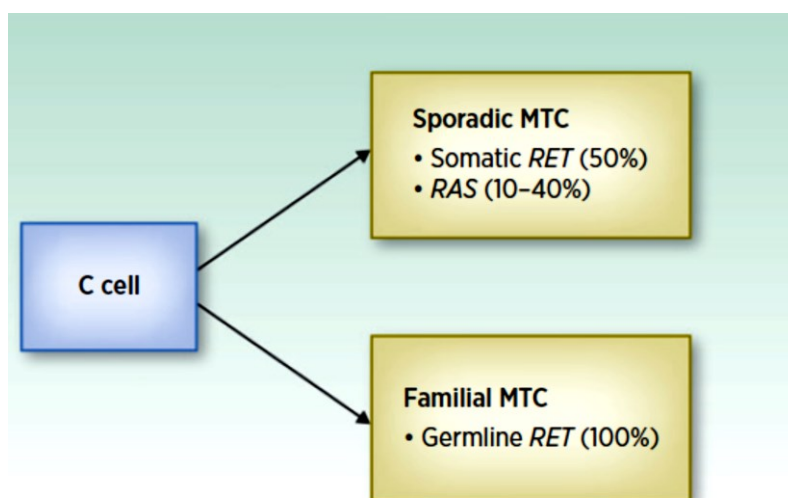


Obrázek 6 – Schéma molekulárně genetických změn u karcinomů štítné žlázy. Na schématu jsou zobrazeny hlavní karcinomy štítné žlázy vzniklé z folikulárních buněk, PTC a FTC. V každé tabulce jsou uvedeny hlavní geny způsobující tyto karcinomy s procentuálním výskytem jejich mutací. Schéma pokračuje do dalších typů karcinomů, tj. karcinomy vznikající z PTC nebo FTC. Těmito dalšími karcinomy je ATC a PDTC. [převzato a upraveno Raue, F., 2016]

MTC neboli medulární karcinom štítné žlázy vzniká z parafolikulárních C-buněk. Tato forma karcinomu je agresivnější v porovnání s PTC a FTC [Azar, F.K., 2015].

Familiární formy karcinomů štítné žlázy vznikající z parafolikulárních buněk se nazývají familiární medulární karcinomy, karcinomy vznikající z folikulárních buněk pak nazýváme familiární nemedulární karcinomy [Zarebczan, B., 2010].

Nádory štítné žlázy jsou nejčastěji diagnostikovány pomocí sonografie uzlu a následné aspirační biopsie tenkou jehlou (FNAB – fine-needle aspiration biopsy). Jedná se o cytologickou diagnózu buněk odebraných ze štítné žlázy. Pro medulární karcinomy a syndromy mnohočetná endokrinní neoplazie 2, u kterých je MTC jejich součástí, je typické zvýšení krevních hladin kalcitoninu produkovaného nádorem [Zarebczan, B., 2010].



Obrázek 7 – Toto schéma zobrazuje karcinomy vzniklé z parafolikulárních (C-) buněk. Těmito karcinomy jsou sporadický MTC a familiární MTC. [převzato a upraveno Raue, F., 2016]

Léčba těchto typů karcinomů je různorodá. Nejvíce doporučována je však *totální tyreoidektomie*, odstranění celé štítné žlázy. Poté se dle nálezu rozhodne, zda je potřeba zahájit léčbu radiojodem ^{131}I ke zničení všech možných residuí buněk štítné žlázy a zejména metastáz nádoru do dalších orgánů. Radioaktivní jód se vychytává zejména v buňkách, které mají největší metabolickou aktivitu – což jsou buňky těchto karcinomů štítné žlázy. Ozářením pak dochází k eliminaci těchto buněk. K ověření, zda byla léčba efektivní a v těle pacienta již není karcinom, se využívá měření sérových hladin *thyroglobulinu* a celotělová scintigrafie. Léčba radiojodem je účinná však pouze pro PTC a FTC. Pro další typy karcinomů nemá smysl, jelikož např. medulární karcinomy, které jsou tvořeny C-buňkami, nevyužívají jod [Zarebczan, B., 2010].

Mimo mutací ve výše uvedených genech, jsou častou příčinou PTC/FTC genová přeskupení (Obrázek 6). Například u papilárního karcinomu štítné žlázy je *RET* proto-onkogen aktivován pomocí translokace s jiným běžně exprimovaným genem. Tyto dva geny se spojí a hovoříme o tzv. *RET*/PTC přeskupení. Jelikož druhý gen přinesl aktivní promotor a dimerizační funkci, dochází k expresi aktivační domény *RET* genu, který za normálních okolností ve folikulárních buňkách štítné žlázy přepisován není. Výsledkem je aktivace MAPK signální dráhy, jelikož zůstala neporušená tyrosinkinasová doména *RET* genu. Pro léčbu je vyvíjeno velké množství inhibitorů tyrosinkinas se zaměřením na RET kinasu, některé z nich se již dostaly do onkologické praxe (Sunitinib) [Zarebczan, B., 2010].

1.3 Genetické faktory – *BRAF*, *RAS*, *RET*, *TERT*

Rakovina štítné žlázy může být způsobena aktivací proto-onkogenů nebo deaktivací tumor-supresorových genů, které svou činností zabraňují vzniku karcinomů [Bendlová, B., 2011].

Tabulka č. 1 Přehled hlavních příčinných genů jednotlivých typů karcinomů štítné žlázy [Abdullah, M.I., 2019]

KARCINOM	MAJORITNÍ GENY	MINORITNÍ GENY
Papilární	<i>BRAF</i> , <i>RET/PTC</i> , <i>RAS</i>	<i>EIFAX</i> , <i>CHEK2</i> , <i>PPM1D</i> , <i>TERT</i>
Folikulární	<i>RAS</i>	<i>EIFAX</i> , <i>CHEK2</i> , <i>PPM1D</i> , <i>TERT</i>
Anaplastický	<i>BRAF</i> , <i>RAS</i>	
Medulární	<i>RET</i> , <i>RAS</i>	

BRAF protein je serin-threoninová kinasa. Tento protein je aktivován pomocí *RAS* proteinu. Mutace, které se nachází právě na *BRAF* proteinu vedou k nekontrolovatelné aktivitě tyrosinkinasy. Nejobvyklejší mutací je tzv. V600E, která se vyskytuje až v 95 % případů. Mutace je způsobena záměnou glutamátu (glutamová kyselina) za valin na pozici 600 peptidového řetězce. Tato mutace byla detekována v PTC, PDTC a ATC. PTC s *BRAF*^{V600E} jsou spojeny s dediferenciací a s vyšší aktivací extracelulární signál-regulující kinasy (*ERK*) než nádory způsobené mutacemi v *RAS* genu [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Mutace v genu *BRAF* v PTC mají klinicky významnou vlastnost, a to sníženou citlivost na radioaktivní jod. Tato vlastnost má za následek omezenou možnost léčby. Výskyt *BRAF* mutací je zároveň spjat s vyšší agresivitou onemocnění [Vu-Phan, D., 2014].

Tři *RAS* onkogeny *H-RAS*, *N-RAS* a *K-RAS* kódují malé GTPasy. Každý z těchto genů je lokalizován na jiném místě. Gen *H-RAS* se nachází na krátkém raménku 11. chromosomu na pozici 15.5 a skládá se ze 7 exonů [www.ncbi.nlm.nih.gov]. *N-RAS* se nachází na prvním chromosomu v pozici 13.2 a je též složen ze 7 exonů [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Poslední gen, *K-RAS*, je lokalizován na krátkém raménku 12. chromosomu v pozici 12.1, je tvořen 6 exony [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Všechny tyto geny se podílí na regulaci důležitých procesů, jako je např. růst nebo diferenciacie buněk. *RAS* a jejich následné efekторы jsou zahrnuty v již zmíněné MAPK signalizační dráze (viz. kapitola 1.4). Protein *RAS* existuje ve dvou formách, v aktivní a neaktivní. Aktivní forma *RAS* proteinu je vázána na GTP, neaktivní forma je naopak navázána na GDP. Aktivace je indukována vnějšími podněty působícími na tyrosinkinasy receptor. Mutace *RAS* genu patří k nejčastějším mutacím [Vu-Phan, D., 2014].

Gen *TERT* je jeden z dalších významnějších příčinných genů karcinomů štítné žlázy. Nachází se na pozici 5p15.33 a je tvořen 16 exony. *TERT* kóduje reverzní transkriptázu komplexu telomeras, který se podílí na zachování délky telomeras, jaká je potřeba pro nepřetržitou buněčnou replikaci a nesmrtelnost buněk. Aktivita tohoto genu byla nalezena v různých typech rakoviny. Mutace v *TERT* genu mají poměrně nízký výskyt v PTC. Naopak metastazující PTC a PDTC se objevuje až u 30-40 %, u ATC to je dokonce 70 % [Pestana, A., 2017].

RET proto-onkogen (RET) se řadí mezi proto-onkogeny, které přispívají k vývoji malignit tím, že regulují replikaci DNA a přenosy signálů [Alberts, B., 2002]. *RET* je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 10 v pozici 11.21, čili 10q11.21. Je tvořen 20 exony. Hlavní funkcí *RET* je kódování transmembránového tyrosinkinasového receptoru. Gen *RET* je nezbytně nutný pro správný vývoj mnoha orgánů a tkání [www.ncbi.nlm.nih.gov].

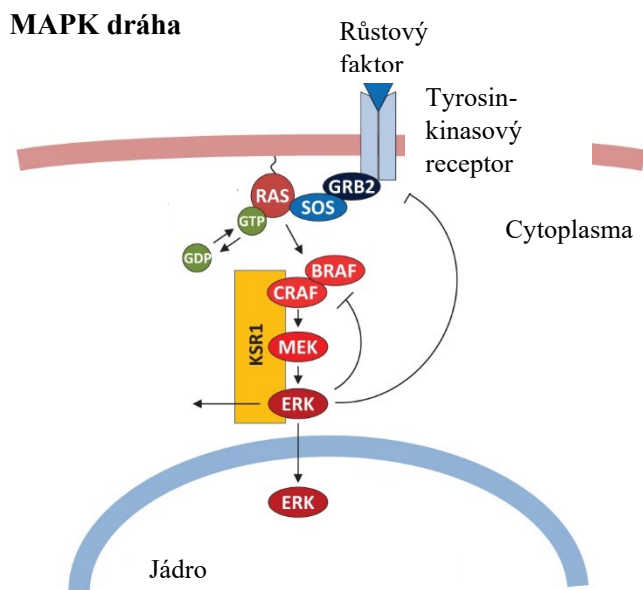
Mutace v *RET proto-onkogenu* jsou příčinou medulárního karcinomu štítné žlázy (MTC, FMTC). Naopak fúze tohoto genu s jinými partnery (přesmyky) jsou spojené zejména s papilárním karcinomem. Dodnes bylo popsáno více jak 10 fúzních partnerů tvořících s *RET proto-onkogenem* 15 různých *RET/PTC* přeskupení. Např. *RET/PTC1* je nejčastější formou, kde je fúzován 1. exon genu *CCDC6* s 12. exonem *RET proto-onkogenu*. Prognóza pro karcinomy *RET/PTC* je poměrně dobrá, pouze v některých případech jsou zaznamenány zvýšené metastázy lymfatických uzlin [Vu-Phan, D., 2014].

1.4 MAP kinasová signalizační dráha

Téměř 70 % rakoviny štítné žlázy je způsobeno mutacemi, které aktivují MAPK (mitogen-activated protein kinase) signalizační dráhu. MAPK signalizační dráha je konzervovaná signálně-transdukční dráha, která využívá série proteinkinasy k vysílání signálů z buněčné membrány do jádra buněk. Kontroluje buněčné procesy jako je proliferace, diferenciace a apoptóza.

Dráha signalizace je spuštěna ve chvíli, kdy se naváže externí stimul (např. růstový faktor) na receptory plazmatické membrány. V důsledku vzniku nové vazby se mění konformace tyrosinkinasy, a tak je příslušná informace přenesena do jádra buňky [Zaballos, A., 2017].

Přes 200 různých efektorů je pak aktivováno pomocí *ERK* v různých buněčných kompartmentech, jako je cytoplazma, mitochondrie, Golgiho komplex, endoplazmatické retikulum a částečně jádro, kde aktivuje skupinu transkripčních faktorů souvisejících s proliferací buňky. Aktivace MAPK signalizační dráhy je kontrolována, na mnoha různých úrovních, pozitivní a negativní zpětnou vazbou regulace. Tato zpětná vazba ovlivňuje trvání a rozsah signálů. Primární mutace, které způsobují nadměrný růst karcinomů, jsou bodové mutace v genech *BRAF* a *RAS* a *RET/PTC* přeskupení [Morrison, D.K., 2012].

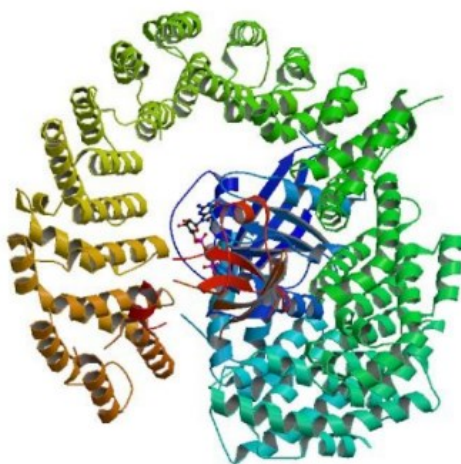


Obrázek 8 - Schéma MAPKinasové signalizační dráhy. Na obrázku je znázorněn tyrosinkinový receptor reagující na navazující se růstový faktor. Dochází k dimerizaci receptoru a autofosforylaci zbytků (GRB2). Tímto navázáním pomocí adaptorového proteinu SOS dochází k přeměně GDP/GTP na RAS proteinu, a tím je protein aktivován. RAS aktivuje několik efektorů, jako například RAF proteiny. Dimerizací a fosforylací BRAF proteinů se postupně aktivuje MEK a ERK. Negativní zpětná vazba, která deaktivuje BRAF proteiny dráhu zastaví. [převzato a upraveno Zaballos, A., 2017]

1.5 Nové geny pro karcinomy štítné žlázy

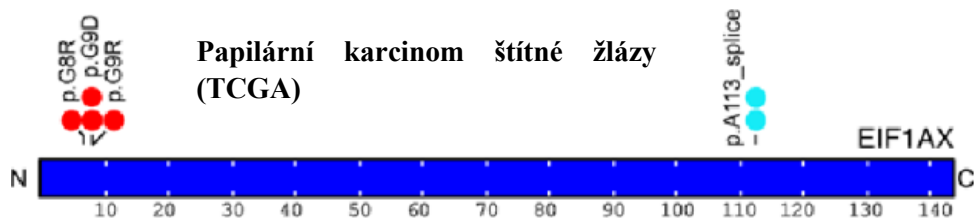
Studie TCGA (The Cancer Genome Atlas), která zjišťovala příčinu u velkého souboru PTC, objevila nové slibné příčinné geny *EIF1AX*, *CHEK2* a *PPM1D* [The Cancer Genome Atlas Office, 2014]. Tato bakalářská práce se soustředí na *EIF1AX* gen.

Lidský gen *EIF1AX* je lokalizován na chromosomu Xp22.12. *EIF1AX* je gen velký 17,331 kb a je kódován 144 aminokyselinami. Tento gen obsahuje 7 exonů. Jeho funkcí je kódování eukaryotického translačního iniciačního faktoru 1A na chromosomu X, což tvoří právě zkratku *EIF1AX*. Tento protein tvoří spolu s 40S ribosomální podjednotkou a dalšími translačními faktory 43S komplex. Společně s dalšími faktory odpovídá za nalezení start kodonu mRNA v eukaryotických buňkách a iniciuje translaci mRNA do proteinu. [www.ncbi.nlm.nih.gov].



Obrázek 9 – Na obrázku je zobrazena struktura proteinu *EIF1AX* [převzato www.phosphosite.org]

Nejčastější mutace byly nalezeny v 1., 2., 5. a 6. exonu tohoto genu. Největší záchyt mutací na tomto genu byl u papilárního karcinomu. Mutace *EIF1AX* byly nalezeny i u jiných typů karcinomů, než je PTC, například u ATC. Naopak ve folikulárních karcinomech a v benigních formách jsou známy jen sporadicky. Mutace zatím nebyly dostatečně charakterizovány, cílem všech probíhajících výzkumů je tedy stanovit výskyt *EIF1AX* mutací ve všech hlavních typech karcinomů štítné žlázy a uzlinách [Karunamurthy, A., 2016]. Skutečnost, že se mutace objevují i v jiných typech karcinomů štítné žlázy, znemožňuje tento gen užívat jako specifický marker papilárního karcinomu [Luster, M., 2019].



Obrázek 10 – distribuce mutací v genu *EIF1AX* 1 u PTC, červeně jsou na obrázku vyznačeny missense mutace, modře mutace sestřihu, konkrétně *A113_splice*, která je významná pro daný gen. Sestřihová mutace *A113* se nachází na kodonu 113 [převzato a upraveno Landa, I., 2016].

Velké množství zachycených mutací bylo spojených s mutacemi jiných genů, nejčastěji s mutacemi v *RAS* genu. Tyto kombinované mutace mají zesilující efekt, a tak diagnóza pacientů s tímto nálezem bývá horší. Kombinace variant DNA se vyskytují především u anaplastického a špatně diferencovaného karcinomu štítné žlázy. Na rozdíl od těchto typů karcinomu, je výskyt kombinací v PTC minimální. U papilárního karcinomu jsou zachyceny spíše samostatné mutace genu *EIF1AX* [Luster, M., 2019].

Jednou z nejčastějších mutací genu *EIF1AX* je sestřihová mutace v pozici A113, která se vyskytuje u papilárního karcinomu. Je lokalizována na C-konci *EIF1AX*, na kodonu 113, který leží na sestřihovém místě mezi 5. intronem a 6. exonem [Tirró, E., 2019]. *A113_splice* je typická pro nádory štítné žlázy. Tato mutace indukuje ATF4 – aktivační transkripční faktor 4, což je senzor buněčného stresu, který řídí defosforylaci EIF2 α (eukaryotický iniciační faktor 2), který je zásadní pro syntézu proteinů [Clemens, M.J., 2001], a tím dochází k jejímu zvýšení [Krishnamoorthy, G.P., 2019].

Mutace v tomto genu nejsou specifické pouze pro karcinomy štítné žlázy, vyskytují se např. u rakoviny vaječníků, dělohy nebo ledvin [Krishnamoorthy, G.P., 2019].

1.6 Metody užívané v molekulární biologii

1.6.1 Stanovení kvantity nukleových kyselin fluorospektrofotometricky

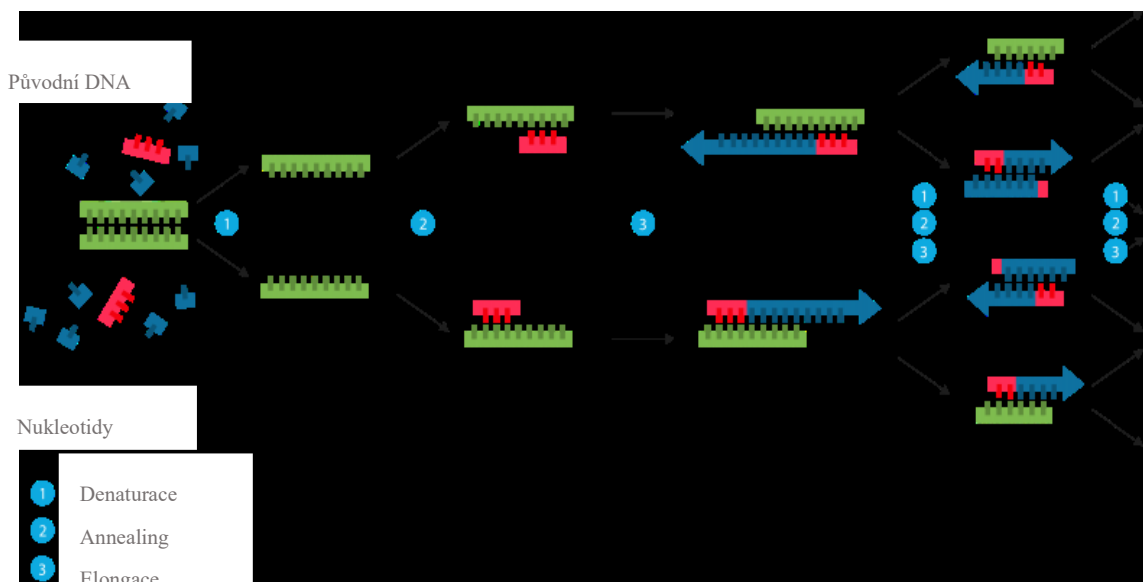
Běžně používané stanovení koncentrace dsDNA UV spektrofotometricky při 260nm je pro malé koncentrace či malé objemy DNA méně přesné, jelikož je ovlivněno nežádoucí absorbcí nečistot při stejné vlnové délce. Proto se pro měření koncentrace nukleových kyselin stále častěji využívá fluorometrické stanovení. Jedná se o nedestruktivní metodu, která v jednotlivých modifikacích dokáže kvantifikovat DNA, RNA a proteiny v daném vzorku. Pro každý druh těchto molekul se používají specifická fluorescenční barviva, která se specificky vážou na konkrétní molekuly. Tato barviva mají extrémně nízkou fluorescenci, dokud se nevážou na svou cílovou molekulu. Rozdíl ve fluorescenci mezi vázaným a nevázaným barvivem je několik řádů. Po navázání, v našem případě na dsDNA (interkalace mezi bázemi), se barvička stane intenzivně fluorescenční. Koncentrace se odečítá vůči kalibrační křivce. Pro stanovení, která jsem prováděla v rámci této práce, byl použit fluorometr Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) [www.en.wikipedia.org].

1.6.2 Polymerasová řetězová reakce

Polymerasová řetězová reakce (anglicky Polymerase Chain Reaction – PCR) je jednou z nejrozšířenějších a velmi citlivých molekulárně biologických metod. PCR metoda byla popsána roku 1983 K. Mullisem, který za ni v roce 1993 obdržel Nobelovu cenu za chemii. PCR je metoda *in vitro*, která má podobný princip jako *in vivo* replikace DNA. Jedná se o několikrát opakující se cyklus 3 dějů – denaturace, annealing (navázání primerů) a elongace. Díky této reakci se amplifikuje (zmnoží) přesně vybraný úsek templátové molekuly DNA. Podstatou metody PCR je několikanásobná syntéza komplementárního úseku DNA pomocí příslušné DNA polymerázy, která vytvoří dvouřetězcovou molekulu vymezenou tzv. primery. Aby reakce proběhla správně, musíme znát primární strukturu úseku DNA, kterou chceme namnožit [Kubista, M., 2006].

Cílem PCR je vytvořit velké množství identických kopií vybraného úseku DNA, které může být dále využito pro různé analytické, preparativní a klinické účely, např. sekvenování s cílem identifikovat patogenní mutace.

PCR se stala velice oblíbenou metodou. PCR má široké zastoupení nejen v molekulární biologii, ale také v mnoha dalších aplikovaných oborech [<https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>], např. v lékařství, forenzní genetice, ekologii nebo molekulární archeologii [Kodíček, M., 2015].



Obrázek 11 – Schéma cyklu PCR, reakce probíhá pouze od 3'- konce k 5'- konci [převzato a upraveno www.microbeonline.com]. 1 – v prvním kroku je znázorněna denaturace, která je nutná pro namnožení DNA. Z dvoušroubovice DNA se stávají dvě molekuly jednořetězcové DNA. 2 – Annealing je druhý krok této reakce. Dochází při něm k navázání specifických primerů (reverse, forward) na konkrétní konce sekvence DNA. 3 – Elongace je posledním krokem PCR. Díky DNA polymeráze přítomné v reakční směsi, se vytvoří druhý komplementární řetězec. Vznikne tak dvouřetězcová molekula. Tento proces se několikrát opakuje v závislosti na typu zvoleného programu na Thermocycleru.

První fází, která je nutná pro namnožení DNA, je denaturace. Vlivem tepla dojde k denaturaci (cca 95 °C), čímž se změní původní struktura DNA. Z původní dvoušroubovice (dsDNA), díky rozrušení vodíkových můstků, vzniknou dvě molekuly jednořetězcové DNA (ssDNA).

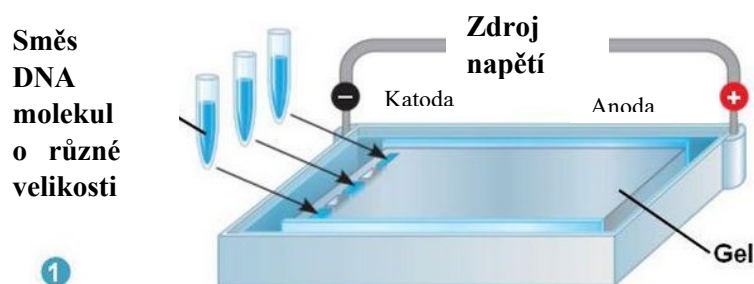
Další klíčovou fází PCR metody je annealing neboli nasednutí specifických primerů. Primer je krátký úsek nukleotidů, komplementární ke koncovým sekvencím na úseku DNA, který chceme amplifikovat. Primery jsou navrhnuty a syntetizovány přímo pro daný úsek DNA viz. Tabulka 2. V reakční směsi pro PCR jsou přítomny dva primery (forward a reverse). Ochlazením reakce dojde k tomu, že se primery navážou pomocí párování vodíkovými vazbami na 3'- konce denaturované molekuly jednořetězcové DNA. Pro každý pár primerů se musí nalézt vhodná teplota annealingu (55-70 °C), kdy se primery váží specificky a s dostatečnou účinností na úsek DNA, který potřebujeme amplifikovat. Tato teplota závisí na sekvenci použitých primerů (obsahu GC bazí a jejich rozmístění), koncentraci hořčnatých iontů a použité polymerase [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

Posledním krokem je tzv. elongace. Tím, že jsou primery díky vodíkovým můstkům nasedlé na komplementární sekvence zdrojové DNA, může DNA polymerasa, která je součástí reakční směsi, syntetizovat druhý, komplementární řetězec od 3'-konce primeru. Vzniká tak dvouřetězcová molekula. Teplota pro elongaci se optimalizuje dle typu polymerasy (72 °C u Taq polymerasy).

Reakční směs typické PCR reakce tedy obsahuje templátovou DNA (v našem případě DNA získanou z nádoru), specifické forward a reverse primery, stavební jednotky = deoxynukleosidtrifosfáty (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) a polymerázu, která je odolná pro střídání výše uvedených teplot. Vše je doplněno vhodnou koncentrací hořčičných iontů s vhodným pufrům o specifickém pH.

1.6.3 Elektroforéza nukleových kyselin

Tato separační metoda je založena na principu rozdílných mobilit separovaných látek ve stejnosměrném elektrickém poli. Tímto způsobem je možno dělit nabitě molekuly – ionty. DNA má díky zbytkům kyseliny ortofosforečné vždy záporný náboj, proto elektroforéza probíhá směrem ke kladné elektrodě – anoda. Jelikož záporný náboj DNA se vždy zvyšuje o jednotku úměrně s počtem bází, vkládá se pro rozlišení různě velkých molekul DNA do cesty v elektroforetickém poli vhodné molekulární síto. Pro případy, kdy je třeba rozlišovat fragmenty DNA lišící se i o jednu bázi kovalentně polymerizovaný akrylamidový gel, pro ostatní typy elektroforéz nejčastěji agarosový gel. Kratší fragmenty projdou gelem rychleji [labguide.cz].



Obrázek 12 – Elektroforetická aparatura připojena ke zdroji elektrického pole, elektroforéza probíhala na připraveném agarosovém gelu, kde jsou delší fragmenty zadržovány déle než kratší, a tak nedoputují tak daleko [převzato a upraveno www.decodingdna.yolasite.com].

Na obrázku 12 je vidět rozložení elektroforetické aparatury, její zapojení ke zdroji a nadávkování vzorků DNA do příslušných jamek.

Elektroforéza se provádí jako kontrola, zda je přítomen PCR produkt. Po správném průběhu PCR, můžeme na gelu pod UV lampou díky přidání fluorescenční barvičky, která se váže na DNA, pozorovat viditelné pruhy, které odpovídají danému PCR produktu. Jeho velikost odečteme porovnáním s velikostí markeru (DNA fragmentů o známé velikosti), který přidáme do sousední jamky [Mitchell, K., 2010].

1.6.4 Sekvence nové generace – NGS

NGS (z angl. Next generation sequencing) je sekvenační metoda, která dnes umožňuje zjistit sekvenci (pořadí nukleotidů v DNA) celého lidského genomu během 24 hodin za cenu výrazně pod 1000 amerických dolarů. Každý lidský genom obsahuje mnoho variací jako je například substituce, delece, inserce, translokace a další, které přispívají ke změně struktury, množství nebo druhu bází v konkrétních genech. Tyto změny nazýváme mutace. Na základě výsledků, které nám poskytne NGS metoda, jsme schopni tyto změny v DNA přesně identifikovat. NGS je nejcitlivější metoda, proto dokáže identifikovat i změnu v malém množství, i v jedné molekule DNA [Behjati, S., 2013].

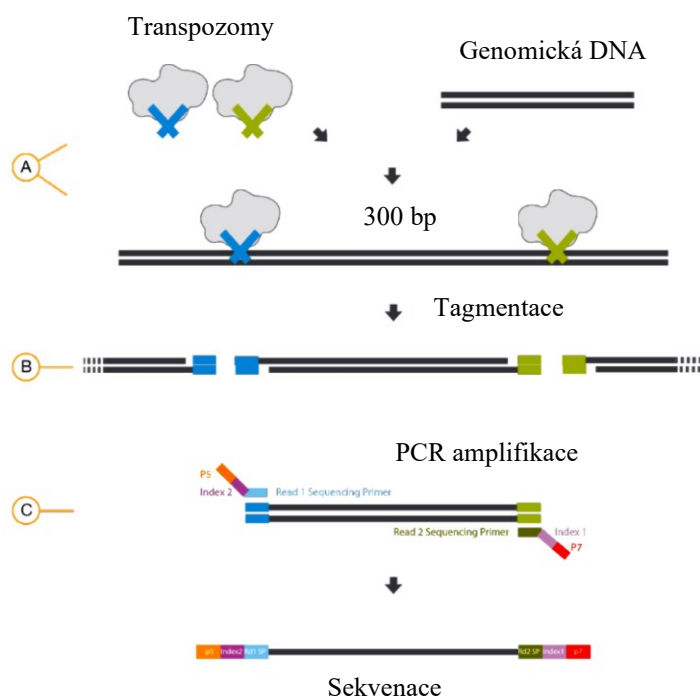
Existuje mnoho technologických variant principů NGS. Všechny jsou založeny na stejném principu, a to na sekvenování milionů fragmentů DNA naráz (paralelně). Následná bioinformatická analýza získaných sekvenačních dat skládá postupně získané sekvence dohromady, určí jejich polohu v genomu a identifikuje jednotlivé varianty v různých vzorcích sekvenovaných DNA. Jelikož sekvenace není bezchybná, je každá báze v sekvenovaném úseku DNA několikrát přečtena, čímž je chybovost eliminována. Tato moderní metoda slouží k identifikaci celých genomů, ale může být využita také při sekvenování konkrétní oblasti genomu, jednotlivých genů. [Behjati, S., 2013]. Metoda NGS poskytuje data, která je potřeba následně bioinformaticky analyzovat a vyhodnotit, často i za využití vizualizačních (zobrazovacích) programů.

Největší využití NGS nacházíme v klinické praxi, kde se se vzorky DNA pracuje nejčastěji. Kromě klinických laboratoří pro hledání zárodečných variant v lidském genomu si NGS našlo využití i v mikrobiologii, kde slouží k charakterizaci a definici patogenů. Velmi intenzivní využití NGS se nachází nyní v onkologii. NGS je používáno pro identifikaci somatických mutací v nádorech, na které je poté zvolena léčba cílena.

Lepší, detailnější a systematická specifikace lidského genomu přináší možnost lepší diagnostiky a následně tak přesnější a efektivnější (personalizovanější) léčby konkrétního pacienta. V experimentální části použitá NGS metoda vychází ze sekvenace klasicky připravených PCR produktů konkrétního genu, kdy templátem byla DNA získaná z různých typů karcinomů štítné žlázy.

Tyto klasické PCR produkty byly převedeny na DNA knihovny (přidání technických sekvencí nezbytných pro sekvenaci) pomocí technologie Nextera XT [NEXTERA XT DNA Library Prep, Reference Guide, Illumina, 2019]. Ta umožňuje v jednom kroku fragmentovat DNA a opatřit fragmenty adaptérovými sekvencemi pomocí speciálně vyvinutého enzymu – transposom = komplex transposázy a transposonu (tzv. tagmentace). V dalším kroku se pomocí několika PCR cyklů přes tyto adaptérové sekvence přidají další úseky DNA nezbytné pro sekvenování technologií SBS (Sequencing by synthesis, Illumina). SBS metoda je založena na sekvenaci syntézou komplementárního řetězce a detekcí reverzibilně blokových terminátorových nukleotidů na bázi fluorescence [Besser, J., 2018].

Tyto sekvence jsou (Obrázek 13c) vyznačeny barevně. Slouží k uchycení DNA k povrchu skleněné reagenční cely v sekvenátoru (tzv. flow cell), k odlišení jednotlivých vzorků (v našem případě jednotlivých pacientů – unikátní sekvence 8 nukleotidů tzv. index) a k nasednutí sekvenačního primeru pro vlastní sekvenační reakci.



Obrázek 13 – Schéma principu Nextera XT [převzato a upraveno NEXTERA XT DNA Library Prep, Reference Guide, Illumina, 2019]

A – Nextera XT transposomy s adaptéry kombinovanými s templátovou DNA

B – Tagmentace fragmentů a připojení adaptérů

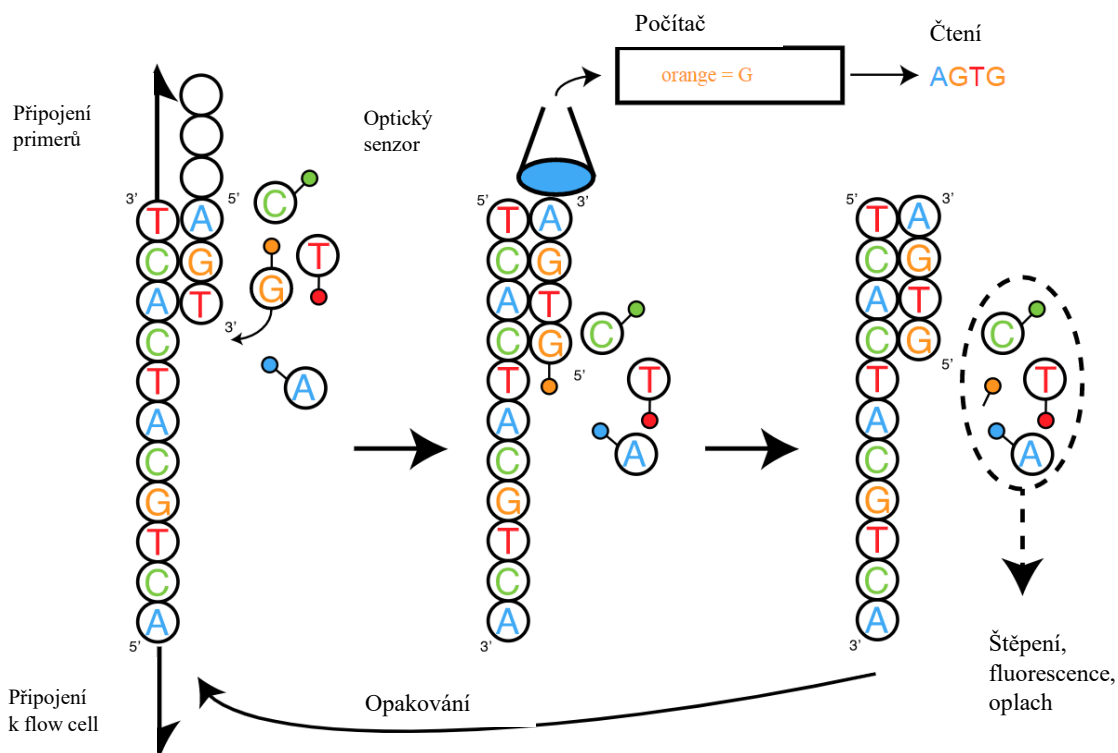
C – PCR pro přidání indexů adapterových sekvencí

Připravené DNA knihovny se denaturují (hydroxid, teplo) a přepipetují do reagenční cartridge sekvenátoru. V mém případě se jednalo o sekvenátor MiSeq (Illumina).

Následuje plně automatický proces NGS sekvenování sestávající se ze tří kroků:

1. **Klonální amplifikace.** DNA knihovny (po denuraci již ve formě ssDNA) jsou do reagenční cartridge sekvenátoru napipetovány v optimální nízké koncentraci tak, aby se na skleněném povrchu flow celly jednotlivé molekuly uchytily v dostatečné vzdálenosti od sebe. Následuje pomocí polymerázy vytvoření identických kopií původní přichycené molekuly – tvorba tzv. clusterů. Cílem je vytvořit několik desítek kopií identických s původním vláknem dsDNA knihovny. Na každém clusteru pak běží identická sekvenační reakce na stejných kopiích DNA – fluorescenční signál je dostatečně zesílen, aby mohl být spolehlivě detekován.

2. **Vlastní sekvenační reakce.** Po vytvoření clusterů sekvenátor přechází do sekvenačního módu, kdy postupně v každém cyklu na flow cellu fluidika nanáší v přesném pořadí potřebné reagencie pro SBS sekvenování (Obrázek 14). Počet cyklů závisí na experimentu a délce DNA knihovny.
3. **Bioinformatická analýza.** V posledním kroku přístroj provede základní analýzu získaných sekvenačních dat



Obrázek 14 - SBS sekvenování využívá fluorescenčně označené reverzibilní terminátory syntézy komplementárního řetězce DNA. Každý dNTP má k sobě připojený odpovídající fluorofor, který zabraňuje pokračování syntézy DNA. Polymeráze jsou v každém sekvenačním cyklu postupně nabízeny všechny čtyři dNTP. Mezi přidáním se vždy nepoužité dNTP odmyývají. Když polymeráza obdrží nukleotid, který je komplementární k sekvenovanému vlákně, prodlouží řetězec o jeden fluorescenčně značený dNTP. V ten moment jsou klastry (identické kopie sekvenovaného úseku DNA vedle sebe) excitovány světelným zdrojem a emitované záření je zaznamenáno optickým detektorem. Tím se určí, jaký nukleotid polymeráza přidala. Po inkorporaci dochází k odštěpení fluoroforu, čímž se odblokuje syntéza pro další nukleotid, který se má začlenit v dalším cyklu [převzato a upraveno www.binf.snipcademy.com].

1.6.5 Bioinformatická analýza sekvenačních dat

Základní kroky bioinformatické analýzy použité v této práci:

V prvním kroku se převádí záznamy získaných fluorescencí z každého sekvenačního cyklu sekvenátoru (fotografie v *.tiff* souborech) na vhodný textový formát genetických dat tzv. FASTQ. Tento formát dat již obsahuje jednopísmenné zkratky jednotlivých bazí a zároveň informaci o kvalitě sekvenování.

V druhém kroku jsou vyloučeny sekvence s nízkou kvalitou a jednotlivé soubory jsou rozděleny do separátních adresářů na základě sekvence indexů (pro každého pacienta byla při přípravě knihoven přidána konkrétní sekvence indexů - 8 nukleotidů).

Ve třetím kroku se ze sekvencí odstraní přidané technické sekvence, tj. zůstane pouze sekvence pacienta (tzv. trimming).

Ve čtvrtém kroku se získané sekvence lokalizují v genomu (tzv. alignment). Přiřadí se jim konkrétní pozice na konkrétním chromosomu. K tomu se využívá teoretická sekvence, v mém případě se jednalo o hg19 (Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37)). Sekvence s přiřazenou lokalizací se ukládají ve formátu *.bam*

Následně další algoritmus vypíše pro jednotlivé vzorky všechny odlišnosti od hg19. Seznam těchto sekvenací zjištěných variant včetně detailů o jejich kvalitě je uložen v tabulkovém formátu *.vcf*.

Pomocí dalších programů, webovských aplikací se pak takto zjištěné varianty porovnávají s údaji ve veřejně dostupných databázích. Pokud se jedná o varianty již známé, je většinou dostupná v databázích informace o jejich frekvenčním zastoupení v populacích, jejich vlivu na strukturu bílkovin či vztah k onemocněním. K vyhodnocení nalezených variant je dále dostupná celá škála *in-silico* predikčních algoritmů. Pokud pomocí těchto zdrojů získáme informace k sekvenací nalezeným variantám, hovoříme o tzv. anotovaném *.vcf* souboru.

2 Experimentální část

Soubor, který byl v průběhu vykonávání této práce studován, obsahoval 250 vzorků vyizolované DNA z hluboko zamražených nádorových tkání pacientů. Soubor obsahoval pacienty obou pohlaví a různého věku.

DNA byla izolována pracovníky Endokrinologického ústavu. Další postup byl tak prováděn z připravených vzorků tkání o požadované koncentraci.

2.1 Příprava vzorku a PCR

Pro PCR metodu bylo potřeba vzorky připravit tak, aby obsahovaly všechny potřebné reagentie, díky kterým je možné konkrétní DNA správně namnožit.

Nejprve byla používána metoda jednotlivé PCR, kde je připravován mastermix pro každý exon zvlášť (singleplex PCR). Singleplex: Nejprve bylo do stripu napipetováno 3 μ l DNA o koncentraci 10 ng/ μ l a necháno na ledu. Do eppendorfky pro mastermixy bylo napipetováno požadované množství vody, chloridu hořečnatého (kofaktor polymerasy, optimalizace koncentrace Mg^{2+}), PCR pufru, nukleotidů (dNTPs), forward a reverse primerů.

Tabulka 2 – Přehled sekvencí použitých primerů pro amplifikaci genu EIF1AX

POUŽITÉ PRIMERY	Velikost PCR produktů
E1F: 5' - GGA AGG AAA AAG GGT CAC TGC - 3'	238 bp
E1R: 5' - CCT CCA GCA CCT ACT TGG TC - 3'	
E2F: 5' - TCC CCA GCT AAA AAA GAA AGG ATG T - 3'	513 bp
E2R: 5' - CTG GCT TTA GAA GAC ACC CAA GAT T - 3'	
E5F: 5' - AAA TCC ATA GTT CCT TCA CCT AAC CAG - 3'	262 bp
E5R: 5' - ACG GTG AGA TTT GAT TGT TTA TTC AAT ATG AGA - 3'	
E6F: 5' - ACA ACC TTA TTT AAG TGT CCC ATG TT - 3'	527 bp
E6R: 5' - TGA GTC TAT CTG ATG ATT AGT GAA CCA - 3'	

Jako poslední byla přidána Taq polymerasa. Vše bylo připraveno dle přiloženého protokolu (Tabulka 3). K připraveným vzorkům DNA bylo přidáno 12 μ l připraveného mastermixu pro konkrétní exony. Použila jsem AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Buffer II (Thermo Fisher Scientific). Výhodou této polymerasy je, že je upravena pro tzv. Hot start PCR reakce. Vydrží úvodní 10 min. trvající denaturaci DNA a teprve při této denaturaci se aktivuje. Tím se výrazně snižuje množství nespecifických amplifikací vznikajících při použití běžné Taq polymerasy.

Tabulka 3 – Protokol přípravy reagenční směsi pro metodu Singleplex PCR

EIF1AX - SINGLEPLEX				
	[μ l]	[μ l]	[μ l]	[μ l]
H ₂ O	5,0	5,0	5,0	5,0
25mM MgCl ₂	1,2	1,2	1,2	1,2
10xPCR Buffer II	1,5	1,5	1,5	1,5
2mM dNTPs	1,2	1,2	1,2	1,2
1 μ M Primer F	1,5	1,5	1,5	1,5
1 μ M Primer R	1,5	1,5	1,5	1,5
Taq (5U/ μ l)	0,1	0,1	0,1	0,1
Total mastermix:	12,0	12,0	12,0	12,0
DNA (10ng/ μ l)	3	3	3	3
Total:	15	15	15	15
Exon	1	2	5	6

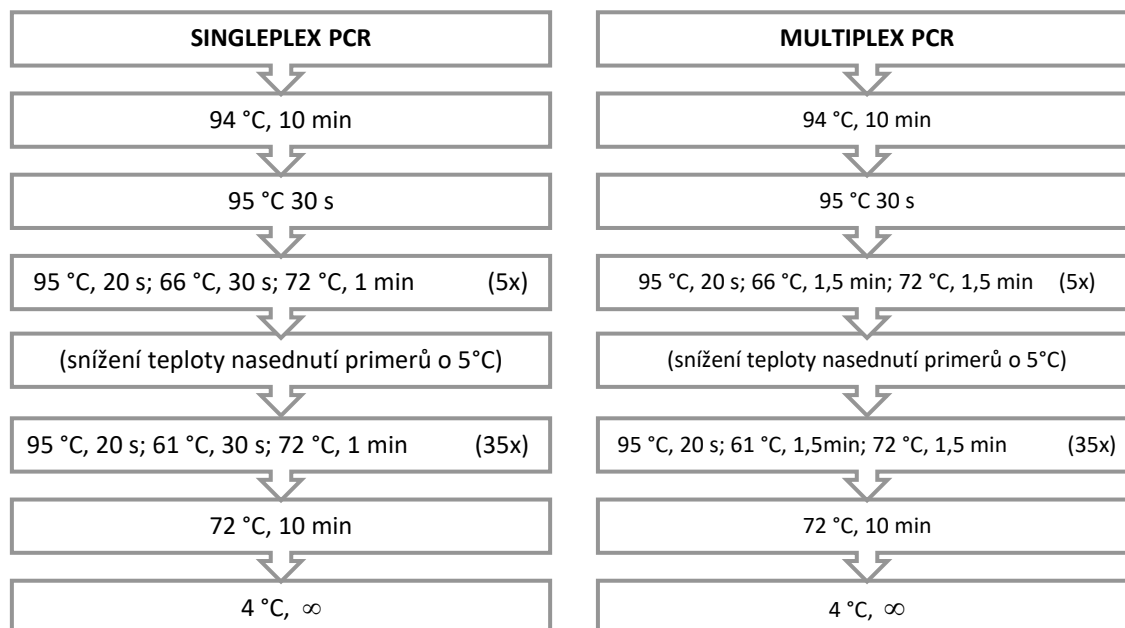
Další variantou byla multiplex-PCR, kde je možné pro všechny konkrétní exony připravit jeden mastermix obsahující všechny reagenty. Výhodou této metody je menší spotřeba chemikálií a urychlení přípravy mastermixu.

Multiplex: Pro správné namnožení templátu bylo potřeba ke vzorku přidat vodu, PCR pufr, chlorid hořečnatý a nukleotidy. Dále byly přidány primery odpovídající požadovanému genu a jeho exonům. Pro každý exon byly přidány dva primery, forward a reverse. Poté byla do směsi přidána Taq polymerasa. Tímto způsobem byla reakční směs připravena dle následujícího protokolu – Tabulka 4.

Tabulka 4 – Protokol přípravy reagenční směsi pro metodu multiplex PCR

EIF1AX - MULTIPLEX	
	[μ l]
H ₂ O	71,72
25mM MgCl ₂	17,6
10xPCR Buffer II	22
2mM dNTPs	17,6
10 μ M Primery 8x	35,2
Taq (5U/ μ l)	0,88
Total mastermix:	15
DNA (10ng/ μ l)	5
Total:	20
EXON	1, 2, 5, 6

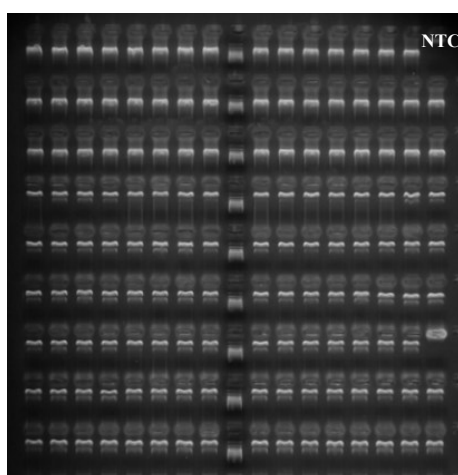
Takto připravená reakční směs byla vložena do termocyklieru BIO-RAD T100 Thermal Cycler, kde už reakce probíhala dle následujících programů (Obrázek 15).



Obrázek 15 – Použité teplotní programy pro multiplex a singleplex PCR reakce.

Po skončení reakce byly vzorky vyjmuty z přístroje a byla provedena kontrolní gelová elektroforéza, pro ověření přítomnosti vzniklého PCR produktu. V tomto případě se jednalo o horizontální gelovou elektroforézu, která je prováděna na 1,5% agarosovém gelu v 0,5x TBE pufru a probíhá při 90 V. Do gelu byl přidán 1,5ul fluorescenční GelRed barvičky (Biotium) na 100ml gelu. Jako zdroj proudu byl použit přístroj BIO-RAD Model 200/2.0 power supply. Elektroforéza probíhala přibližně 30 min. Tento postup byl zvolen na základě zavedené metody.

Po skončení elektroforézy byl gel umístěn nad UV světlo, díky kterému je možné vizualizovat PCR produkty (PCR produkty se během migrace v gelu obarvily interkalační barvičkou GelRed). Takto nasvícený gel byl vyfotografován.



Obrázek 16 – Fotografie výsledku elektroforézy pod UV světlem. NTC – negativní kontrola (voda místo DNA)

2.2 Sekvence nové generace (NGS)

V laboratoři byl používán přístroj MiSeq od firmy Illumina. Pro přípravu knihovny byl použit komerční kit Nextera XT DNA, jehož protokol je optimalizován na 1 ng vstupní DNA, v mém případě 1 ng PCR produktů. Přesně kvantifikované množství, které bylo použito pro Nextera XT, bylo získáno pomocí fluorometrické metody – Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific). V mém experimentu bylo použito 5 µl PCR produktů na 195 µl pracovního roztoku pro kvantifikaci. Následující diagram popisuje průběh práce s Nextera XT DNA Preparation Kit.



Obrázek 17 – Schéma NGS – na schématu je znázorněn postup přípravy DNA knihoven pomocí kitu NexteraXT pro sekvenování nové generace ve čtyřech základních krocích: tagmentace, amplifikace, PCR, pooling

V prvním kroku, zvaném tagmentace, byla vstupní DNA tagmentována (tagována a fragmentována) Nextera XT transposomy, které ji pseudonáhodně štěpí a zároveň přidávají odpovídající technické sekvence na konce vzniklých fragmentů, díky kterým je možné DNA amplifikovat pomocí PCR v následujícím kroku. V následující tabulce je zobrazen přehled užitých reagensů.

Tabulka 5 – Přehled užitých reagensů pro tagmentaci. Všechny reagensie jsou součástí Nextera XT kitu, který byl při práci použit.

Složka
ATM (Amplikační Tagmentační Mix)
TD (Tagmentační Pufř)
NT (Neutralizační Pufř)
Vstupní DNA (0,2 ng/ l)

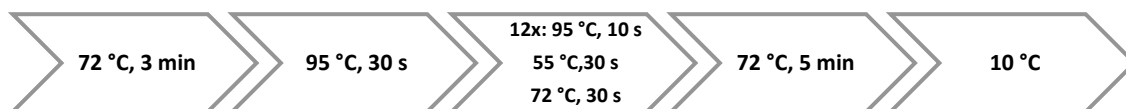
Do destičky bylo přidáno 10 µl TD pufru do každé jamky, která byla použita v tomto kroku. Dále bylo přidáno 5 µl vzorku vstupní DNA o koncentraci 2ng/µl a 5 µl ATM. Opět byla směs lehce propipetována. Destička s takto připravenými roztoky byla centrifugována 280 x g přesně 1 minutu při 20 °C. Poté byla destička umístěna do termocykleru, kde probíhala inkubace po dobu 5 minut při 55 °C.

Jakmile teplota vzorků klesla na 10 °C, okamžitě byla destička vyjmuta z cyklu a dále byla prováděna neutralizace NTA.

Bylo přidáno 5 µl NT pufru do každé jamky. Vše dohromady bylo propipetováno. Poté opět byla destička umístěna do centrifugy na 1 minutu při 20 °C. Dále byly vzorky nechány v destičce inkubovat při laboratorní teplotě 5 minut.

V dalším kroku byla tagmentovaná DNA amplifikována pomocí PCR programu. Dále v průběhu této reakce byly přidány indexy ke konkrétním vzorkům, díky kterým bylo poté možné identifikovat jednotlivé pacienty a jejich výsledky.

Do každé jamky bylo přidáno 15 µl NPM. Pomocí multikanálové pipety bylo přidáno do každé řady jamek 5 µl index primeru 2, poté bylo přidáno 5 µl index primeru 1. Každá jamka (vzorek) byla tak opatřena svou unikátní kombinací index primerů. Destička byla vložena na 1 minutu do centrifugy při 280 x g a 20 °C. Na termocykleru byl nastaven požadovaný program (viz. Obrázek 18) a destička byla umístěna dovnitř.



Obrázek 18 – schéma PCR programu v amplifikačním kroku kitu Nextera XT, který slouží k přidání technických sekvencí nezbytných pro vlastní sekvenaci.

Následný krok slouží k vyčištění vzniklých PCR produktů pomocí AMPure XP beads (Beckman Coulter). Produkty byly zbaveny nežádoucích krátkých fragmentů vzniklých v průběhu reakce. Na promytí byl připraven čerstvý 80% ethanol. K PCR produktům bylo přidáno 30 µl AMPure XT beads, jemně 10x propipetováno a necháno inkubovat po dobu 5 minut. Destička byla umístěna na magnetickou podložku na 2 minuty. Multikanálovou pipetou byl opatrně odebrán supernatant. Zbylé kuličky byly promyty 80% ethanolem tak, že nejprve bylo přidáno 200 µl ethanolu, dále necháno 30 s inkubovat na magnetické destičce a poté byl opět opatrně odebrán supernatant. Celý proces promývání byl ještě jednou zopakován. Kuličky byly nechány sušit na magnetické destičce 15 minut na vzduchu. Destička byla sejmuta z magnetické podložky a do každé jamky bylo přidáno 32,5 µl RSB, jemně propipetováno a necháno inkubovat 2 minuty. Opět byla destička umístěna na magnetickou podložku a nechána 2 minuty, dokud supernatant nebyl čistý. Do nové destičky bylo opatrně přeneseno multikanálovou pipetou 30 µl supernatantu.

Dále bylo provedeno fluorometrické měření na přístroji Qubit (Thermo Fisher Scientific) výsledné koncentrace jednotlivých indexů, které bylo jako kontrola před spuštěním sekvenování. Všechny koncentrace musely být vyrovnané, aby sekvenační reakce proběhla správně a efektivně. Při přípravě vzorků bylo smícháno stejné množství indexů, s již vyrovnanou koncentrací.

Multikanálovou pipetou bylo přeneseno 5 μ l jednotlivé naindexované knihovny, dále bylo smícháno v poměru 1:1 s 0,2M hydroxidem sodným, který byl přidán kvůli denaturaci. Směs byla promíchána na vortexu a 5 minut probíhala denaturace. Po uplynutí této doby bylo přidáno 990 μ l HT1. Z této směsi bylo odebráno 600 μ l do cartridge a vloženo do přístroje Miseq. V přístroji poté bylo provádění sekvenování připravené knihovny. Sekvence probíhala 2 dny. Sekvenační kit, který byl použit byl V3 kit. Tento typ obsahuje vylepšené reagencie, a tak umožňuje lepší kvalitu i kvantitu sekvence [www.illumina.com]. Sekvenační run byl koncipován jako obousměrné sekvenování (Paired-End) 2x 250 cyklů.

2.3 Bioinformatické vyhodnocení sekvenačních dat – MiSeq Reporter, IGV

Součástí sekvenátoru MiSeq je i základní bioinformatický software MiSeq Reporter (Illumina). Sekvenátor automaticky po skončení sekvenačních cyklů dle nastavení spouští konkrétní bioinformatickou pipeline dle požadovaného typu analýz. Použila jsem verzi MiSeq Reporter v2.3 s Amplicon DS workflow, s defaultním nastavením, vhodné pro vyhodnocení somatických dat [www.emea.illumina.com]. Vyhodnocovala jsme pouze sekvenační ready s kvalitou větší než 30 ($Q>30$), což u této technologie znamená pravděpodobnost špatně odečtené báze menší než 1 : 1000.

Získané *.bam* a *.vcf* soubory jsem vizualizovala a vyhodnotila pomocí Integrative Genomics Viewer v2.7 (IGV, Broad Institute) [Robinson, J.T., 2017].

Díky prohlížeči sekvencí IGV bylo možno osekvenované úseky DNA zobrazit, a tak pozorovat případné změny v genomu konkrétního pacienta. V programu jsem si zobrazila gen *EIF1AX*, jehož struktura je známa, a sledovala rozdíly mezi definovanou strukturou a strukturou pacientů s referenční sekvencí hg19. Podrobně byl prozkoumán každý vzorek, DNA pacienta byla prohlédnuta po jednotlivých exonech. V každém exonu byla nalezena prostřední hodnota počtu čtení, tzv. coverage (počet nezávislých sekvencí konkrétního úseku). V tomto kroku byly brány pouze varianty s hodnotou coverage vyšší než 500. Pokud v některém ze studovaných exonů byla přítomna libovolná mutace, program barevně zobrazil záměnu báze společně s informací ohledně procentuálního zastoupení obou variant. Tomuto postupu byly podrobeny všechny osekvenované vzorky.

2.4 Výsledky a diskuse

2.4.1 Studovaný soubor

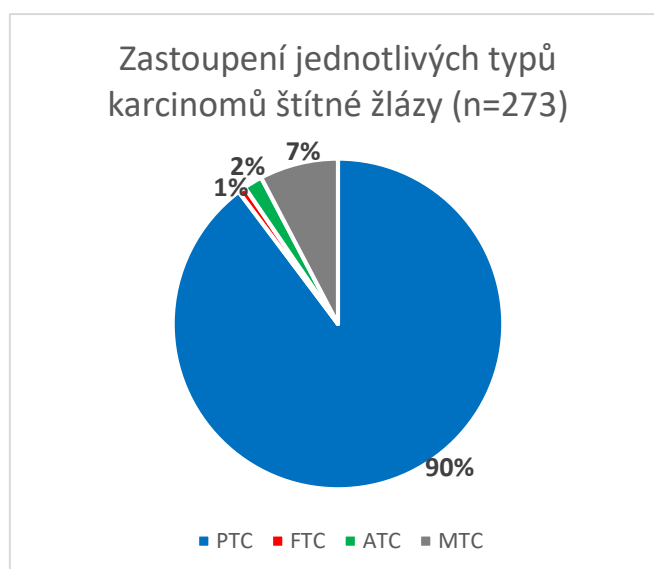
Studovaný soubor obsahoval 273 vzorků karcinomů štítné žlázy (izolovaná DNA ze zamražených nádorových tkání, případně krvi), které byly použity pro vyhledávání mutací a variant v genu *EIF1AX*, v exonech 1, 2, 5 a 6. Dle NGS metody a následného vyhodnocení pomocí zobrazovacího programu, se v souboru vyskytovaly téměř všechny typy karcinomů štítné žlázy. Velká většina nálezů karcinomů byla určena jako druh PTC čili papilární karcinom. Jak bylo zmíněno v teoretické části, tento karcinom se vyskytuje ze všech typů nejčastěji.

V tabulce 6 je zobrazeno zastoupení jednotlivých typů karcinomů štítné žlázy u žen a mužů ve studovaném souboru. Dále je v tabulce uveden průměrný věk diagnózy. Většina vzorků byla od pacientů ženského pohlaví.

Tabulku 6 - Studovaný soubor – zastoupení jednotlivých typů karcinomů

KARCINOM	POČET VYŠETŘENÝCH NÁDORŮ	PRŮMĚRNÝ VĚK DIAGNÓZY ROKY ± SD	POHLAVÍ M/Ž
PAPILÁRNÍ	245	38,6 let ± 22,25	67/178
FOLIKULÁRNÍ	2	66 let ± 0,0	2/0
ANAPLASTICKÝ	5	73,4 let ± 9,33	0/5
MEDULÁRNÍ	21	53,6 let ± 21,48	10/11

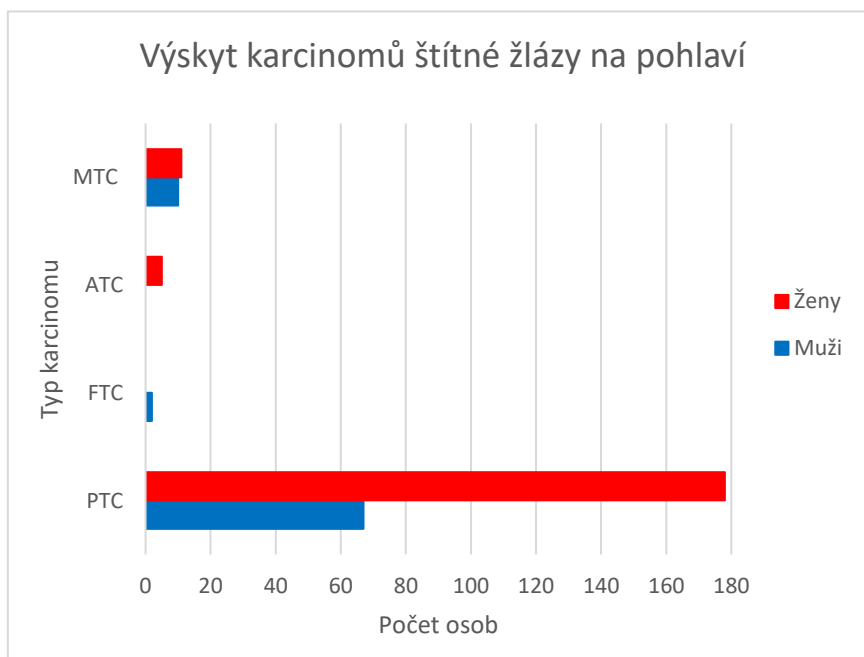
Na následujícím grafu je graficky zvýrazněno převládající zastoupení vzorků s papilárním karcinomem ve studovaném souboru.



Obrázek 19 - Procentuální zastoupení jednotlivých typů karcinomů štítné žlázy. Nejčastěji se vyskytujícím typem je PTC – papilární karcinom (90 %), dále MTC – medulární karcinom (7 %), ATC – anaplastický karcinom (2 %), FTC – folikulární karcinom (1 %). Hodnoty zjištěny ze studovaného souboru.

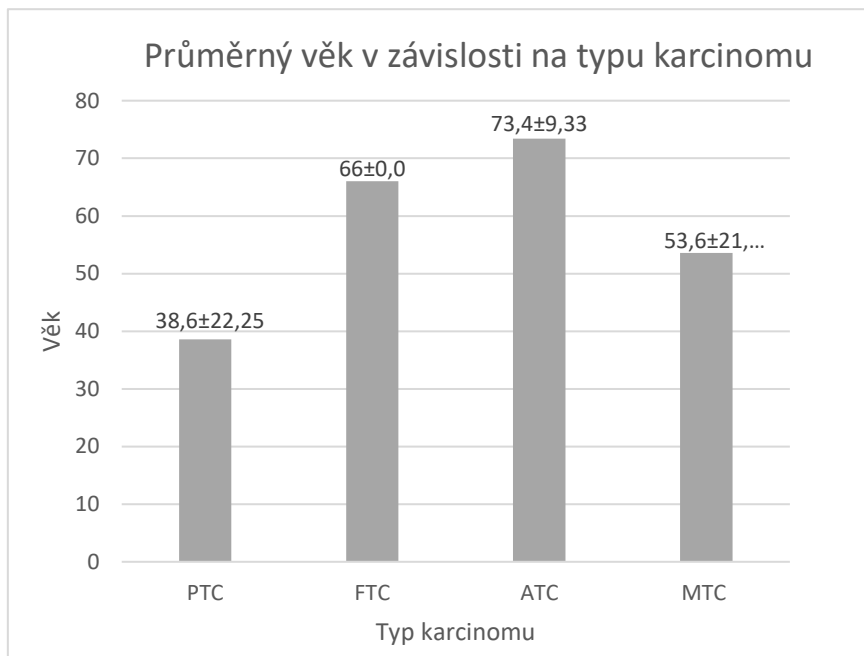
Nejčastěji vyskytujícím se typem karcinomu štítné žlázy byl papilární karcinom. PTC byl přítomen u 90 % pacientů. Tento výsledek se shoduje s celosvětovými výsledky, kde se uvádí prevalence okolo 80 % [Rahbari, R., 2010]. Ačkoliv je FTC druhým nejčastějším typem karcinomu, v našem souboru byl pouze v 1 % případů. Výskyt ATC je v našem souboru relativně nízký. Tento typ karcinomu se vyskytuje především pacientů s vyšším věkem, často v návaznosti na PTC. Anaplastický karcinom byl zaznamenán ve 2 % případů, což odpovídá celosvětovým výsledkům. Přes tento nízký výskyt (viz. kapitola 1.2) ale ATC způsobuje úmrtí až v 50 % případů rakoviny štítné žlázy [Vu-Phan, D., 2014]. Naštěstí díky úspěšné léčbě pacientů s PTC se trend výskytu anaplastického karcinomu snižuje [Albores-Saavedra, J., 2007]. MTC, způsobený C-buňkami, byl přítomen u 7 % pacientů. Výskyt medulárního karcinomu se v populaci uvádí okolo 3 % všech případů. Je tak 3. nejčastějším typem rakoviny štítné žlázy [https://www.thyroidcancer.com/thyroid-cancer/medullary].

Výskyt rakoviny štítné žlázy u žen je vyšší než u mužů (Obrázek 20). Muži naopak vykazují horší prognózu v pokročilém stádiu nemoci [Yao, R., 2011]. Jedním z možných důvodů, proč je výskyt rakoviny u žen častější, mohou být pohlavní hormony a jejich receptory. Zatím ale výsledky studií nejsou přesvědčivé. Změny hladin pohlavních hormonů u žen, během menstruačního cyklu nebo v těhotenství, byly studovány jako důvod k nerovnosti mezi pohlavími u PTC. Zjistilo se ale, že účinky reprodukčních faktorů s rizikem rakoviny štítné žlázy souvisí pouze slabě. Agresivnější typy karcinomů štítné žlázy, jako je ATC nebo MTC, mají u obou pohlaví podobný výskyt. [Rahbari, R., 2010].



Obrázek 20 – Výskyt karcinomů v závislosti na pohlaví pacienta. Z grafu je patrné, že největší množství vyskytujících se karcinomů je typu PTC, z toho většina u žen. Nález papilárního karcinomu byl jak u dětí, tak u dospělých lidí a seniorů, a tvořil 89,7 %. Nejmenší záchyt v našem souboru byl karcinomu folikulárního. Výskyt byl pouze u 2 pacientů, což tvoří necelé 1 %. Na rozdíl ATC byl nalezen v 5 případech (3 %). Medulární karcinom byl zachycen v 7 % případů.

Na obrázku 21, je zobrazen průměrný věk diagnózy pacientů z našeho studovaného souboru. PTC se nejčastěji vyskytoval u žen ve věku 40 let. FTC byl nalezen pouze u dvou žen ve věku 66 let. ATC, jehož záchyt byl 2 %, ukazoval průměrný věk 73,4 let. Je zjevné, že tento typ karcinomů se vyskytuje u starších osob nebo jako následek PTC, případně FTC, ze kterého může vzniknout, viz. Obrázek 6.



Obrázek 21 – Závislost věku pacienta na typu karcinomu štítné žlázy. Průměrný věk PTC byl 38,6 let \pm 22,25. nejčastěji se vyskytuje u žen ve věku 40 let. Průměrný věk FTC byl v našem souboru 66 let. Tento typ karcinomu byl nalezen pouze ve dvou případech. V obou případech se jednalo o 66 let starou ženu. ATC, který v tomto souboru byl nalezen u 2 % pacientů se vyskytoval při průměrném věku 73,4 let \pm 9,33. Tento typ karcinomu se běžně vyskytuje u starších pacientů. MTC byl nalezen při průměrném věku 53,6 let \pm 21,48.

2.4.2 Záchyt mutací v *EIF1AX*

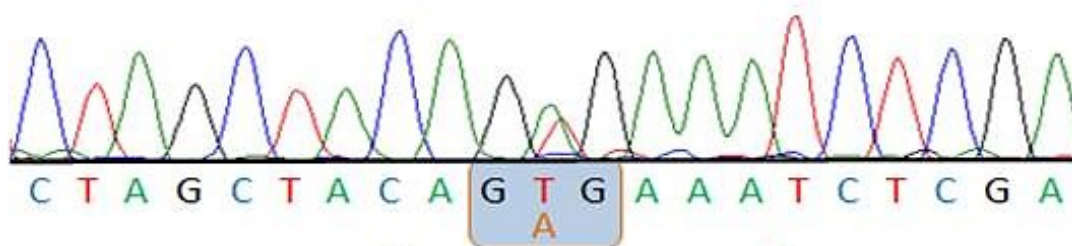
Varianty v *EIF1AX* genu byly zaznamenány pouze u papilárního karcinomu. Prevalence mutací v našem souboru je 1%, tato hodnota se shoduje s prevalencí, kterou udává v TCGA (The Cancer Genome Atlas). Nalezené varianty v genu byly 3 z 273 vzorků DNA, všechny v případě papilárního karcinomu, který byl zastoupen v 245 případech. Mutace v papilárním karcinomu jsou nejčastěji v *BRAF*, *RET* a *RAS* genech. Ve 20-40 % u PTC nacházíme RET/PTC přeskupení. Většina těchto příčin figuruje v MAPK signalizační dráze. Mutace poté ovlivňují správnost funkce této dráhy a přispívají k onkogenezi [Vu-Phan, D., 2014].

U folikulárního, anaplastického ani medulárního karcinomu nebyla ve studovaném souboru nalezena žádná mutace. Prevalence mutací u folikulárního karcinomu je nízká [Karunamurthy, A., 2016]. FTC nejčastěji obsahuje mutace v TERT promotoru [Duan, H., 2019] a také *RAS* mutace. V ATC se nachází mnoho mutací štítné žlázy, které byly popsány původně v diferencovaných karcinomech (PTC, FTC). Jedná se např. o mutaci RAS, která tvoří až 27 % případů. Další takovou mutací je BRAF, která tvoří 25 % případů [Vu-Phan, D., 2014]. Medulární karcinom je vzácná, ale agresivní forma rakoviny štítné žlázy. Skoro 25 % případů MTC má záchyt mutací v *RET* proto-onkogenu [Azar, F.K., 2015].

Nejčastější mutací je sestřihová mutace A113, která se nachází na rozhraní 6. exonu genu *EIF1AX*. A113 ovlivňuje sestřih transkriptů *EIF1AX*. Mutace A113 přináší větší riziko rakoviny než např. mutace v 2. exonu [Karunamurthy, A., 2016]. Výskyt této konkrétní mutace je nejčastěji u PTC, dále také ATC. Tato mutace v našem souboru však nalezena nebyla. Všechny záchyty byly v 1. exonu studovaného genu.

Více než 95 % případů *BRAF* mutací je mutace *BRAF*^{V600E}. Na pozici na 1799. nukleotidu dochází k přeměně Valinu na Glutamovou kyselinu v poloze aminokyseliny 600 na polypeptidovém řetězci. Tato mutace způsobuje aktivaci genu BRAF, který dále bez RAS genu, může aktivovat MEK/ERK. Tato mutace byla zachycena také v případě leukémie nebo rakoviny tlustého střeva [Vu-Phan, D., 2014].

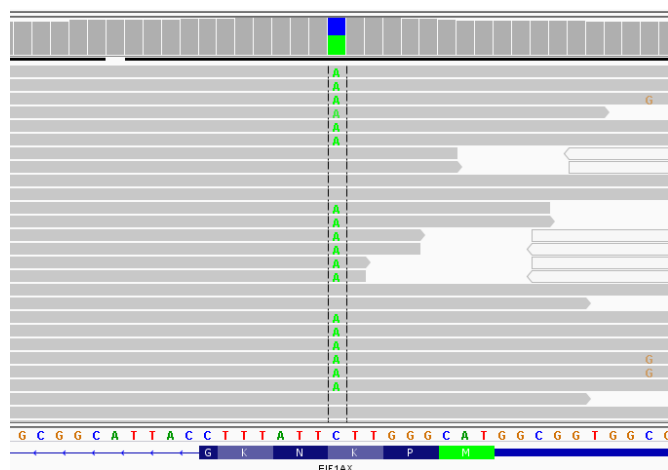
BRAF^{V600E}



Obrázek 22 – Zobrazení mutace BRAFV600E – záměna bází T/A Sangerovou metodou [převzato a upraveno www.horizondiscovery.com].

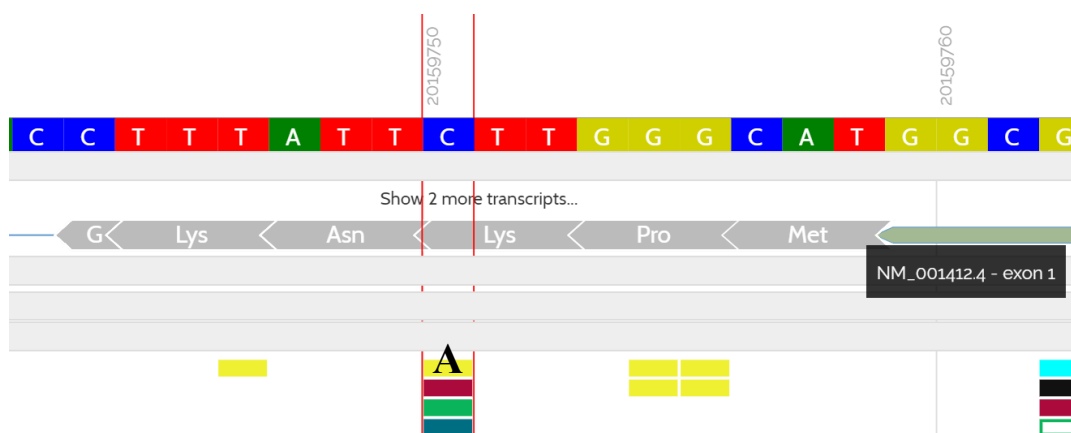
2.4.3 Klinický obraz zachycených variant v *EIF1AX* genu

Pacient s číslem 1246 je muž, který byl operován ve věku 72 let s diagnózou papilárního karcinomu o velikosti 20 mm. V lymfatických uzlinách byly přítomny metastázy. Ve vzorku DNA karcinomu byla nalezena záměna bází C/A v 3. kodonu 1. exonu (Obrázek 23), díky které v DNA došlo k záměně aminokyseliny lysin (K) za asparagin (N).



Obrázek 23 - Zobrazení nalezené mutace v prvním exonu genu *EIF1AX* pacienta 1246 pomocí zobrazovacích programů IGV

Obrázek 24 zobrazuje strukturu v konkrétní části genu *EIF1AX*. Ve vzorku DNA 1246 byla nalezena záměna bází, místo, ve kterém se mutace nacházela je vyznačeno červenými čarami. V tomto případě se díváme na původní strukturu genu.

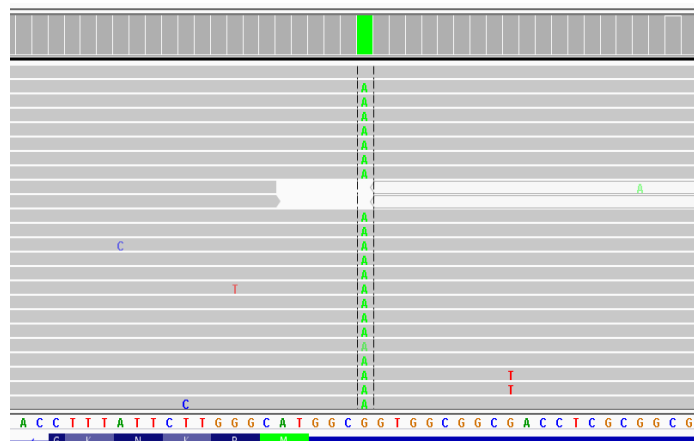


Obrázek 24 – Záměna bází (C/A) v 1. exonu, na 3. kodonu genu *EIF1AX* [převzato a upraveno www.varsome.com].

Tabulka 7 – Shrnutí nalezené mutace a popis její lokalizace v genu

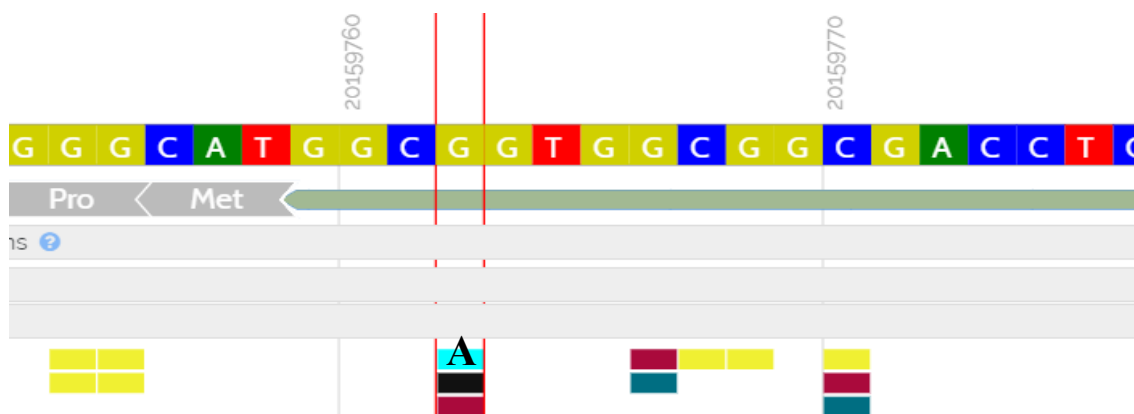
Genomická DNA změna	Exon	Změna kódování	Změna proteinu
chrX:g.20159750C>A	1	c.9G>T	K3N

Pacient s číslem 1291 je muž, operován v 82 letech pro neopouzdrěný papilární karcinom (PTC) o velikosti 35 mm. Nádor invazivně rostl přes pouzdro štítné žlázy do okolí. Byla nalezena angioinvaze, což znamená, že nádor dále roste do cév, a v lymfatických uzlinách metastázy. Mutace v tomto vzorku byla 98% záměna předpokládané báze G za novou bázi A. Jelikož se varianta nacházela v promotoru prvního exonu, nebyla tím DNA nijak významně ovlivněna. Význam této mutace není nijak definován, pravděpodobně má změna dopad na sestřih řetězce.



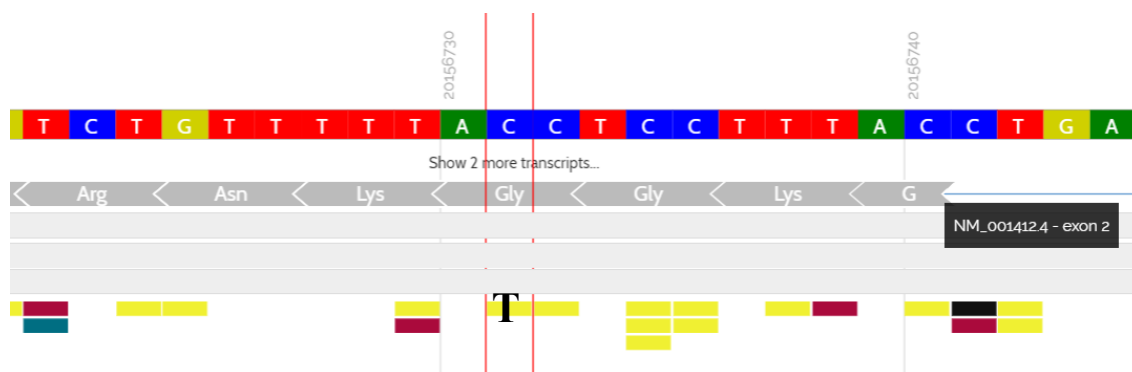
Obrázek 25 – Zobrazení zachycené mutace v intronu prvního exonu pomocí programu IGV.

Na obrázku 26 je zobrazena struktura genu EIF1AX, konkrétně promotor a počátek 1. exonu (Met). Červené čáry vyznačují místo, kde došlo ke zmíněné záměně bazí G/A.



Obrázek 26 – Záměna bazí G/A v promotoru exonu 1 [převzato a upraveno www.varsome.com].

Poslední vzorek, ve kterém byla nalezena varianta, byla pacientka s číslem 693. Byla operována ve věku 60 let. Byl u ní nalezen benigní uzel v pravém laloku o velikosti 25 mm. Nalezená varianta byla c.26G>A ve 2. exonu. Jedná se o záměnu bází C a T. Dle zdroje <https://varsome.com/variant/hg19/chrX-20156731-C-T> je tato záměna patogenní. V katalogu COSMIC bylo dále uvedeno, že je tato změna somatická [www.cancer.sanger.ac.uk].



Obrázek 27 – Záměna bází C/T na druhém exonu genu *EIF1AX* [převzato a upraveno www.varsome.com].

Tabulka 8 - Shrnutí nalezené mutace a popis její lokalizace v genu

Genomická DNA změna	Exon	Změna kódování	Změna proteinu
chrX:g.20156731C>T	2	c.26G>A	G9D

Dle zjištěných dat tento soubor neobsahoval žádné kombinace mutací, které jsou v případě *EIF1AX* velice časté [Cancer Genome Atlas Research, 2014]. Samotné mutace v genu nejsou tedy zřejmě tak agresivní, ale podporují malignitu společně s jinými mutacemi jako je např. *RAS* [Kunstman et al. 2015]. Agresivita mutací také souvisí s dalšími genetickými změnami konkrétního pacienta. Výzkum nových genů a jejich variant, které zapříčiňují rakovinu štítné žlázy nám pomáhají v lepším poznání další řídicích procesů a signalizačních drah těchto nádorů

Rakovina štítné žlázy a její příčinné geny vykazují menší počet mutací než u jiných druhů rakoviny. *EIF1AX* patří k jednomu z genů s nižším záchytem mutací mezi karcinomy štítné žlázy. S rostoucí diferenciací nádoru však záchyt mutací roste. Mutace genu *EIF1AX* zasahují do translace proteinů a v závislosti na typu karcinomu se mohou tyto zásahy šířit do různých oblastí genu [Simoës-Pereira, J., 2018]. Tento jev souvisí s funkcí *EIF1AX*, což je eukaryotický translační iniciační faktor 1A na chromozomu X.

Rakovina je výsledkem různých genetických změn, které ovlivňují stav a míru onemocnění. Díky postupnému poznávání těchto změn, mohou být poskytnuty lepší podmínky a léčebné procesy pro konkrétní pacienty [Vu-Phan, D., 2014].

3 Závěr

Cílem mé práce bylo shrnutí současných poznatků o příčinných genech u karcinomů štítné žlázy a molekulárně-genetická analýza genu *EIF1AX* pomocí moderních metod (NGS) s následným bioinformatickým zpracováním dat. Nádory štítné žlázy patří k nejčastějším malignitám endokrinního systému a jejich incidence každým rokem vzrůstá. Díky moderním technologiím a lepší dostupnosti informací se ale zvyšuje úspěšnost léčby [Cancer Genome Atlas Research, 2014].

Problematika, kterou jsem se při vypracovávání bakalářské práce zabývala je nová a důležitá pro celosvětově stoupající výskyt nádorů štítné žlázy. Pokusila jsem se rozšířit poznatky, co gen *EIF1AX* a jeho varianty způsobují.

Pro testování byla zavedena metoda multiplex PCR, která práci, konkrétně tedy přípravu vzorku, velice zrychlila a ulehčila. Dále byla použita metoda sekvenování nové generace (NGS), díky které je možno gen *EIF1AX* kvalitně sekvenovat a identifikovat jeho somatické varianty.

V našem souboru 273 pacientů byly nalezeny 3 mutace, což je 1% záchyt. Tato informace je shodná s informacemi z výzkumů po celém světě. Všechny zaznamenané mutace byly nalezeny u papilárního karcinomu štítné žlázy, který je nejrozšířenějším typem karcinomu štítné žlázy a vyskytuje se až v 90 % případů. PTC nacházíme více u žen, nejčastěji kolem 40. roku života. Papilární karcinom má nejlepší prognózu, je dnes ve velké většině případů úspěšně léčitelný.

Varianty PTC jsou různé a dle světové literatury můžeme říct, že kombinace mutací v genu *EIF1AX* s mutacemi např. v genu *RAS* jsou mnohem agresivnější než samostatně. V našem studovaném souboru nebyla nalezena v literatuře popisovaná nejčastější sestřihová mutace v pozici A113, která se vyskytuje na začátku 6. exonu genu *EIF1AX*. Bylo však nalezeno několik variant, které mohou v budoucnu přispět k novým poznatkům a k pochopení, jak gen *EIF1AX* vlastně funguje. Motivace pro vypracování této práce bylo, aby moje poznatky přispěly k lepší léčbě a konkretizování veškerých postupů s pacienty.

Toto onemocnění zcela nelze ovlivnit, ale díky moderním vědám se stále výzkum rakoviny štítné žlázy posouvá vpřed.

Reference

- Abdullah M.I, Junit S.M, Ng K.L, Jayapalan J.J, Karikalan B., Hashim O.H. (2019). Papillary Thyroid Cancer: Genetic Alterations and Molecular Biomarker Investigations. *Int J Med Sci.* 2019;16(3):450–460.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the cell.* 4. vyd. New York: Garland Science, 1462 pp.; 91(3): 401.
- Albores-Saavedra, J., Henson, D.E., Glazer, E., Schwartz, A.M. (2007). Changing Patterns in the Incidence and Survival of Thyroid Cancer with Follicular Phenotype—Papillary, Follicular, and Anaplastic: A Morphological and Epidemiological Study. *Endocrine Pathology.*; 18:1.
- Anatomie štítné žlázy, <https://falco-petrovickyvit.webnode.cz/zdravi/stitna-zlaza/>, vyhledáno 26.12.2019.
- Azar, F.K., Lee, S.L., Rosen, J.E. (2015). Medullary thyroid cancer: an update for surgeons.; 81(1):1-8.
- Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing?. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236–238.
- Bendlová, B., Sýkorová, V., Václavíková, E., Včelák, J., Katra, R., Sýkorová, P., Vlček, P., Dvořáková, Š. (2016). Nádory štítné žlázy u dětí a dospívajících a jejich molekulárně genetická podstata.
- Bendlová, B., Dvořáková, Š., Sýkorová, V. et al. (2011). Genetika nádorů štítné žlázy a jejich molekulárně cílená léčba, *Onkologie.*; 5(6): 325-328.
- Besser J, Carleton H.A., Gerner-Smidt P., Lindsey R.L., Trees E. (2018). Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect.*24(4):335–341.
- Bioinformatika, <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq/products-services/miseq-reporter.html?langsel=/cz/>, vyhledáno 14.12.2019.
- Brent, G.A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 122(9):3035–3043.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Genome Atlas Program Office, National Cancer Institut at NIH.*;159(3):676-90.
- Clemens, M.J. (2001). Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis.; 27:57-89.
- Cote, G.J. (2015). Grubbs EG, Hofmann MC. Thyroid C-Cell Biology and Oncogenic Transformation. *Recent Results Cancer Res.*; 204:1–39.
- Čihák, R., Grim, M. (2002). *Anatomie 2*, 735 21-08/4, 08-060-88.

Distribuce hormonů <http://fbllt.cz/skripta/xi-regulacni-mechanismy-1-endokrinni-regulace/2-obecne-principy-endokrinni-regulace/>, vyhledáno 2.1.2020.

Duan, H., Liu, X., Ren, X., Zhang, R. et al. (2019). Mutation profiles of follicular thyroid tumors by targeted sequencing. *Diagn Pathol* 39. *Molecular Pathology Research.*;14(1):39.

Dylevský, I., (2009). *Funkční anatomie*. 1. vyd. Praha: Grada 532 s., ISBN 978-80-247-3240-4.

EIF1AX,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=1964>, vyhledáno 26.12.2019.

Elektorforetická separace nukleových kyselin, <https://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>, vyhledáno 14.9.2019.

Elektroforéza, <http://decodingdna.yolasite.com/capillary-electrophoresis.php>, vyhledáno 14.9.2019.

Fluorometr Qubit, https://en.wikipedia.org/wiki/Qubit_fluorometer, vyhledáno 15.12.2019

Gen BRAF, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673?log\\$=activity](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673?log$=activity), vyhledáno 26.12.2019.

Gen H-RAS, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3265?log\\$=activity](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3265?log$=activity), vyhledáno 26.12.2019.

Gen K-RAS, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845?log\\$=activity](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845?log$=activity), vyhledáno 26.12.2019.

Gen N-RAS, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4893?log\\$=activity](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4893?log$=activity), vyhledáno 26.12.2019.

Guillemin, R. (2008). Somatostatin: začátky, 1972. *Mol Cell Endocrinol.*; 286 (1-2): 3-4.

Jiskra, J., (2011). *Poruchy štítné žlázy: praktický přehled nejen pro laickou veřejnost*. 1. vyd. Praha: MF, 46 s., ISBN 978-80-204-2456-3.

Katalog somatických mutací COSMIC, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=102125677>, vyhledáno 8.1.2020.

Karunamurthy, A., Panebianco, Hsiao, J.S., et al. (2016). Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules. *Endocr Relat Cancer.*;23(4):295–301.

Kodíček M., Valentová O., Hynek R.; *BIOCHEMIE chemický pohled na biologický svět*; Praha; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; 2015; ISBN 978-80-7080-927-3 (str. 66; 203-204)

- Krishnamoorthy, G.P., Davidson, N.R., Leach, S.D., Zhao, Z., et al. (2019). Mutations Cooperate to Drive Thyroid Tumorigenesis through ATF4 and c-MYC. *Cancer Discov*;9(2):264-281.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M. et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*.;27(2-3):95-125.
- Kunstman, J.W., Christofer Juhlin, C., Goh , G., Brown, T..C., Stenman, A., Healy, .J.M. et al. (2015). Characterization of the mutational landscape of anaplastic thyroid cancer via whole-exome sequencing, *Human Molecular Genetics*, Volume 24, Issue 8, Pages 2318–2329.
- Luster, M., Aktolun, C., Amendoeira, I., Barczyński, M. et al. (2019). Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: Proceedings of an Interactive International Symposium.;29(1):7-26.
- Mitchell, K., Iadarola, M.J. (2010). RT-PCR Analysis of Pain Genes: Use of Gel-Based RT-PCR for studying Induced and Tissue-Enriched gene Expression., *Methods Mol Bio*.;617: 279-295.
- Molinaro, E., Romei, C., Biagini, A., Sabini, E., Agate, L., Mazzeo,, S., Materazzi, G., Sellari-Franceschini, S., Ribechini, A., Torregrossa, L., Basolo, F., Vitti, P., Elisei, R., (2017). Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to genetics and advanced therapies., *Nat Rev Endocrinol*.;13(11):644-660.
- Morrison, D.K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.;4(11):a011254.
- Negativní zpětná vazba, <https://www.akutne.cz/index.php?pg=vyukove-materialy--algoritmy&agid=837&>, vyhledáno 25.12.2020.
- PCR, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>, vyhledáno 8.1.2020.
- PCR, <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>, vyhledáno 23.12.2019.
- Pestana, A., Vinagre, J. et al. (2017). TERT biology and function in cancer: beyond immortalisation. *Journal of Molecular Endocrinology*.
- NEXTERA XT DNA Library Prep, Reference Guide, Illumina, 2019
- Rahbari, R., Zhang, L., Kebebew, E. (2010). Thyroid cancer gender disparity. *Future Oncol*.;6(11):1771–1779.
- Raue, F., Frank-Raue, K. (2016). Thyroid Cancer: Risk-Stratified Management and Individualized Therapy., *Clin Cancer Res*.;22(20):5012-5021.
- Ret proto-onkogen, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5979#general-protein-info>, vyhledáno 26.12.2019.

Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Wenger A.M, Zehir, A., Jill P. Mesirov, J.P. (2017). Variant Review with the Integrative Genomics Viewer (IGV). *Cancer Research* 77(21) 31-34

Ron, E., Lubin, J.H., Shore, R.E., Mabuchi, K., Modan, B., Pottern, L.M., Schneider, A.B., Tucker, M.A., Boice, J.D. (1995). Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiation Research*, 141. 259-277.

SBS, <https://binf.snipcademy.com/lessons/ngs-techniques/illumina-solexa>, vyhledáno 2.1.2020.

Schéma PCR, <https://microbeonline.com/polymerase-chain-reaction-pcr-steps-types-applications/>, vyhledáno 2.1.2020.

Simoës-Pereira, J., Moura, M.M., Marques, I., Rito, M., Cabrera, R., Leite, V., Cavaco, B. (2018). The role of EIF1AX in thyroid cancer tumourigenesis and progression. *Journal of Endocrinological Investigation*. 42. 1-6. 10.1007/s40618-018-0919-8.

Struktura genu EIF1AX, <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=12248&showAllSites=true>, vyhledáno 26.12.2019.

Strukturní vzorec thyroxinu, <https://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:L-Thyroxin.svg>, vyhledáno 2.1.2020.

Strukturní vzorec trijodthyroninu, <https://cs.wikipedia.org/wiki/Trijodthyronin>, vyhledáno 2.1.2020.

Struktura hormonů, <http://fb.lt.cz/skripta/xi-regulacni-mechanismy-1-endokrinni-regulace/5-hormony-stitne-zlazy-a-pristitnych-telisek/>, vyhledáno 3.1.2020.

Syntéza hormonů štítné žlázy, schématické znázornění průběhu syntézy, https://www.wikiskripta.eu/w/Hormony_%C5%A1t%C3%ADtn%C3%A9_%C5%BEl%C3%A1zy#/media/File:Thyroid_hormone_synthesis.png], vyhledáno 26.12.2019.

Tirrò, E., Martorana, F., Romano, Ch., Rita, S. (2019). Molecular Alterations in Thyroid Cancer: From Bench to Clinical Practice.;10(9): 709.

Vu-Phan, D. et al. (2014). Genetics and epigenetics of sporadic thyroid cancer

Yao, R., Chiu, C.G., Strugnell, S.S., Gill, S., Wiseman, S.M. (2011). Gender Differences in Thyroid Cancer.; 6(2):215-243.

Yoo, S.K., Lee, S., Kim, S.J., Jee, H.G., Kim, B.A., Cho, H., Song, Y.S., Cho, S.W., Won, J.K., Shin, J.Y., Lee, K.E., Park, Y.J., Seo, J.S. (2016). Comprehensive Analysis of the Transcriptional and Mutational Landscape of Follicular and Papillary Thyroid Cancers, Genomic Medicine Institute, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

Zaballos, M.A., Santisteban, P. (2017). Key signaling pathways in thyroid cancer. *J Endocrinol.*;235(2):R43-R61.

Zarebczan, B. (2010). Chen H. Multi-targeted approach in the treatment of thyroid cancer. *Minerva Chir.*;65(1):59–69.

Záměna bazí (C/A) v 1. exonu, na 3. kodonu genu EIF1AX, <https://varsome.com/variant/hg19/chrX-20159750-C-T>, vyhledáno 8.1.2020.

Záměna bazí C/T na druhém exonu genu EIF1AX, <https://varsome.com/variant/hg19/chrX-20156731-C-T>, vyhledáno 8.1.2020.

Záměna bazí G/A v promotoru exonu 1, <https://varsome.com/variant/hg19/chrX-20159762-G-A>, vyhledáno 8.1.2020.

Zobrazení mutace BRAFV600E, <https://horizondiscovery.com/products/diagnostic-reference-standards/PIFs/BRAF-V600E-Reference-Standard-50>, vyhledáno 8.1.2020.

Seznam užitých zkratek

A – Adenin

A113_splice – Mutace genu EIF1AX lokalizována na kodonu 113, sestřihu 5. intronu a 6. exonu

ATC – Anaplastický karcinom štítné žlázy (*Anaplastic thyroid carcinoma*)

ATF4 – Aktivační transkripční faktor 4 (*Activation transcription factor 4*)

ATM – Amplicon tagment mix

ATPáza – Adenosintrifosfatáza, enzym katalyzující hydrolýzu adenosintrifosfátu

BP – Počet párů bází (*Base pair*)

BRAF – Lidský gen kódující protein B-Raf

C – Cytosin

cAMP – cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát

C-buňky – Parafolikulární buňky štítné žlázy

dATP – Deoxyadenosintrifosfát

dCTP – Deoxycytidintrifosfát

dGTP – Deoxyguanosintrifosfát

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

dNTP – Deoxynukleosidtrifosfát

dNTPs – Deoxynukleosidtrifosfáty

dsDNA – Dvojřetězcová DNA (*Double-stranded DNA*)

dTTP – Deoxythimidintrifosfát

EIF1AX – Eukariotický translační iniciační faktor 1A na chromozomu X (*Eukaryotic initiation factor 1A on chromosome X*)

ERK – Extracelulární signál-regulující kináza (*Extracellular signal-regulated kinase*)

FASTQ – Formát dat v bioinformatice vyvinutý Wellcome Trust Sanger Institute

FNAB – Aspirační biopsie tenkou jehlou (*Fine-needle aspiration biopsy*)

FTC – Folikulární karcinom štítné žlázy (*Follicular thyroid carcinoma*)

G – Guanin

GDP – Guanosindifosfát

GRB2 – Protein vázaný na receptor růstového faktoru (*Growth factor receptor-bound protein 2*)

GRCh37 – Genomové referenční lidské konsorcium sestavení 37 (*Genome Reference Consortium Human Build 37*)

GTP – Guanosintrifosfát
GTPáza – Guanosintrifosfatáza, enzym hydrolyzující GTP
HT1 – Hybridizační pufr
CHEK2 – Gen produkující protein checkpoint kinase 2
IGV – Integrační genomický prohlížeč (*Integrative genomics viewer*)
K – Lysin
MAPK – Mitogenem aktivovaná proteinkináza (*Mitogen-activated protein kinase*)
MEK – Kináza mitogenem aktivované proteinkinázy (*Mitogen-activated protein kinase kinase*)
mRNA – Mediátorová ribonukleová kyselina
MTC – Medulární karcinom štítné žlázy (*Medullary thyroid carcinoma*)
N – Asparagin
NGS – Sekvence nové generace (*Next generation sequencing*)
NPM – Tagment DNA enzym
NT – Neutralize tagment buffer
PCR – Polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)
PDTC – Špatně diferencovaný karcinom štítné žlázy (*Poorly differentiated thyroid carcinoma*)
PPM1D – Proteinová fosfatáza protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependentní (*Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1D*)
PTC – Papilární karcinom štítné žlázy (*Papillary thyroid carcinoma*)
PTH – Parathormon
RAS – Skupina genů produkující protein kontrolující růst buněk
RET – Gen pro produkci signalizačního proteinu (*Rearranged during transfection*)
RNA – Ribonukleová kyselina
RSB – Resuspension buffer
SBS – Sekvence syntézou komplementárního řetězce (*Sequencing by synthesis*)
SOS – Adaptorový protein (*Son of Sevenless*)
ssDNA – Jedořetězcová DNA (*Single-stranded DNA*)
T3 – Trijodthyronin
T4 – Thyroxin
Tag polymeráza – Termostabilní DNA polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*
TBE pufr – Tris-borate-EDTA

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TD – Tagment DNA buffer

TERT – Gen tvořící část enzymu telomerázy

TR receptory – Receptory hormonů štítné žlázy (*Thyroid hormone Receptors*)

TRH –Thyreotropin uvolňující hormon (*Thyreotropin releasing hormone*)

TSH – Thyreotropin

UV – Ultrafialové záření (*ultra violet*)

V600E – Záměna glutamátu za valin na pozici 600 peptidového řetězce

WDTC – Dobře diferencovaný karcinom štítné žlázy (*Well-differentiated thyroid carcinomas*)