

**Univerzita Karlova v Praze  
1.lékařská fakulta  
Ústav biochemie a experimentální onkologie**

---

# **ÚLOHA GENU *ATM* U KARCINOMU PRSU**

**Dizertační práce**

---

**Mgr. Jana Soukupová**  
**Školitel: doc. MUDr. Petr Pohlreich, CSc.**  
Ústav biochemie a experimentální onkologie 1.LF UK v Praze

2008

## OBSAH

OBSAH .....	2
1. ÚVOD .....	5
1.1 Karcinom prsu .....	5
1.2 Histologické typy nádorů prsu .....	8
1.2.1 Receptory steroidních hormonů (estrogenové receptory – ER, progesteronové receptory – PR).....	9
1.2.2 c-ErbB-2 (HER2/neu) .....	10
1.2.3 Ki-67.....	11
1.3 Molekulární genetik a nádorů prsu.....	11
1.4 Gen <i>ATM</i> .....	12
1.5 Gen <i>ATM</i> a jeho proteinový produkt.....	13
1.6 Fukce proteinu <i>ATM</i> .....	15
1.7 <i>ATM</i> a nádory .....	19
1.8 <i>ATM</i> a dědičný karcinom prsu .....	19
1.9 <i>ATM</i> a sporadický karcinom prsu.....	21
2. CÍLE PRÁCE .....	23
3. MATERIÁL A METODY .....	24
3.1 Výběr pacientek pro mutační analýzu genu <i>ATM</i> .....	24
3.2 Výběr pacientek pro analýzu sporadických karcinomů prsu.....	25
3.3 Izolace DNA.....	26
3.3.1 Izolace DNA z plné periferní krve .....	26
3.3.2 Izolace DNA z parafinových bločků .....	26
3.3.3 Izolace DNA ze zmražené tkáně .....	27
3.4 Izolace RNA .....	27
3.4.1 Izolace celkové buněčné RNA z krve .....	27
3.4.2 Izolace RNA ze zmražené tkáně .....	27
3.5 Kontrola množství a kvality izolovaného genetického materiálu .....	27
3.6 Příprava cDNA .....	28
3.7 Mutační analýza <i>ATM</i> .....	28
3.7.1 Amplifikace genu <i>ATM</i> .....	28
3.7.2 Protein truncation test (PTT).....	30
3.7.3 Automatické sekvenování .....	31

3.7.4 Označení mutací .....	32
3.8 Kvantitativní analýza sestřihových mutací .....	32
3.9 Analýza ztráty heterozygosity .....	33
3.9.1 Mikrosatelitové markery .....	33
3.9.2 Amplifikace mikrosatelitových markerů .....	33
3.9.3 Analýza mikrosatelitových markerů .....	34
3.9.3.1 Elektroforéza na komerčně dostupných gelech Spreadex .....	34
3.9.3.2 Fragmentační analýza na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130 .....	35
3.10 Analýza metylace promotoru ATM .....	35
3.10.1 Bisulfitové sekvenování .....	35
3.10.2 MS-MLPA .....	38
3.11 Imunohistochemická analýza .....	43
4. VÝSLEDKY .....	44
4.1 Genetický materiál .....	44
4.2 Výběr pacientek .....	44
4.2.1 Dědičný karcinom prsu .....	44
4.2.2 Sporadický karcinom prsu .....	45
4.3 Mutační analýza genu <i>ATM</i> .....	48
4.3.1 Hereditární karcinom prsu .....	48
4.3.2 Sporadický karcinom .....	52
4.4 Kvantitativní analýza sestřihových mutací .....	52
4.5 Analýza ztráty heterozygosity v lokusu <i>ATM</i> .....	53
4.5.1 Elektroforéza na gelech Spreadex .....	54
4.5.2 Fragmentační analýza na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130 .....	54
4.5.3 LOH analýza u nosiček mutací v genu <i>ATM</i> .....	56
4.5.4 Ztráta heterozygosity u pacientů se sporadickým karcinomem prsu .....	57
4.6 Analýza metylace promotoru genu <i>ATM</i> .....	60
4.6.1 Bisulfitové sekvenování .....	60
4.6.2 MS-MLPA .....	60
4.6.3 Analýza metylace promotorové sekvence u nosiček mutací genu <i>ATM</i> .....	61
4.6.4 Analýza metylace promotoru genu <i>ATM</i> u sporadického karcinomu prsu .....	63
4.7 Imunohistochemická analýza proteinu <i>ATM</i> .....	68
4.7.1 Imunohistochemická analýza u nosiček hereditárních mutací v genu <i>ATM</i> .....	68
4.7.1 Imunohistochemická analýza u sporadického karcinomu prsu .....	69

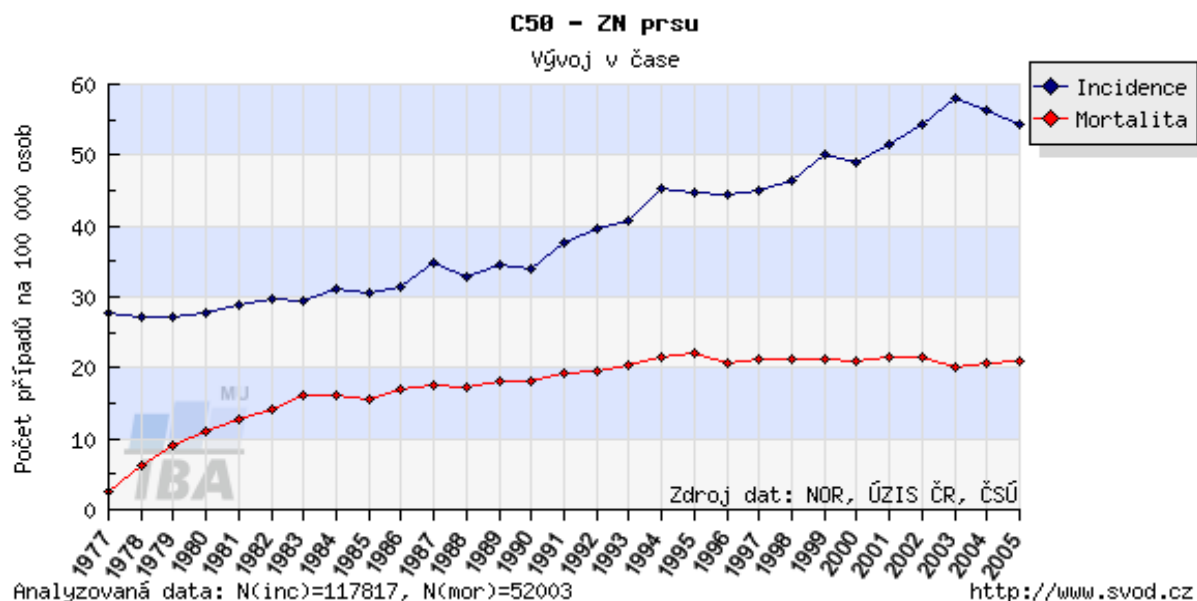
5. DISKUZE.....	71
5.1 <i>ATM</i> a hereditární karcinom prsu.....	71
5.1.1 Mutační analýza genu <i>ATM</i> .....	71
5.1.2 Analýza nádorové tkáně u nosiček mutací v genu <i>ATM</i> .....	72
5.2 <i>ATM</i> a sporadický karcinom prsu.....	73
5.2.1 Popis souboru .....	73
5.2.2 Analýza ztrát heterozygosity v lokusu <i>ATM</i> .....	73
5.2.3 Mutační analýza genu <i>ATM</i> .....	74
5.2.4 Analýza metylace promotoru <i>ATM</i> .....	74
5.2.5 Inaktivace genu <i>ATM</i> .....	76
6. ZÁVĚR.....	77
PODĚKOVÁNÍ.....	79
SEZNAM ZKRATEK.....	80
POUŽITÁ LITERATURA.....	83

# 1. ÚVOD

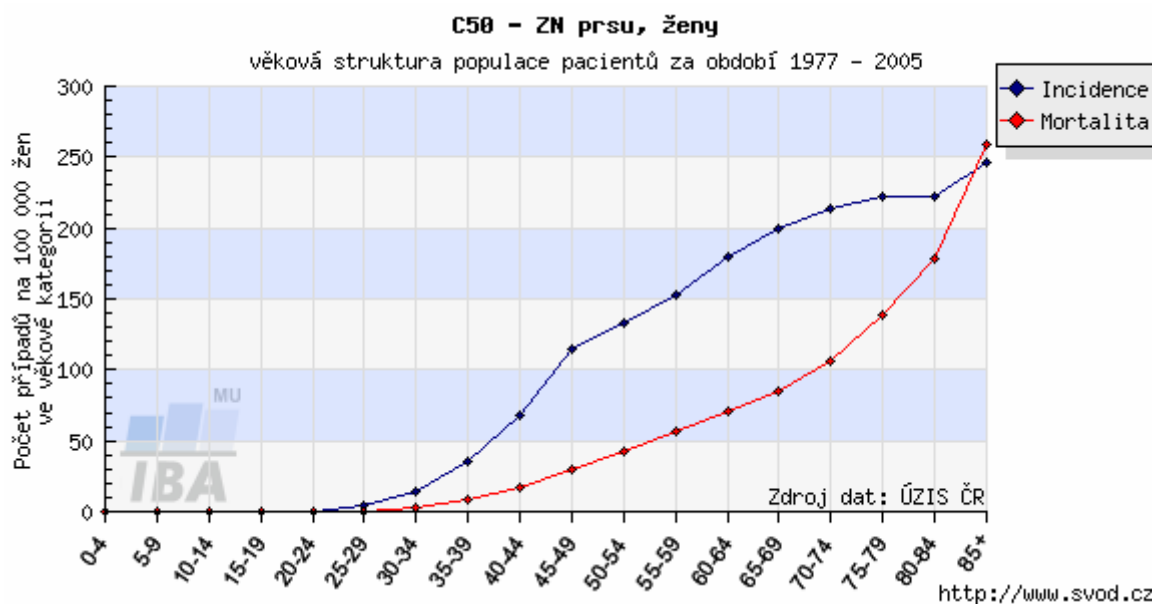
## 1.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem u žen v České republice i v ostatních evropských zemích. Zařazuje se mezi tzv. civilizační choroby, i když se jedná o onemocnění s velmi dlouhou historií, které bylo ze staroegyptských papyrů známo již 3000 let před Kristem.

Incidence tohoto nádorového onemocnění má u nás, podobně jako ve většině dalších zemí, stoupající tendenci a v posledních 20 letech se zdvojnásobila ([www.svod.cz](http://www.svod.cz)). Toto onemocnění je řazeno u žen co do výskytu na první místo, nejsou-li počítány nemelanomové nádory kůže. Mortalita se rovněž zvyšuje, i když méně výrazně než incidence (Obrázek 1). Věkovou distribuci pacientek s karcinomem prsu ukazuje obrázek 2.



**Obrázek 1:** Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100000 osob) pro diagnózu karcinomu prsu v celé populaci v ČR. ZN – zhoubný nádor.



**Obrázek 2:** Graf zobrazuje věkově specifickou incidenci a mortalitu u pacientek s diagnózou karcinomu prsu, tj. počet případů karcinomu prsu a zemřelých na tuto diagnózu na 100000 žen v dané věkové kategorii. ZN – zhoubný nádor.

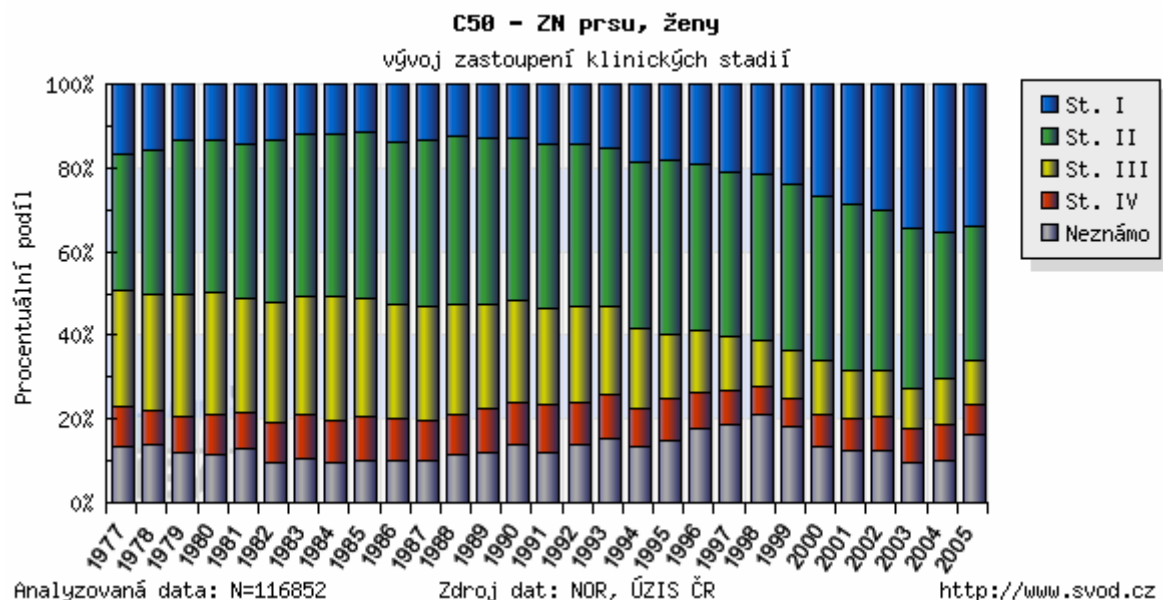
Prognóza onemocnění se liší podle jeho stádia v době diagnózy. U nádorů menších než 2 cm bez postižení spádových uzlin (stadium I) přežívá 5 let více než 90% nemocných. U větších nádorů (stadium II) a zejména při postižení uzlin a přítomnosti vzdálených metastáz (stadium III-IV) se prognóza výrazně zhoršuje (Tabulka 1). Mezi další prognostické a prediktivní faktory patří věk pacientky v době onemocnění (zejména ve vztahu k nástupu menopauzy) a exprese hormonálních receptorů v nádorové tkáni. Významná je rovněž histopatologická klasifikace nádoru.

**Tabulka 1:** Pětileté přežívání žen s karcinomem prsu (diagnostikovaný v letech 1991-1995).

Pravděpodobnost přežití 5ti let v %					
stádium	věková skupina				celkem
	0-39	40-54	55-69	70+	
všechna	70,3	72,7	62,8	40,8	59,2
I. a II.	80,8	84,5	78,1	57,5	75,2
III., IV. a neurčeno	46,3	49,9	42,2	26,2	38,0

Zastoupení klinických stádií diagnostikovaných u pacientek s karcinomem prsu se rovněž mění (Obrázek 3). Časový vývoj zastoupení klinických stádií ukazuje samotnou

situaci v populaci, nicméně zobrazené údaje jsou také ovlivněny zavedením plošného mammografického screeningu v září 2002 nebo postupně zaváděnými změnami v metodice TNM klasifikace (www.svod.cz).



**Obrázek 3:** Graf zobrazuje časový vývoj % zastoupení klinických stadií. Klinická stadia jsou určována na základě TNM klasifikace platné v době stanovení diagnózy pacienta. ZN – zhoubný nádor.

Etiologie nádorů prsu je multifaktoriální a podílejí se na ní jak genetické, tak negenetické faktory. Z epidemiologických dat vyplývá, že rakovina prsu je onemocnění bohatých společností, které si osvojily západní životní styl charakterizovaný nedostatkem fyzické aktivity a vysokokalorickou stravou bohatou na živočišné tuky a proteiny [1]. Důležitou roli podmínek okolního prostředí naznačují studie populací migrujících z oblastí s nízkým rizikem do oblastí s vysokým rizikem. Migrující populace dosahuje rizika hostitelské země během jedné až dvou generací [2,3].

Nejzávažnějším rizikovým faktorem u nádorů prsu je rodinný výskyt onemocnění a časný věk postižených v době diagnózy. Karcinomy prsu se zřídka objevují před 25. rokem, jejich incidence se ale rychle zvyšuje s věkem. Nádory vyskytující se u žen nad 45 let představují 85% z celkového počtu onemocnění.

Karcinom prsu se častěji vyskytuje u žen s časným nástupem menarche, bezdětností, pozdním prvním těhotenstvím a pozdní menopauzou, což reflektuje zvýšený počet menstruačních cyklů [4] a naznačuje, že karcinom prsu patří k onemocněním hormonálně dependentním. Dlouhodobé působení endogenních estrogenů na prsní žlázu je považováno za

jeden z důležitých etiologických faktorů. Výsledky studií zabývajících se vlivem hormonální substituční terapie a orálních kontraceptiv na vznik karcinomu prsu však nejsou jednoznačné. Mezi další rizikové faktory patří strava bohatá na tuky, obezita a kouření.

## 1.2 Histologické typy nádorů prsu

Karcinomy prsu vznikají z epitelu prsní žlázy, který zahrnuje lobuly produkující mléko a dukty vedoucí mléko k bradavce. Maligní transformace stromální komponenty se vyskytuje velice zřídka, což vysvětluje fakt, že velikost prsu není rizikovým faktorem pro vznik nádoru, protože všechny ženy mají přibližně stejné množství žláзовého epitelu, zatímco velikost prsu je dána množstvím stromatu a tukové tkáně [5].

Karcinomy se dělí na neinvazivní (*in situ*) a invazivní, neboli infiltruující. Neinvazivní karcinomy tvoří populace maligních buněk, které nemají schopnost prorůst bazální membránou a tvořit vzdálené metastázy. Podle histologické klasifikace se rozlišují karcinomy duktální a lobulární [5].

Duktální karcinom *in situ* (DCIS) tvoří 80% všech neinvazivních nádorů. Je často mamograficky zachytitelný v důsledku kalcifikací nekrotické tkáně. Předpokládá se, že je přímým předchůdcem invazivního duktálního karcinomu, protože až 70% DCIS přechází do invazivní formy onemocnění. Podle převažujícího způsobu růstu nádorových buněk v duktech může být DCIS dále rozdělen do několika subtypů, většina případů ale vykazuje směsici více strukturních forem.

U lobulárního karcinomu *in situ* (LCIS), který zahrnuje asi 20% nádorů, dochází k přechodu do invazivní formy nádorového onemocnění asi u 35% případů. LCIS však bývá ve vyšším procentu případů (30-70% oproti 10-30% u DCIS) multifokální a oboustranný. LCIS se klinicky neprojevuje, nevytváří hmatné útvary, které by mohly být identifikovány fyzikálním nebo mammografickým vyšetřením, a proto se většinou najde v excizích provedených pro existenci jiné léze.

Invazivní karcinom může být duktálního (IDC) i lobulárního (ILC) histologického typu. IDC představuje většinu (70-80%) karcinomů prsu. Tyto nádory vytvářejí ložiska většinou špatně ohraničená proti okolní tukové tkáni, do které prorůstají. ILC je méně častý (5-10%), avšak může být více agresivní než IDC. Léčebný přístup k oběma typům nádorů je přes jejich histologické odlišnosti téměř identický.

Zbytek invazivních karcinomů tvoří několik speciálních typů (medulární karcinom, tubulární karcinom, mucinózní karcinom, papilární karcinom), které ovšem celkově



nepředstavují více než přibližně 5% nádorů. Zastoupení histologických typů karcinomů prsu znázorňuje tabulka 2.

**Tabulka 2: Procentuální zastoupení jednotlivých histologických typů karcinomu prsu [5]**

<b>Histologický typ</b>	<b>Celkem karcinomů (%)</b>	<b>z toho (%)</b>
<i>In situ</i> karcinomy	15 – 30	
DCIS		80
LCIS		20
Invazivní karcinomy	70 – 85	
IDC		79
ILC		10
medulární karcinom		2
mucinózní karcinom		2
tubulární karcinom		2
papilární karcinom		1

Diagnóza karcinomu prsu je stanovena patologem. Morfologická verifikace je základní podmínkou léčby. Neméně důležité je stanovení rozsahu onemocnění podle standardní TNM klasifikace navržené mezinárodní unií proti rakovině (UICC) [6]. Kromě klinické předoperační klasifikace TNM je důležité posouzení pooperačního nálezu (pTNM) verifikovaného patologem. Klasifikace pTNM v podstatě odpovídá TNM, klasifikace regionálních mízních uzlin pN1 se dále dělí podle velikosti metastáz na více podskupin. Kompletní TNM klasifikace je seskupena do jednotlivých klinických stadií (staging).

Invazivní karcinom je dále posuzován podle tzv. gradingu, který je podobně jako staging považován za významný prognostický faktor. Stanovuje se podle tvorby tubulů (jako výraz diference žláz), nukleárního pleomorphismu a mitotické aktivity [7]. Určuje se u všech typů invazivních karcinomů kromě medulárního.

Karcinomy prsu jsou dále charakterizovány na základě estrogenových a progesteronových receptorů, proteinu c-ErbB-2 a Ki-67 .

### *1.2.1 Receptory steroidních hormonů (estrogenové receptory – ER, progesteronové receptory – PR)*

Estrogeny jsou významné mitogeny, jejichž aktivita je zprostředkována navázáním na specifický receptor (ER). Brzy po svém objevení se ER stal široce užívaným prediktivním markerem odpovědi na hormonální terapii a klinickou agresivitu nádorů. Přítomnost ER je nutná pro růst stimulovaný estrogenem. Obvykle je detekován v 50-80% nádorů prsu a hladina jeho exprese je výrazně závislá na věku pacienta [8].

ER je jaderný transkripční faktor, který reguluje expresi různých genů. Mezi ně patří například progesteronový receptor, protiapoptotický bcl-2 a další geny stimulující buněčnou proliferaci. ER obsahuje několik domén. DNA vázající doména rozpoznává specifické oblasti promotorů cílových genů zvané estrogenové responzivní elementy (EREs). Dále jsou přítomny různé transaktivační domény a domény zprostředkující interakce protein-protein.

Četné studie korelovaly ER status s histologickým nálezem nebo stupněm proliferace a ER status byl také využíván jako prognostický faktor. Výsledky dalších studií však nebyly jednoznačné. Vyšetření ER je důležité pro posouzení indikace hormonální terapie [9]. Přibližně 60% ER pozitivních pacientů reaguje na hormonální terapii oproti 5-10% pacientů s ER negativními nádory. Hlavní klinický význam stanovení ER u nádoru prsu tedy spočívá v predikci hormonální terapie.

Expresí progesteronového receptoru (PR) je závislá na estrogenech a v tkáních ovlivňovaných estrogény je zvýšena. Určení exprese PR by mohlo být lepším indikátorem nádorové senzitivity k hormonální terapii než určení exprese ER, protože vyžaduje nejen přítomnost ER, ale i jeho funkčnost [10].

ER i PR negativních nádorů je 20-30%, zatímco ER i PR pozitivních je přibližně 40%. Expresí PR je závislá více na menopauzálním statutu než ER. Premenopauzální pacientky mají více PR pravděpodobně díky vyšší koncentraci estrogenů.

Stanovení estrogenních (ER) a progesteronových receptorů (PR) je rutinní součástí vyšetřování všech karcinomů prsu a jejich status představuje prediktivní faktor pro odpověď na hormonální terapii. Vyšetření receptorů pro steroidní hormony tedy pomáhá individualizovat přístup k léčbě jednotlivých pacientů [8].

### 1.2.2 *c-ErbB-2 (HER2/neu)*

Lidský receptor epidermálního růstového faktoru 2 (ErbB-2, také známý jako *HER2/neu*, ekvivalent hlodavčího genu *neu*) je protoonkogen lokalizovaný na chromozómu 17q12 a kódující transmembránový glykoprotein o 185-kD s intrinzičnou tyrozinkinázovou aktivitou, která aktivuje signální transdukci i bez přítomnosti ligandu. Jeho ligand zatím nebyl identifikován, Předpokládá se, že ErbB-2 amplifikuje signály poskytované dalšími receptory této rodiny heterodimerizací. Výsledkem ligand dependentní aktivace ErbB-1, ErbB-3 a ErbB-4 epidermálním růstovým faktorem (EGF) nebo heregulinem je tvorba heterodimerů a následná aktivace ErbB-2. Typickým způsobem aktivace protoonkogenů této rodiny je genová amplifikace.

Amplifikace a overexprese genu c-ErbB-2 se vyskytují asi u 20-25% karcinomů prsu a představují negativní prognostický a prediktivní faktor. Byly vyvinuty monoklonální protilátky, které jsou využívány v klinické praxi jako nový protinádorový lék cílený na overexprimovaný c-ErbB-2 (Trastuzumab [Herceptin]). Váže se s vysokou afinitou k extracelulární doméně proteinu ErbB-2 a inhibuje přenos signálu stimulujícího růst [11]. Stanovení c-ErbB-2 je rovněž součástí vyšetření pacientů s karcinomem prsu.

### 1.2.3 Ki-67

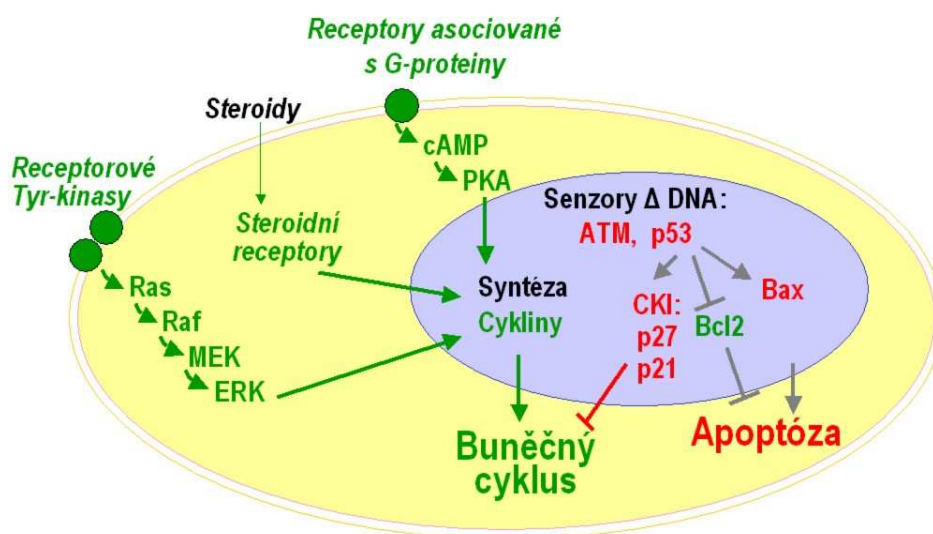
Jaderný antigen spojený s proliferací Ki-67 (MKI67, také známý jako KIA – antigen detekovaný protilátkou Ki-67) je lokalizován na chromozómu 10q25. Gen se exprimuje ve dvou izoformách, které kódují jaderný protein tvořený 2,896 a 3,256 aminokyselinovými zbytky. Ki-67 je exprimován v průběhu buněčného cyklu, avšak ne v G0 fázi.

Exprese Ki-67 je u karcinomu prsu spojena s nepříznivou prognózou [12]. Pozitivita Ki-67 je indikátorem nepříznivého biologického chování nádoru a je důvodem k radikálnější léčbě.

## 1.3 Molekulární genetika nádorů prsu

Karcinom prsu se vyskytuje ve dvou patogeneticky odlišných formách: poměrně vzácné hereditární a častější sporadické. Sporadický karcinom je polygenním onemocněním, kde velkou úlohu sehrávají i epigenetické vlivy a faktory prostředí. Soubor genů podílejících se na vzniku karcinomu prsu není zcela znám. Mezi geny s prokázanou úlohou při vývoji karcinomu prsu patří geny zasahující do regulace buněčného cyklu a do oprav poškozené DNA. Patří do skupiny jak onkogenů (např. *c-myc*, *c-erbB-2*), tak tumorsupresorových genů (např. *p53*).

Na rozdíl od onkogenů, k jejichž aktivaci stačí postižení jedné alely genu v buňce (*gain of function*), ke ztrátě funkce tumorsupresorových genů je nutná inaktivace obou alel (*loss of function*). Podle Knudsonovy teorie dvojího zásahu lze vysvětlit rozdíl v tumorogenezi u dědičných a sporadických forem nádorů prsu. Pokud je inaktivující mutace přenesena zárodečnou buňkou, je obsažena ve všech tkáních organismu a vytváří predispozici k nádorovému bujení. Inaktivace druhé alely vzniká spontánně v cílové buňce a iniciuje tumorogenezi. U nedědičných nádorů musí v buňce dojít k inaktivaci obou alel tumorsupresorového genu náhodně, což vysvětluje pozdější nástup onemocnění. Funkci onkogenů a tumorsupresorových genů ukazuje obrázek 4.



**Obrázek 4:** Schematické znázornění úlohy klíčových onkogenů (zeleně) a tumorsupresorových genů (červeně) v regulaci buněčného cyklu a apoptózy.

Dědičné formy karcinomu prsu tvoří 5-10 % případů onemocnění a zárodečné mutace tumorsupresorových genů *BRCA1/2* jsou zodpovědné za 60-80% z nich. Kromě těchto hlavních predispozičních genů podmiňujících autozomálně dominantní dědičnost onemocnění a jeho vysokou penetrancí, se uplatňují v menší míře i další geny s nižší penetrancí. Mezi tyto geny lze zařadit tumorsupresorový gen *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*).

#### 1.4 Gen *ATM*

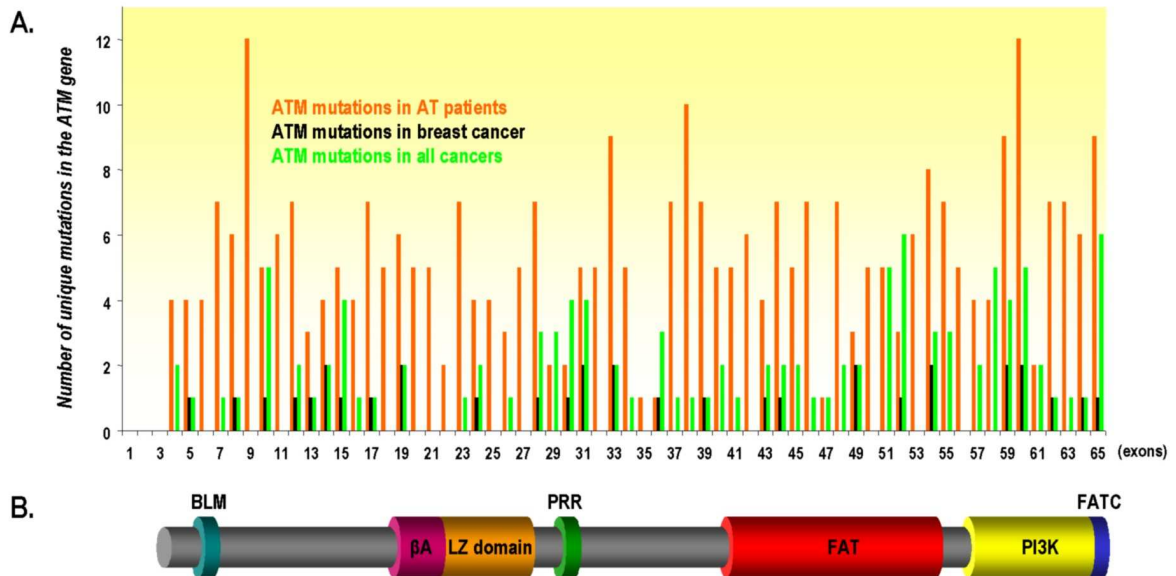
Mutace genu *ATM* (MIM 607585) jsou v homozygotním stavu příčinou autozomálně recesivního onemocnění ataxia telangiectasia (AT). Tento nádorový syndrom je charakterizován progredující mozečkovou ataxií, okulokutánními telangiectasiemi, imunitní nedostatečností, zvýšenou vnímavostí k ionizujícímu záření a predispozicí ke vzniku nádorů. Četnost výskytu tohoto vzácného onemocnění se uvádí 1/40 000 až 1/300 000 narozených dětí v různých etnických skupinách [13]. Ačkoliv AT byla popsána už v roce 1957, gen *ATM* byl identifikován až v roce 1995 [14]. Do dnešní doby bylo popsáno více než 400 mutací vedoucích k AT, z toho více než 70% z nich způsobuje předčasnou terminaci translace a vznik zkráceného proteinu (*truncating mutace*) [15,16] (databáze mutací genu *ATM*: <http://www.vmresearch.org/atm.htm>). Missense mutace mají obvykle mírnější fenotypový

projev a často také nižší penetranci [17]. Z obrázku 5A znázorňujícího rozložení mutací nalezených v genu *ATM* vyplývá, že mutace zasahují do celé kódující genové oblasti. Pacienti s AT jsou obvykle složení heterozygoti; homozygoti nesoucí stejnou mutaci na obou alelách jsou vzácní.

### 1.5 Gen *ATM* a jeho proteinový produkt

Gen *ATM* je lokalizován na chromozomu 11, v oblasti 11q22-23 [18]. Se svou velikostí 150kb, kterou zaujímá v genomové DNA, a 66 exony patří mezi rozsáhlé geny. Je přepisován v širokém spektru tkání do mRNA o velikosti 13kb, z čehož kódující sekvence představuje 9168 bp. Iniciační kodón leží ve 4. exonu; translace končí na terminačním kodónu v posledním exonu, jehož převážná část se nepřekládá [19].

Gen *ATM* kóduje protein o velikosti 350 kD, který je tvořen 3056 aminokyselinovými zbytky. Tato serin-threonin proteinkináza patří do rodiny proteinů příbuzných s fosfatidylinositol-3-kinázami (PI3K). Kinázová doména se nachází na C-konci proteinu a představuje ~10% jeho aminokyselin. Byly identifikovány i další funkční domény. Mezi ně patří konzervativní doména s motivem leucinového zipu s homologií k proteinu Rad3 kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* a oblast bohatá na prolin, která interaguje s receptorovou tyrozin proteinkinázou cAbl [20,21]. Doména vázající helikázu BLM (Bloomův syndrom) je tvořena aminokyselinami 82-89 a kromě vazby BLM se také podílí na vazbě proteinů p53 a BRCA1 [22]. Doména interagující s  $\beta$ -adaptinem má význam pro funkci ATM ve vezikulárním transportu [23]. Přesná funkce FAT domény (doména přítomná u proteinů citlivých k rapamycinu, tj. fungicidu a imunosupresivu) není zatím známa [24]. Další doména FATC (C-koncová doména přítomná pouze u proteinů obsahujících doménu FAT) zprostředkovává interakci s histon acetyltransferázou Tip60, která reguluje aktivaci kinázové aktivity ATM po poškození DNA [25]. Obrázek 5B ukazuje protein ATM se všemi funkčními doménami a motivy, které byly dosud popsány.



**Obrázek 5:** **A.** Rozložení mutací nalezených v genu *ATM* v jednotlivých exonech u pacientů s *AT*, karcinomem prsu a s nádory obecně. **B.** Protein *ATM* s funkčními doménami (poloha jednotlivých domén koresponduje s exony uvedenými na ose *x* obrázku 2A). *BLM* – doména vázající *BLM*,  $\beta$ *A* – doména vázající  $\beta$ -adaptin, *LZ domain* (leucine zipper) – doména s motivem leucinového zipu, *PRR* (prolin rich region) – oblast bohatá na prolin, *FAT* – doména přítomná u proteinů citlivých k rapamycinu, *PI3K* – kinázová doména, *FATC* – C-koncová doména přítomná pouze u proteinů obsahujících doménu *FAT*. Více viz text.

Protein *ATM* je lokalizován zejména v jádře, kde zajišťuje včasné rozpoznání dvouřetězcových zlomů DNA a zprostředkovává jejich opravu, popřípadě aktivuje apoptózu. Dvouřetězcové zlomy patří mezi nejzávažnější léze DNA. Jejich oprava probíhá dvěma možnými mechanismy – homologní rekombinací (*HR*) a nehomologním spojováním konců (tj. *NHEJ*, nonhomologous end-joining). *HR* umožňuje úplnou opravu DNA (error-free) a je tedy pro buňku výhodnější. Jako templát slouží sesterská chromatida. *HR* může tedy proběhnout pouze v pozdní *S* nebo *G2* fázi buněčného cyklu, kdy je DNA zreplikována. Naopak *NHEJ* může proběhnout v jakékoliv fázi buněčného cyklu, avšak tato oprava není obvykle bezchybná (error-prone). Předpokládá se, že většina dvouřetězcových zlomů je opravena prostřednictvím *NHEJ*.

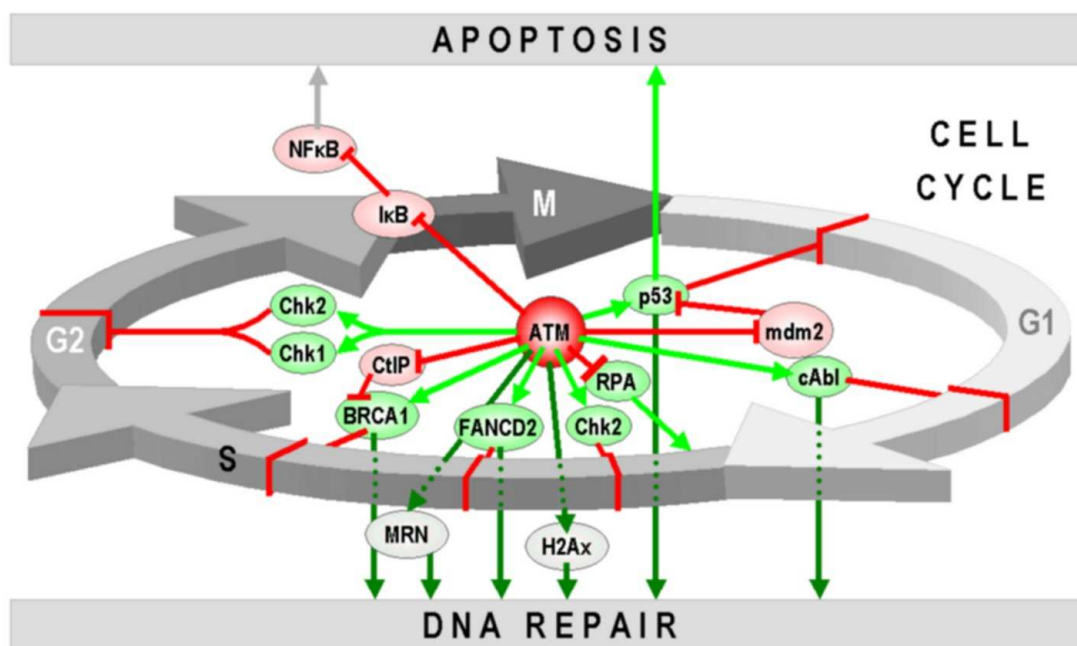
Kromě jádra se *ATM* v menší míře nachází také v cytoplazmě. Zdá se, že je zde asociován s vezikulárními strukturami a má určitou úlohu v buněčné odpovědi na oxidační stres [26]. Dále se uvažuje o významu *ATM* v transportu proteinů, protože bylo dokázáno, že

interaguje s  $\beta$ -adaptinem, který je součástí komplexů AP-2 podílejících se na endocytóze zprostředkované klathrinem [23].

## 1.6 Funkce proteinu ATM

Protein ATM stojí na vrcholu kaskády signálních drah, které jsou aktivovány při odpovědi na dvouřetězcové zlomy DNA vznikající například působením ionizujícího záření. V jádře buněk se ATM nachází jako neaktivní komplex, buď jako dimer nebo vyšší multimer. Po vystavení buněk ionizujícímu záření se množství proteinu nemění, ale stoupá jeho aktivita [27]. Při poškození DNA dochází k autofosforylaci ATM na serinu 1981, což způsobí disociaci neaktivního komplexu a aktivaci celé řady signálních drah prostřednictvím fosforylace mnoha substrátů [28]. Tyto děje nakonec vedou k aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu a k iniciaci reparačních pochodů. Pokud ovšem není oprava poškozené DNA úspěšná, dochází k apoptóze.

Mezi substráty ATM patří p53, Mdm2 (mouse double minute 2) a c-Abl, které se podílí na aktivaci kontrolního bodu G1 fáze buněčného cyklu, dále Nbs1, Rad51, BRCA1 a FANCD2 (Fanconi anemia complementation group D2) podílející se na zastavení buněčného cyklu v S fázi po expozici ionizujícímu záření a BRCA1 a Chk1/2 (checkpoint kinases 1 a 2) regulující progresi v G2 fázi buněčného cyklu [28]. Zároveň může být aktivita ATM regulována některými z jeho substrátů. Obrázek 6 ukazuje substráty ATM a význam jejich fosforylace.



**Obrázek 6:** ATM má klíčovou úlohu v odpovědi na dvouřetězcové zlomy. Prostřednictvím fosforylace mnoha substrátů může aktivovat kontrolní body buněčného cyklu. Aktivace ATM vede k opravě poškozené DNA, případně k apoptóze.

Během několika vteřin po vzniku dvouřetězcového zlomu fosforyluje ATM kináza histon H2AX, a to specificky v místě poškození DNA. Fosforylovaný H2AX má zásadní význam pro nasedání reparačních proteinů nebo faktorů signalizujících poškození DNA do místa defektu DNA. Mezi tyto proteiny patří například DNA reparační enzym Rad51, komplex obsahující Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN komplex) a BRCA1 [29]. Rychlost fosforylace H2AX ukazuje, že ATM působí jako senzor dvouřetězcových zlomů.

Mezi substráty ATM s klíčovou úlohu v regulaci průchodu kontrolním bodem v G1 fázi buněčného cyklu patří proteiny p53, Mdm2 a c-Abl.

Fosforylace tumorsupresoru p53 na serinu 15 vede k jeho aktivaci a stabilizaci [30]. Stabilizovaný protein p53 pak působí ve formě tetrametru jako aktivátor transkripce některých genů, například genu  $p21^{(waf1/cip1)}$ . Protein p21 inaktivuje komplexy cyklinů a cyklin-dependentních kináz (CDK) a tak zabraňuje přechodu buňek z G1 do S fáze buněčného cyklu.

ATM dále fosforyluje onkoprotein Mdm2. Mdm2 negativně reguluje protein p53, který zároveň působí jako jeho pozitivní reglátor, čímž vzniká zpětnovazební regulační



smyčka. Mdm2 se váže na N-konec proteinu p53 a tím potlačuje jeho schopnost aktivovat transkripci a stimuluje jeho degradaci zprostředkovanou proteazomem. Fosforylace Mdm2 kinázou ATM blokuje vazbu mezi Mdm2 a p53, což vede ke stabilizaci a snížené degradaci p53 [31].

ATM může indukovat zástavu buněčného cyklu v G1 fázi fosforylací tyrozin kinázy c-Abl a následně tak aktivací protein kinázové signální dráhy indukované stresem. Navíc aktivace c-Abl může vést k fosforylaci a tím i k aktivaci reparačního enzymu Rad51 [32].

Substráty ATM zasahující do S fáze buněčného cyklu jsou RPA (replication protein A), Nbs1, BRCA1 a FANCD2.

Protein RPA (aktivní jako trimer) je nezbytný pro replikaci DNA. ATM fosforyluje jeho podjednotku o velikosti 34-kD, čímž ho inaktivuje a tak blokuje S fázi buněčného cyklu. RPA také rozpoznává jednořetězcové úseky DNA (ssDNA), které vznikají jako meziprodukt při pozastavení replikační vidlice nebo v průběhu opravy dvouřetězcových zlomů [33]. Tvorba komplexu RPA/ssDNA pak umožňuje asociaci dalších proteinů, což v konečném důsledku vede k fosforylaci a tím k aktivaci efektorové kinázy Chk1 [34].

ATM může přímo interagovat s komplexem MRN, jenž se podílí na obou možných způsobech oprav dvouřetězcových zlomů - jak HR, tak i NHEJ. Fosforyluje protein Nbs1 na serinu 343 a tím umožňuje aktivaci kontrolního bodu v S fázi buněčného cyklu [35]. Tento protein však není pouze substrátem ATM, ale zároveň ovlivňuje aktivaci ATM po poškození DNA. Fosforylovaný Nbs1 působí jako aktivátor ATM při fosforylaci některých substrátů jako Chk2 nebo FANCD2, avšak p53 může být fosforylován i bez přítomnosti fosforylovaného Nbs1 [35,36]. Další složky komplexu MRN, proteiny Rad50 a Mre11, se přímo uplatňují v reparaci DNA [37,38]. O důležitosti komplexu MRN vypovídá i to, že mutace v genech Mre11 a Nbs1 jsou zodpovědné za dědičná onemocnění AT-like a Nijmegen breakage syndromy, která se projevují podobnými symptomy jako AT [39].

BRCA1 je fosforylován na serinu 1423 a 1524 a takto aktivovaný pak spolu s BRCA2 indukuje opravu dvouřetězcových zlomů mechanismem HR, částečně prostřednictvím aktivace reparačního faktoru Rad51 [40]. Rad51 se váže na jednořetězcovou DNA, rozpoznává homologickou dvouřetězcovou molekulu a společně s dalšími proteiny katalyzuje tvorbu Hollidayova spoje a výměnu řetězců mezi poškozenou a intaktní sesterskou chromatidou. BRCA1 dále reguluje expresi genů p21<sup>(waf1/cip1)</sup> a GADD45 (growth arrest and DNA-damage-inducible protein), které zasahují do buněčného cyklu. Navíc BRCA1 patří

mezi substráty ATM ovlivňující jeho aktivitu. Je nutný pro fosforylaci proteinů p53, Nbs1, CtIP a Chk2 kinázou ATM. Naopak není nezbytný pro fosforylaci substrátů asociovaných s DNA jako je histon H2AX [34]. Kromě BRCA1 fosforyluje ATM i s ním asociovaný protein CtIP. Tato fosforylace, ke které dochází na serinu 664 a 745, vede k disociaci komplexu [41]. Záměna serinů 664 a 745 za alanin zabraňuje uvolnění vazby mezi CtIP a BRCA1, což vede po vystavení ionizujícímu záření k trvalé inhibici exprese genu GADD45, která je za normálních okolností indukovaná právě BRCA1. ATM tedy reguluje expresi GADD45 prostřednictvím fosforylace CtIP [41].

Dalším substrátem ATM, který zasahuje do regulace S fáze buněčného cyklu, je FANCD2. Po vystavení účinkům ionizujícímu záření je tento protein fosforylovaný na serinu 222 nutný pro zástavu buněčného cyklu v S fázi. Na jeho význam při opravě dvouřetězcových zlomů ukazuje i to, že je lokalizován v místech poškození DNA vyvolaných ionizujícím zářením a v synaptonemálních komplexech meiotických chromozomů [42].

ATM může také zabránit buňkám ve vstupu do mitózy, a to fosforylací minimálně dvou substrátů - Chk1 a Chk2. Tyto kinázy se podílí na regulaci některých základních funkcí buňky, mimo jiné replikaci DNA a apoptózy [43]. Obě kinázy se uplatňují v kontrolním bodě G2 fáze buněčného cyklu, částečně prostřednictvím fosforylace fosfatázy Cdc25 na serinu 123 [44]. Fosforylovaná Cdc25 pak zabraňuje aktivaci MPF (mitosis promoting factor), což je klíčový děj umožňující eukaryotické buňce vstoupit do M fáze buněčného cyklu [45]. Dále Chk1/2 rozpoznávají a fosforylují proteiny p53 a BRCA1, což vede k zástavě buněčného cyklu a opravě DNA, případně k apoptóze [46]. Navíc bylo potvrzeno, že Chk2 má úlohu i v kontrolním bodě S fáze buněčného cyklu [47]. Nedostatek aktivity Chk2 se projeví radiorezistentní syntézou DNA, kterou lze pozorovat u pacientů s AT [44].

Pacienti s AT vykazují nadměrnou apoptózu [48,49]. Nicméně přesná úloha ATM v apoptóze není zatím známá. ATM může aktivovat NFκB fosforylací jeho inhibitoru IκB. Fosforylovaný IκB se uvolní z NFκB, který se pak může translokovat do jádra, kde působí jako regulátor transkripce antiapoptotických genů [50].

Dvouřetězcové zlomy vznikají i fyziologicky v průběhu meiózy a tvorby protilátek a také k jejich opravě je vyžadován protein ATM. Naopak telomery nejsou považovány za dvouřetězcové zlomy. Faktor TRF2 (telomere recognition factor) chrání telomery tím, že interaguje s ATM a zabraňuje jeho autofosforylaci. Při poškození telomer je ATM aktivován a to vede ke stárnutí buněk a k apoptóze [51].

## 1.7 ATM a nádory

Onemocnění ataxia telangiectasia lze zařadit mezi dědičné nádorové syndromy, protože se asi u 40% pacientů s touto chorobou v průběhu jejich zkráceného života vyvine nějaká malignita [52]. Nejčastěji se jedná o lymfomy a leukemie (~85%) a příčinou je pravděpodobně to, že u pacientů s AT nedochází k opravě zlomů DNA, které normálně vznikají při tvorbě protilátek [53].

U heterozygotů nesoucích mutaci na jedné z alel *ATM*, kteří představují 0.35 – 1% běžné populace, se předpokládá možnost zkrácení délky života kvůli vyššímu výskytu onemocnění spojených s pokročilým věkem. Příkladem může být ischemická choroba srdeční [17,54]. Navíc se předpokládalo, že nosiči mutace mohou mít vzhledem k centrální úloze *ATM* při opravě dvouřetězcových zlomů DNA vyšší riziko vzniku malignit. Avšak v rodinách postižených AT (u obligatorních heterozygotů) nebyla popsána vyšší incidence nádorů plic, žaludku, střeva, slinivky ani ovaria [55]. Nicméně současné studie ukázaly, že i u heterozygotů dochází k reaktivaci genů RAG (recombination activating genes) a následně k dalším V(D)J přestavbám, což je u AT homozygotů považováno za rizikový faktor pro vznik leukemie [56]. Rovněž byla zjištěna korelace mezi zvýšeným výskytem karcinomu prsu a přítomností mutace v *ATM* v heterozygotním stavu [57].

## 1.8 ATM a dědičný karcinom prsu

Zvýšený zájem o gen *ATM*, ve smyslu jeho úlohy při vývoji karcinomu prsu, byl zaznamenán po získání výsledků epidemiologické studie v roce 1991, kdy byl prokázán zvýšený výskyt karcinomu prsu u obligatorních heterozygotek z amerických rodin s AT. Pro tyto ženy bylo stanoveno 5x vyšší riziko vzniku karcinomu prsu oproti kontrolní populaci [58]. Následovaly práce, které studovaly četnost mutací genu *ATM* u pacientek s nádorem prsu. Jejich výsledky však byly do značné míry kontroverzní. Broeks *et al.* [59] našel zárodečné mutace vedoucí k předčasnému zkrácení proteinu u 7/82 (8.5%) holandských pacientek s časným výskytem karcinomu prsu. Riziko vývoje onemocnění u nich bylo 9x vyšší než u běžné populace. U britských žen nesoucích mutaci v *ATM* bylo stanoveno jen 2x větší riziko vzniku nádoru prsu [55,60]. Thorstenson *et al.* [61] našla 7 mutací vedoucích

k AT u 230 (2.6%) rakouských rodin s výskytem karcinomu prsu a ovaria. Renwick *et al.* [62] pak ve své nedávné studii uvádí, že heterozygoti nesoucí mutaci způsobující AT mají 2x větší riziko vývoje nádoru prsu. Mnoho dalších studií ale zvýšený výskyt mutací zodpovědných za AT u pacientek s karcinomem prsu nepotvrdilo, což zpochybnilo úlohu genu *ATM* u dědičného karcinomu prsu [63,64]. Ani práce zaměřené na studium úlohy genu *ATM* u pacientek s karcinomem prsu vzniklým v časném věku nebo u pacientek se zvýšenou radiosenzitivitou nenašly zvýšenou frekvenci mutací genu *ATM* [65,66].

Některé práce uvádí u pacientek s karcinomem prsu zvýšený výskyt missense mutací v *ATM* [64,67]. Význam těchto mutací však většinou není jasný a zatím jen u missense varianty c.7271T>G bylo opakovaně prokázáno, že zvyšuje riziko vzniku nádoru prsu. Tato mutace v kodónu 2424 vede na proteinové úrovni k nahrazení valinu glycinem a k syntéze proteinu *ATM* s částečně zachovanou funkcí. Mutace je v homozygotním stavu spojená s mírnějším fenotypovým projevem a nižší citlivostí k ionizujícímu záření a dále pak s vyšším rizikem vzniku karcinomu prsu jak u homozygotů, tak u heterozygotů [15]. Další velmi diskutovanou missense mutací v souvislosti s karcinomem prsu je c.1066-6T>G. Jedná se o sestřihovou mutaci, která vede k sestřihu exonu 11, posunu čtecího rámce a zkrácení proteinu. Například v holandských rodinách [68] byla tato alela spojena s vyšším rizikem vzniku karcinomu prsu, častěji bilaterálním a vznikajícím v nižším věku. Penetrance onemocnění byla stanovena na 17.2% do věku 70 let [69]. Naopak jiná studie ukázala, že tato alela nepředstavuje zvýšené riziko karcinomu prsu [70].

Otázka významu missense mutací v tumorogenezi je dosud předmětem diskuze. Byla vytvořena hypotéza, podle níž missense mutace a truncating mutace zvyšují rozdílně riziko vývoje nádorového onemocnění, protože mají odlišný efekt na funkci proteinu *ATM*. Truncating mutace všeobecně vedou k defektům v genové expresi a k produkci nefunkčního proteinu, zatímco produktem missense varianty je normální množství proteinu s pozměněnou funkcí. Podle této hypotézy tedy nonsense mutace a mutace vedoucí k posunu čtecího rámce působí recesivně a naopak missense alterace dominantně [17]. Pro přesné určení významu jednotlivých mutací při vývoji karcinomu prsu bude nutná funkční analýza proteinu *ATM*, která bude ovšem náročná vzhledem k velikosti genu.

U buněk nesoucích na jedné alele mutaci způsobující AT byla prokázána vyšší senzitivita k ionizujícímu záření [71]. U myši s takovýmto defektem jedné alely pak dochází po ozáření častěji k vývoji dysplastických mamárních buněk. Zdá se tedy, že *ATM* heterozygoti mají vyšší riziko vzniku nádoru prsu, které je úměrné expozici ionizujícímu

záření [72]. Tyto studie mohou mít praktický význam, neboť léčba karcinomu prsu často zahrnuje radioterapii, která by mohla mít u nosičů mutací negativní efekt. Ženy nesoucí mutaci v *ATM* by rovněž neměly podstupovat preventivní mammografický screening, který představuje zátěž ionizujícím zářením. Dosud nebyla nalezena korelace mezi hyperradiosenzitivitou u pacientek léčených radioterapií a výskytem mutací v *ATM* [59]. V těchto studiích byl však analyzován malý počet pacientek. Obecně je přijímán názor, že by u nosiček mutací genu *ATM* měla být minimalizována expozice ionizujícímu záření a dávána přednost alternativním vyšetřovacím metodám (například sonografie nebo magnetická rezonance).

### 1.9 *ATM* a sporadický karcinom prsu

Nádor prsu je malignita spojená s mnoha genetickými změnami. Klasická Knudsonova teorie říká, že pro vývoj nádoru je nutná inaktivace obou alel tumorsupresorového genu. K inaktivaci genu může docházet v průběhu tumorogeneze v důsledku mutací (bodové mutace, krátké delece, inserce či přestavby chromozomů) nebo v důsledku epigenetických změn.

Tumorsupresorové geny jsou často lokalizovány v oblastech, kde dochází k chromozomální delecím, což vede ke ztrátě heterozygoty (LOH, loss of heterozygosity). Obecně dosahuje pravděpodobnost detekce ztráty určitého lokusu na jakémkoliv místě v genomu až 5% [73]. Avšak delece jedné alely genu *ATM* je mnohem častější jev u nádorů prsu, což naznačuje, že by *ATM* mohl mít úlohu při tumorogenezi. Práce věnované tomuto tématu našly LOH u téměř 40% nádorů prsu a to vedlo k závěru, že ke ztrátě alely dochází časně při tumorogenezi [73,74]. Ztráty alel genu *ATM* byly detekovány i u dalších malignit, například u leukemií a nádorů ovaria [75]. Nicméně není známo, jakým způsobem dochází k inaktivaci druhé alely. Některé výsledky naznačují, že ztráta jedné alely *ATM* způsobuje haploinsuficienci a to spouští tumorogenezi v důsledku zvýšené chromozomální nestability. Častý výskyt LOH však spíše svědčí pro klasický model inaktivace tohoto tumorsupresorového genu [76].

V současných studiích nebyly popsány u karcinomů prsu žádné somatické mutace genu *ATM* [77]. To naznačuje, že inaktivace genu *ATM* somatickou mutací není u nádorů prsu běžná. Podobné výsledky byly získány i u genů *BRCA1/2*, kde bylo rovněž zjištěno, že k somatickým mutacím dochází pouze vzácně [78,79]. Zatímco u sporadického karcinomu

prsu nebyly somatické mutace v *ATM* dosud nalezeny, u jiných malignit se vyskytují, zejména pak u leukemií a lymfomů [80].

Dalším možným mechanismem vedoucím ke ztrátě funkce tumorsupresorového genu je metylace cytosinových zbytků v CpG ostrůvcích. Tyto obvykle nemetylované dinukleotidy jsou seskupeny v proximálních částech promotorů téměř poloviny genů lidského genomu [81]. Hypermetylace promotoru většinou vede k umlčení transkripce přilehlých genů a u lidských nádorů je nejméně tak častá jako inaktivace tumorsupresorových genů somatickou mutací [81]. Byla prokázána u celé řady klíčových tumorsupresorových genů včetně *BRCA1* a *E-cadherinu*. Předpokládá se, že u sporadických nádorů podléhá metylaci přibližně 50% tumorsupresorových genů, které jsou spojeny se vzácnými dědičnými nádorovými syndromy [81]. Mnoho studií prokázalo hypermetylací jako druhou inaktivující změnu v nádorech u pacientů s dědičnou mutací v tumorsupresorovém genu. Zajímavé je, že metylace je zřejmě vždy asociována s nemutovanou alelou [81].

*ATM* je přepisován z obousměrného promotoru o velikosti 520bp. V opačném směru je přepisován gen *NPAT*. *NPAT* je substrátem komplexu cyklin E a Cdk2 kinázy a předpokládá se, že má v savcích buňkách důležitou úlohu při koordinaci aktivace transkripce histonových genů při přechodu z G1 do S fáze a při vstupu do S fáze buněčného cyklu [82]. Nicméně bylo prokázáno, že metylace promotorové oblasti *ATM* nemá vliv na expresi genu *NPAT* [83]. Hypermetylace v promotoru *ATM* byla nalezena u 18 z 23 (78%) pokročilých nádorů prsu (stage II nebo vyšší), což svědčí pro vazbu mezi sníženou funkcí *ATM* a sporadickým nádorem prsu [84]. Naopak další dvě studie metylaci v promotoru *ATM* neprokázaly (74 a 30 sporadických karcinomů prsu) [85, 86]. Četnost prací, které se touto tématikou dosud zabývaly je ovšem velmi nízká.

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané práce byla analýza genu *ATM* u karcinomu prsu. Studie byla především zaměřena na následující dílčí oblasti:

### 1. Úloha genu *ATM* u dědičného karcinomu prsu

- Mutační analýza genu *ATM* u rizikových pacientek s karcinomem prsu
- Analýza nádorů od pacientek nesoucích mutaci na jedné alele genu *ATM*

### 2. Úloha genu *ATM* u sporadického karcinomu prsu

- Analýza ztráty heterozygosity u sporadických karcinomů prsu
- Mutační analýza u sporadických karcinomů prsu
- Detekce hypermetylace promotoru *ATM* u sporadických karcinomů prsu

Součástí práce bylo také vypracování a optimalizace jednotlivých metodických přístupů.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Výběr patientek pro mutační analýzu genu *ATM*

Vyšetření bylo provedeno u 161 vysoce rizikových patientek s karcinomem prsu, u kterých nebyla nalezena inaktivující mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1/2*. Výběr patientek byl proveden podle následujících kritérií:

- Patientka s karcinomem prsu diagnostikovaným ve věku do 40 let
- Patientka s bilaterálním karcinomem prsu do 50 let
- Patientka s karcinomem prsu do 50 let z rodiny, kde byl tento karcinom diagnostikován u další příbuzné prvního stupně rovněž do věku 50 let
- Patientka s karcinomem prsu diagnostikovaným do 50 let z rodiny, kde byl zachycen karcinom ovaria u příbuzné prvního stupně v libovolném věku
- Patientka s karcinomem prsu z rodiny s dalšími dvěma a více případy karcinomu prsu nebo vaječníků u přímých příbuzných v libovolném věku

Dále byla mutační analýza provedena u 183 náhodně vybraných dárek krve, kteří tvořili kontrolní soubor. V jednom případě mohla být provedena analýza u dospělé příbuzné pozitivně testované pacientky. Všechny testované osoby daly písemný informovaný souhlas s genetickým vyšetřením, který byl schválen Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice.

Od 3 patientek nesoucích mutaci v genu *ATM* byly získány vzorky nádorů zalité v parafinu. Tyto nádory byly před vlastní analýzou histologicky a imunochemicky charakterizovány. Stejně jako u sporadických karcinomů byl určen histologický typ, procento nádorových buněk, grade, estrogenové a progesteronové receptory, c-ErbB-2 a proliferační aktivita pomoci Ki-67 (kapitola 3.2). U těchto 3 nádorů bylo navíc imunochemicky stanoveno množství proteinu p53.

Protein p53 je akumulován asi u 1/3 karcinomů prsu. Jeho akumulace je způsobena mutacemi v genu *TP53* a je spojena s horší prognózou. Toto tvrzení však dosud nebylo potvrzeno klinickými studiemi.



### 3.2 Výběr pacientek pro analýzu sporadických karcinomů prsu

Sporadické nádory použité pro analýzu tumor supresorového genu *ATM* byly získány od neselektovaných pacientek operovaných na Gynekologicko-porodnické klinice a I. Chirurgické klinice 1.LF UK a VFN. Z peroperační biopsie, po histologickém potvrzení nálezu, byla odebrána část nádoru, která byla buď ihned zmrazena v tekutém dusíku a skladována při  $-80^{\circ}\text{C}$ , nebo byla uschována ve stabilizačním roztoku RNAlater (Qiagen). U některých pacientek byla odebrána zároveň okolní nenádorová tkáň.

Na Ústavu patologie 1.LF UK a VFN byly z každého odebraného vzorku nádoru standardním postupem připraveny histologické řezy a po obarvení hematoxylinem-eozinem odečetl patolog podíl nádorových buněk ve vyšetřované tkáni. Vzorky obsahující méně než 50% nádorových buněk byly vyřazeny ze souboru. Dále byl u nádorů hodnocen grading a množství estrogenových a progesteronových receptorů, c-ErbB-2 a Ki-67.

Grade patří mezi prognostické faktory a hodnotí se podle několika kritérií u duktálního karcinomu *in situ* (DCIS) a invazivního duktálního karcinomu (IDC) ([www.mamma.cz](http://www.mamma.cz)). U lobulárního karcinomu se grade neurčuje. Grade u DCIS závisí na charakteru jader a přítomnosti nebo nepřítomnosti nekróz, zatímco grade IDC je určován podle Nottinghamské modifikace Bloom-Richardsonova systému [87] (Tabulka 3).

**Tabulka 3:** Hodnocení gradingu podle Nottinghamské modifikace Bloom-Richardsonova systému

Kritérium	Výsledky histologického vyšetření	Skore (počet bodů)
Tvorba tubulů	Tvoří většinu nádoru (>75%)	1
	Střední množství (10-75%)	2
	Málo nebo žádné (<10%)	3
Jaderná polymorfie	Malá a pravidelná jádra	1
	Středně velká a mírně polymorfní jádra	2
	Výrazně polymorfní jádra	3
Počet mitoz v 10HPF	0-3	1
	4-6	2
	>6	3
<b>Grading karcinomu podle počtu bodů Nottinghamské klasifikace</b>		
GRADE 1	3-5	
GRADE 2	6-7	
GRADE 3	8-9	

Určení exprese steroidních receptorů (ER a PR) je významné pro predikci odpovědi na hormonální terapii. Výsledek analýzy je vyjadřován v procentech pozitivních buněk a podle většiny autorů znamená 10% pozitivita receptorů indikaci pro léčbu tamoxifenem [88]. Podle jiných studií je relevantní i hranice 1% positivity, neboť i tumory s 1-10% pozitivitou ER/PR reagují na hormonální terapii [89]. V naší studii považujeme za hranici positivity 10%.

*c-ErbB-2* je gen, jehož amplifikace a overexprese genového produktu se vyskytují asi u 20-25% karcinomů prsu. Analýza produktu genu *c-ErbB-2* je rutinní součástí vyšetření všech karcinomů prsu. Množství proteinu *c-erbB-2* se hodnotí jako negativní, slabě (1+), středně (2+) nebo silně (3+) pozitivní. V klinické praxi se u nádorů 2+ a 3+ provádí ještě analýza pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) k ověření amplifikace *c-ErbB-2*. V naší studii považujeme za pozitivivní nádory 2+ a 3+.

Ki-67 je jaderný antigen používaný jako marker proliferační aktivity nádorových buněk, která koreluje s gradingem a prognózou. Za hranici positivity v naší studii považujeme 10% pozitivitu nádorových buněk.

Od každé pacientky bylo odebráno 5 ml periferní krve do zkumavky potažené EDTA pro izolaci DNA, která byla použita jako referenční nenádorová tkáň. K analýze bylo k dispozici 73 nádorů a odpovídajících referenčních vzorků periferní krve.

Všechny vyšetřované pacientky daly písemný informovaný souhlas s genetickým vyšetřením. Informovaný souhlas byl schválen Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice.

### **3.3 Izolace DNA**

#### *3.3.1 Izolace DNA z plné periferní krve*

Genomická DNA byla izolována ze vzorku plné periferní žilní krve odebrané do zkumavek s EDTA. K izolaci byl použit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Postup byl dle instrukcí výrobce.

#### *3.3.2 Izolace DNA z parafinových bločků*

Pro izolaci byl použit QIA Amp DNA Tissue Mini Kit (Qiagen). Parafin z řezů z parafinových bločků byl odstraněn extrakcí xylenem.

### *3.3.3 Izolace DNA ze zmražené tkáně*

K izolaci DNA ze zmražené tkáně byl použit QIA Amp DNA Tissue Mini Kit (Qiagen). Po vyjmutí nádoru z hlubokomrazícího boxu byla z nádoru za sterilních podmínek skalpelem oddělena část odpovídající cca 25 – 50 mg a tkáň byla přenesena do 1,5 ml zkumavky s odpovídajícím množstvím lyzačního pufru. Postup izolace byl dle návodu výrobce.

## **3.4 Izolace RNA**

### *3.4.1 Izolace celkové buněčné RNA z krve*

Z lymfocytů periferní krve získaných gradientovou centrifugací periferní krve na Histopaque-1077 (Sigma) byla izolována celková buněčná RNA fenol-chloroformovou extrakcí v přítomnosti guanidinthiokyanátu [90].

### *3.4.2 Izolace RNA ze zmražené tkáně*

K izolaci celkové buněčné RNA ze zmražené tkáně byl použit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Po vyjmutí nádoru z hlubokomrazícího boxu z něj byla za sterilních podmínek skalpelem oddělena část odpovídající cca 20-30 mg a přenesena do 1,5 ml zkumavky. Poté byla tkáň homogenizována v lyzačním pufru s přísadkou  $\beta$ -merkaptoetanolu pomocí homogenizátoru Ultra-Turax. Dále bylo postupováno dle instrukcí výrobce.

## **3.5 Kontrola množství a kvality izolovaného genetického materiálu**

Koncentrace a čistota izolovaného genetického materiálu (DNA, RNA) byla stanovena na základě měření absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm s korekcí na 320 nm (Lambda-Bio, Perkin Elmer). Integrita získaného genetického materiálu byla ověřena elektroforézou na 8 cm dlouhém (SubCell, BioRad) 1% agarózovém gelu (UltraPure Agarose, Gibco BRL) barveném etidumbromidem (Amresco) ve standardním TBE pufru 90 min při 75 V. DNA byla uchovávána v 1,5 ml zkumavkách při 4°C, RNA byla uchovávána v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

### 3.6 Příprava cDNA

Z izolované celkové buněčné RNA byla reverzní transkripcí připravena komplementární DNA (complementary DNA, cDNA), která sloužila jako templát pro amplifikaci genu *ATM*.

1 µg RNA byl inkubován po dobu 10 min při 65°C se 100 ng směsi náhodných hexanukleotidů sloužících jako primery (random primers, Roche Molecular Biochemicals). Ihned po inkubaci byl vzorek rychle zchlazen a následně inkubován při 30°C 10 min a při 45°C 45 min ve 20 µl směsi obsahující 1x RT-PCR pufr (Roche Molecular Biochemicals), 10 mM DTT, 1 mM dNTPs a 20 U Expand RT-transkriptázy (Roche Molecular Biochemicals).

### 3.7 Mutační analýza *ATM*

Jako templát pro mutační analýzu genu *ATM* sloužila cDNA. K prescreeningu mutací jsme použili protein truncation test (PTT). Vzorky s abnormálním nálezem na PTT naznačující přítomnost mutace byly dále analyzovány přímým sekvenováním odpovídajícího fragmentu.

#### 3.7.1 Amplifikace genu *ATM*

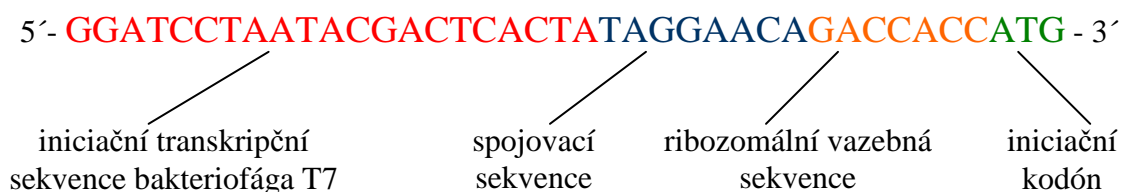
Kódující sekvence genu *ATM* byla rozdělena do 7 překrývajících se fragmentů. Amplifikace jednotlivých fragmentů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) probíhala jednostupňově s použitím primerů uvedených v tabulce 4 [91].

**Tabulka 4:** Primery použité pro amplifikaci kódující sekvence genu ATM (*F* – forward, *R* – reverse).

Fragment (Poloha v cDNA)	Primer	Sekvence primeru 5'→3'	Velikost amplifikovaného fragmentu (bp)
1 (76-1392)	1F	GAAGTTGAGAAATTTAAGC	1316
	1R	AATGCAACTTCCGTAAGGC	
2 (1048-2817)	2F	GCAGATATCTGT	1769
	2R	GTAGGTTCTAGCGTGCTAGA	
3 (2437-4092)	3F	AATGACATTGCAGATATTT	1655
	3R	TCAGTGCTCTGACTGGCACT	
4 (4048-5435)	4F	ACGTTACATGAGCCAG	1387
	4R	TCCAAATGTCATGATTTTCAC	
5 (5282-6529)	5F	CTGGCCTATCTACAGC	1247
	5R	CAACCTGCTAAGTGTGGGAT	
6 (6322-7856)	6F	CAGTGGGACCATTGC	1534
	6R	TTCTGACCATCTGAGGTCTCC	
7 (7651-9172)	7F	GATCACCCCATCACA	1521
	7R	TCACACCCAAGCTTTCCATC	

Pozice v cDNA je číslována podle GenBank – číslo U33841, +1 odpovídá A v iniciačním kodónu ATG.

Forward primery pro amplifikaci fragmentů určených k PTT analýze (zahrnující transkripci a translaci *in vitro*) byly na 5'-konci prodlouženy o promotorovou sekvenci rozeznávanou RNA polymerázou fága T7 a dále o konsenzní sekvenci eukaryotní translace nesoucí iniciační kodón tak, aby byl zachován původní čtecí rámec (Obrázek 7).



**Obrázek 7:** Schéma stavby sekvence, která je připojena k 5'-konci primerů použitých pro amplifikaci fragmentů určených k PTT analýze.

Promotorová transkripční sekvence je rozeznána fágovou DNA-dependentní RNA polymerázou, což umožní zahájení transkripce. Ta začíná asi 20 nukleotidů za iniciační sekvencí (délka promotoru u T7 fága), proto je předřazena spojovací sekvence (linker), která má za cíl pouze prodloužit připojovanou sekvenci. Konsenzní sekvence umožňující iniciaci eukaryotické translace (sekvence Kozakové) je umístěna bezprostředně před iniciační kodón.

Na 3' konci připojované sekvence následuje genově specifický úsek, který je připojen tak, aby zůstal zachován původní čtecí rámeček.

Amplifikace probíhala v 5 µl reakční směsi, která obsahovala 0,5 µl cDNA. Pro amplifikaci různých genových fragmentů bylo nutné použít 2 reakční směsi s různými DNA polymerázami:

1x PCR pufr (10 mM tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) (Takara Shuzo Co.), 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM každého primeru, 0,2 U LA Taq DNA polymerázy (Takara Shuzo Co.), u jednoho fragmentu ještě 12% sacharóza a 2,5% DMSO

1x PCR pufr (10 mM tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) (Finnzymes), 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM každého primeru, 0,2 U Taq DNA polymerázy (Finnzymes), u jednoho fragmentu probíhala PCR při vyšší koncentraci (2,5 mmol/l) MgCl<sub>2</sub>

Amplifikační cyklus se skládal z iniciační denaturace 2 min při 93°C, po níž následovalo 40 cyklů (93°C 30 s, Ta 30 s, 72°C 2 min) a závěrečná elongace 10 min při 72°C. Podmínky amplifikace jednotlivých fragmentů genu *ATM* ukazuje tabulka 5.

**Tabulka 5:** Podmínky amplifikace pro jednotlivé fragmenty genu *ATM*.

Fragment	DNA polymeráza	c MgCl <sub>2</sub> (mM)	sacharóza	DMSO	Ta (°C)
1	Finnzymes	2,5	-	-	60
2	Takara	1,5	-	-	58
3	Finnzymes	1,5	-	-	60
4	Finnzymes	1,5	-	-	58
5	Finnzymes	1,5	-	-	16 cyklů 68°C-1°C na cyklus, pak 52°C
6	Takara	1,5	12%	2.5%	16 cyklů 68°C-1°C na cyklus, pak 52°C
7	Finnzymes	1,5	-	-	60

### 3.7.2 Protein truncation test (PTT)

Tato metoda využívá efektu posunových (frameshift) a nonsense mutací, jejichž důsledkem je zkrácení syntetizovaného proteinu (truncation). Fragment DNA, amplifikovaný s forward primerem prodlouženým na 5'-konci o sekvenci obsahující fágový promotor, iniciační sekvenci a iniciační kodón (Obrázek 5), je transkribován a translatován *in vitro* v lyzátu králičích retikulocytů v přítomnosti [<sup>35</sup>S]-methioninu, který je inkorporován do vznikajícího proteinu a umožňuje jeho vizualizaci. Vzniklé proteinové produkty jsou rozděleny pomocí SDS-PAGE (elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného) a vizualizovány fluorograficky.

0.5 µl PCR produktu bylo inkubováno 90 min při 30°C v lyzátu z králičích retikulocytů doplněném T7 RNA polymerázou a zbaveném endogenního templátu (TnT/T7 Coupled Transcription/Translation Systém, Promega) v přítomnosti 0,5-1,0 µCi L-[<sup>35</sup>S]-methioninu (Amersham Biosciences) v celkovém objemu 3 µl. Syntetizované proteinové produkty byly poté děleny v 12% polyakrylamidových minigelech za přítomnosti SDS (Bio-Rad Laboratories) při 200 V 1 hod. Poté byly gely fixovány v roztoku 40% metanolu / 10% kyseliny octové 20 min a inkubovány s fluorografickým reagens (Amplify, Amersham Biosciences). Po usušení byly gely exponovány na rentgenový film při -80°C. V případě mutace byl na fluorogramu kromě produktu očekávané délky přítomen i produkt zkrácený. Takový fragment byl sekvenován.

### 3.7.3 Automatické sekvenování

Produkt PCR reakce byl purifikován na kolonkách obsahujících DNA vázající pryskyřici (PCR Purification Kit, Qiagen) dle návodu výrobce a eluován ddH<sub>2</sub>O do objemu 25 µl. Objem purifikátu použitého jako templát pro sekvenování se řídil elektroforeticky ověřenou kvalitou primárního PCR produktu. Sekvenační reakce probíhala v reakční směsi o celkovém objemu 5 µl, která obsahovala 2 µl roztoku BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 6 pmol sekvenačního primeru (Tabulka 6), purifikovaný PCR produkt a H<sub>2</sub>O do konečného objemu. Podmínky reakce byly: 95°C 2 min a 20 cyklů (95°C 5 s, 60°C 10 s, 72°C 4 min).

**Tabulka 6:** Primery použité k sekvenování exonů a přilehlých intronových úseků.

Exon	Primer	Sekvence primeru 5'→3'
11	ATI-11F	GATCGTGCTGTTCCACTCC
	ATI-11R	GATAGGATTCCACTGAAAG
36	ATI-36F	CAGCATTATAGTTTTGAAAT
	ATI-36R	GTGTGAAGTATCATTCTCCA
42	ATI-42F	TTTGTTTGCCACCTTCATTAG
	ATI-42R	AAATTCAGTTTAAAAATCACATGG
43+44	ATI-43F	AAATTTGCTAAATTTATAGACCGA
	ATI-44R	AGTGATGGCTTTACCAAATCTGG

Před kapilární elektroforézou v automatickém sekvenátoru byly sekvenační produkty nejprve precipitovány 15 minut při pokojové teplotě v 60 µl směsi obsahující 0,1 M acetát sodný, 4 mM EDTA, pH 8.0 a 80% ethanol. Po centrifugaci (20 min při 14 000 rpm a 4°C) byl supernatant odsát a opláchnut 70 µl 70% ethanolu a zkumavka byla opět centrifugována za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu byl precipitát vysušen v cykléru 1 min při

90°C. DNA byla potom rozpuštěna v HiDi formamidu, denaturována 2 min při 95°C a ihned ochlazena na 4°C. Takto připravený vzorek byl analyzován za denaturujících podmínek ve 36 cm kapiláře na polymeru POP-7 na automatickém sekvenátoru Abi Prism 3130 (Applied Biosystems) a analyzován pomocí software Sequencing Analysis v2.5.5 (Applied Biosystems).

#### 3.7.4 Označení mutací

Nomenklatura detekovaných mutací v genu *ATM* je podle doporučení, které navrhli den Dunnen a Paalman [92]. Číslování je založeno na sekvenci cDNA a číslem +1 je označován adenin v iniciačním kodónu ATG v referenční sekvenci pro kompletní cDNA (databáze GenBank, sekvence U33841). K popisu nalezených sestřihových sekvenčních variant je pro snazší orientaci a možnost srovnání s literaturou použita i tradiční nomenklatura.

### 3.8 Kvantitativní analýza sestřihových mutací

Pro přesnější charakterizaci efektu mutací c.1066-6T>G, c.5177+1A>G a c.6096-9delTTCTT na sestřih primárního transkriptu jsme analyzovali vzorky RNA izolované z periferní krve od pacientek nesoucích výše zmíněné mutace a od zdravých kontrol. Rovněž byly testovány nádorové a okolní nenádorové tkáně od pacientek bez mutace v genu *ATM*. Jednotlivé cDNA získané reverzní transkripcí pak sloužily jako templát pro amplifikaci úseku, který obsahoval exon 11 (5'-GATCTGCTAGTGAATGAGATAAGTC-3' - forward primer a 5'-AATGCAACTTCCGTAAGGC-3' - reverse primer) v případě mutace c.1066-6T>G nebo exon 36 (5'-CCATTGACAAGACTTGAAGGACT-3' - forward primer a 5'-GCTGTAGATAGGCCAGCATTG-3' - reverse primer) v případě mutace c.5177+1A>G nebo exon 44 (5'-CAGAAGTATAGGGGAGCCAGATAG-3' - forward primer a 5'-CTGACGGAAGTGCAATGGT-3' - reverse primer) v případě mutace c.6096-9delTTCTT. Forward primery byly fluorescenčně značeny 6-FAM. PCR probíhala v 10 µl reakčních směsích, které obsahovaly 1 x PCR pufr (Roche Molecular Biochemicals), 0,2 mM každého dNTPs, 0,4 µM primery (forward a reverse), 1 µl cDNA a 0,5 U Fast Start Taq DNA polymerázy (Roche Molecular Biochemicals). Po počáteční denaturaci 6 min při 95°C následovalo 27 cyklů ( 95°C 30 s, 60°C nebo 58°C nebo 64°C 30 s pro jednotlivé úseky cDNA, 72°C 2 min) a závěrečná polymerace 7 min při 72°C. 1 µl PCR produktu byl po kontrole na 1,5% agarózovém gelu smíchán s 9 µl HiDi formamidu a 0,2 µl standardu LIZ-



600 (Applied Biosystems), denaturován 95°C 3 min a ihned zchlazen na 4°C. PCR produkty byly následně separovány v automatickém DNA sekvenátoru Abi 3130 (Applied Biosystems). Elektroforéza probíhala za denaturujících podmínek ve 36 cm kapiláře plněné polymerem POP-7. K určení relativního množství PCR produktu plné délky a sestřiženého produktu, kterému chyběl 1 odpovídající exon, byl použit software GeneMapper, verze 4.0 (Applied Biosystems).

### **3.9 Analýza ztráty heterozygotity**

#### *3.9.1 Mikrosatelitové markery*

Jako mikrosatelitové markery (také STRs – short tandem repeats) jsou označovány krátké úseky DNA tvořené jedno až šestinukleotidovými mnohonásobně se opakujícími sekvencemi (tandemové repetice). Celková délka takové sekvence je do několika set párů bází. Frekvence výskytu mikrosatelitových markerů je velmi vysoká, neboť jeden připadá v průměru na 6 kb genomové DNA. Markery jsou pro svou vysokou heterozygotitu využívány v mnoha aplikacích, včetně forenzních.

V naší studii jsme použili mikrosatelitové markery pro analýzu ztráty heterozygotity. Jako informativní byl označen marker, pro nějž byla pacientka heterozygotní. Ztráta heterozygotity (LOH – loss of heterozygosity) v nádoru byla posuzována vzájemným srovnáním intenzity alel ve zdravé a nádorové tkáni.

#### *3.9.2 Amplifikace mikrosatelitových markerů.*

K LOH analýze byly pro *ATM* lokus zvoleny tři mikrosatelitové markery – jeden intragenový D11S2179 a dva extragenové D11S1294 a D11S1819. Zatímco marker D11S1819 je orientován od *ATM* směrem k centroměře (kontig GenBank AP002353.4), D11S1294 je lokalizován směrem k telomeře, ve vzdálenosti přibližně 207 kb upstream (kontig GenBank AP000871.7). Amplifikace byla provedena pomocí PCR v 10 µl reakční směsi, která obsahovala 1x PCR pufr (10 mM tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) (Finnzymes), 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM každého primeru, 0,5 U Taq DNA polymerázy (Finnzymes) a 20-50 ng DNA. Reakce probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace při 93°C 3 min; 35 cyklů 93°C 30 s, 55°C, 60°C nebo 65°C (pro D11S1294, D11S1819 a D11S2179) 30 s, 72°C 30 s a závěrečná polymerace 5 min při 72°C. Použité

primery a délku amplikonu uvádí tabulka 7. Sekvence primerů byly převzaty z Genome Database (<http://www.gdb.org>).

**Tabulka 7: Primery pro amplifikaci mikrosatelitů a přibližná délka jednotlivých amplikonů**

Marker	Primer	Sekvence 5'→3'	Průměrná délka amplikonu/jednotka repetice (bp)
D11S2179	D11S2179F	TAGGCAATACAGCAAGACCCTG	143/2
	D11S2179R	GCACTGGAATACGATTCTAGCAC	
D11S1294	D11S1294F	GAGCCCAGGAGTTTGAGAC	294/4
	D11S1294R	CCTGGTAGGGTGGTAGACT	
D11S1819	D11S1819F	GTGAAAGGCCAGATGGTCCAAC	133/2
	D11S1819R	CCTATTTGCAGAAAACCTACTGT	

### 3.9.3 Analýza mikrosatelitových markerů

Pro analýzu mikrosatelitových markerů byly použity 2 metody a byla vyhodnocena jejich dostupnost a efektivita.

#### 3.9.3.1 Elektroforéza na komerčně dostupných gelech Spreadex

PCR produkty byly separovány horizontální elektroforézou na prefabrikovaných gelech Spreadex (Elchrom Scientific) pomocí elektroforetické aparatury SEA 2000 (Elchrom Scientific). Spreadexové gely mají vysokou rozlišovací schopnost, což umožňuje separaci fragmentů lišících se pouze o 1 bázi i na krátkých gelech.

2 – 3 µl PCR produktu bylo smícháno s 1 µl nanášecího pufu (Elchrom Scientific) a takto připravené vzorky byly separovány při 120 V. Elektroforéza probíhala v 30 mM TAE pufu při 55°C. Typ gelu a dobu trvání elektroforézy u jednotlivých markerů ukazuje tabulka 8.

**Tabulka 8: Typ gelu a doba trvání elektroforézy na gelech Spreadex pro jednotlivé markery.**

Marker	Gel	Doba elektroforézy (min)
D11S2179	EL300 nebo EL400 Wide Mini 4x25	176 nebo 220
D11S1819	EL300 Wide Mini 4x25	140
D11S1294	EL600 Wide Mini 4x25	265

Gely byly následně sloupnuty z plastového nosiče a obarveny po 40 min inkubaci se SYBR Gold (Invitrogen) ředěného 1/10 000 10 mM TAE pufrem. Po odbarvení (10 min ve vodě) byly fragmenty vizualizovány pomocí UV transluminátoru při 300 nm. Pro výběr

vhodného gelu a podmínek elektroforézy byl použit software ElQuant (Elchrom Scientific), který je volně dostupný na internetu. Ztráta heterozygoty byla hodnocena subjektivně dvěma nezávislými pozorovateli jako snížení intenzity signálu o více než 50%. Jako velikostní standard byl použit M3 Marker (Elchrom Scientific) získaný digescí plazmidu pBR322 třemi restrikčními enzymy: MspI, HhaI a HaeIII.

### **3.9.3.2 Fragmentační analýza na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130**

Pro analýzu na automatickém sekvenátoru byly forward primery na 5' konci fluorescenčně označeny pomocí 6-FAM. Přibližně 0,5 µl PCR produktu (v závislosti na množství) bylo smícháno s 9,3 µl HiDi formamidu a 0,2 µl velikostního standardu LIZ-600 (Applied Biosystems). Směs byla denaturována 3 min při 95°C a ihned ochlazena na 4°C. Elektroforéza probíhala za denaturujících podmínek ve 36 cm kapiláře plněné polymerem POP-7 na automatickém sekvenátoru Abi Prism 3130 (Applied Biosystems). K hodnocení byl použit software GeneMapper, verze 4.0 (Applied Biosystems). Jako LOH byl hodnocen vzorek, ve kterém byl poměr ploch křivek jednotlivých alel v nádoru ku poměru ploch křivek těchto alel v nenádorové tkáni větší než 1,35 nebo menší než 0,67.

## **3.10 Analýza metylace promotoru ATM**

Hypermethylace je jedním z možných způsobů inaktivace tumorsupresorového genu. K její analýze se používá mnoho metod, které lze v zásadě rozdělit do dvou skupin:

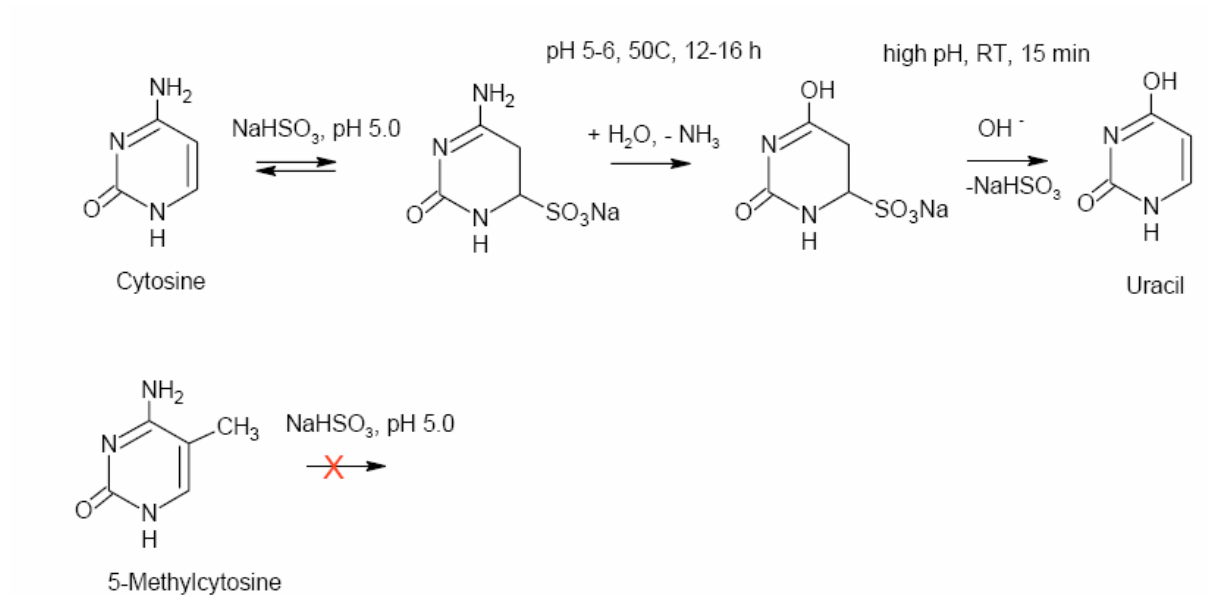
- Metody vycházející z bisulfitové modifikace DNA, což je například bisulfitové sekvenování, metylačně specifická PCR, MethyLight, QAMA (quantitative analysis of methylated allele)
- Metody vycházející z restrikce pomocí metylačně specifických endonukleáz jako je MS-MLPA (methylation specific multiplex ligation-dependent probe amplification)

Pro analýzu hypermethylace byly použity 2 metody a vyhodnocena jejich dostupnost a efektivita.

### *3.10.1 Bisulfitové sekvenování*

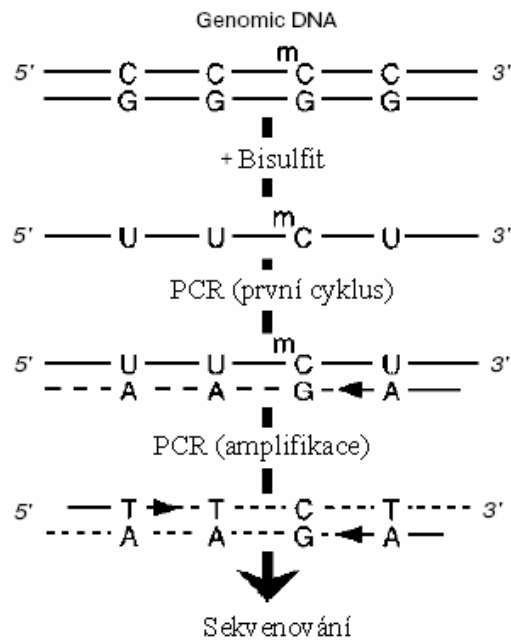
Bisulfitové sekvenování je sekvenování PCR produktu, který byl připraven amplifikací DNA modifikované bisulfitem. Modifikace bisulfitem je založena na reakci mezi

bisulfitovým aniontem ( $\text{HSO}_3^-$ ) a cytosinem, která vede k sulfonaci a k rychlé deaminaci cytosinu na uracil. 5-Methylcytosin je naproti tomu sulfonován nesrovnatelně pomaleji. Obrázek 8 ukazuje průběh modifikace.

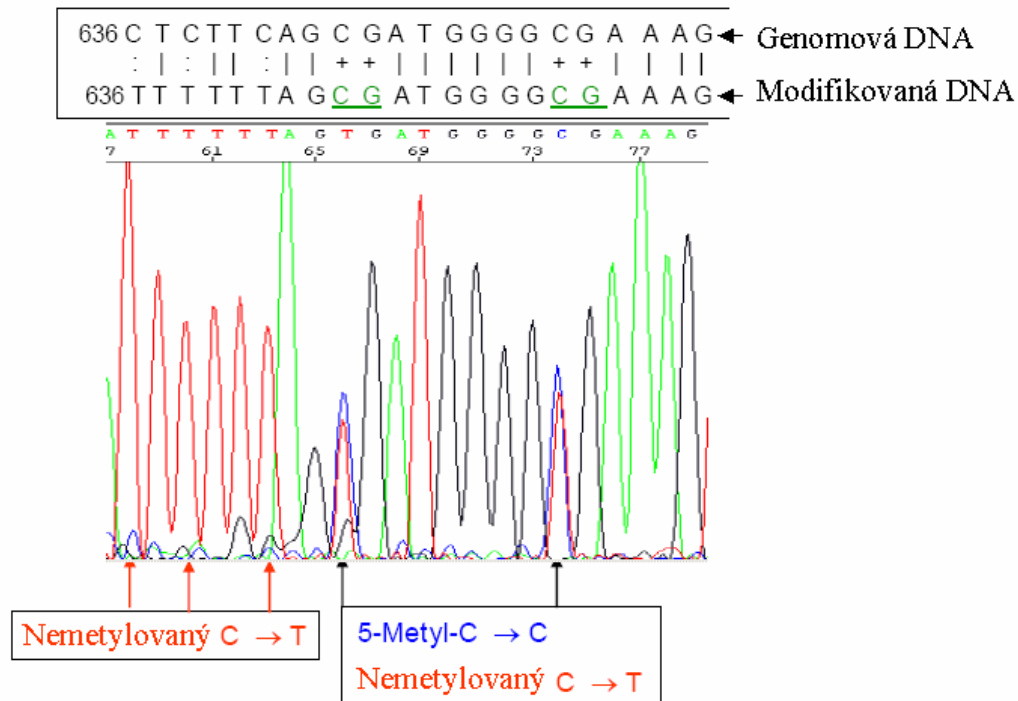


**Obrázek 8:** Průběh modifikace DNA bisulfitem

Při následné replikaci je pak zařazován místo uracilu thymin (Obrázek 9, 10).



**Obrázek 9:** Postup při analýze metylace pomocí bisulfitového sekvenování



www.appliedbiosystems.com

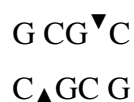
**Obrázek 10:** Výsledek bisulfitového sekvenování metylované DNA

0.5 µg DNA z nádorové tkáně bylo modifikováno pomocí kitu EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research) podle instrukcí výrobce. Jako pozitivní kontrola byla použita univerzálně metylovaná DNA (CpGenome Universal Methylated DNA, Intergen). 2 µl DNA modifikované bisulfitem pak sloužilo jako templát pro amplifikaci promotoru *ATM* v 25 µl reakční směsi, která obsahovala 1x PCR pufr, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTPs, 0.4 µM primery (5'-TTTTTAGATTTGGAGGGG-3' - forward a 5'-CCCACTTCTAAAAAAAAAAA-3' - reverse) a 0.625 U hot-start AmpliTaq Gold polymerázy (Applied Biosystems). Primery byly vybrány tak, aby neobsahovaly žádný dinukleotid CpG a tudíž aby PCR probíhala nezávisle na stavu metylace promotoru. Amplifikace probíhala při následujících podmínkách: počáteční denaturace při 95°C 10 min, 40 cyklů (95°C 30 s, 52°C 30 s a 72°C 40 s) a závěrečná polymerace 72°C 7 min. PCR produkty byly separovány na automatickém sekvenátoru Abi Prism 3130 (Applied Biosystems) za denaturujících podmínek ve 36 cm kapiláře plněné polymerem POP-7 a analyzovány pomocí softwaru Sequencing Analysis v2.5.5 s KM Basecaller (Applied Biosystems).

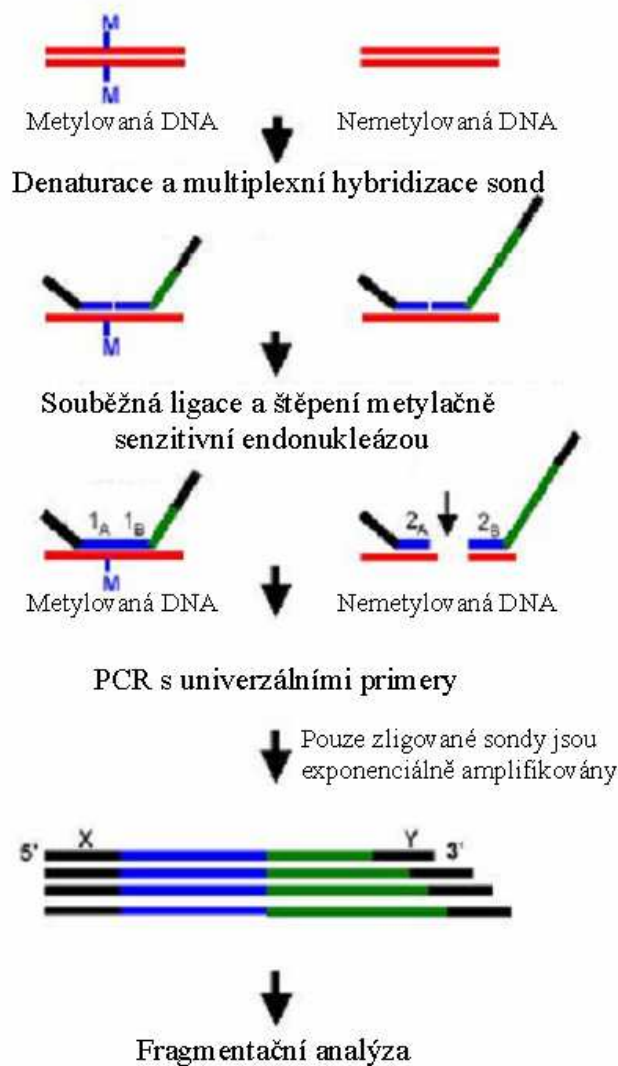
### 3.10.2 MS-MLPA

Amplifikační technika MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) je relativně nová metoda, která se stále častěji používá také při diagnostice. Slouží především k průkazu delecí a amplifikací části nebo celého testovaného genu, které jsou jinak obtížně detekovatelné z důvodu přítomnosti normální alely. Jedna reakce může zachytit tyto aberace až u 45 testovaných úseků DNA. Reakce probíhá jako hybridizace a ligace sond a jejich následná amplifikace pomocí 1 páru primerů. PCR produkty jsou pak elektroforeticky separovány.

MS-MLPA je modifikace metody MLPA, od níž se liší tím, že sekvence, na které se ligují sondy, obsahuje restrikční místo pro metylačně senzitivní endonukleázu HhaI. Restrikční místo je tvořeno sekvencí CGCG a HhaI štěpí pouze nemetylovanou sekvenci za tvorby kohezních konců:



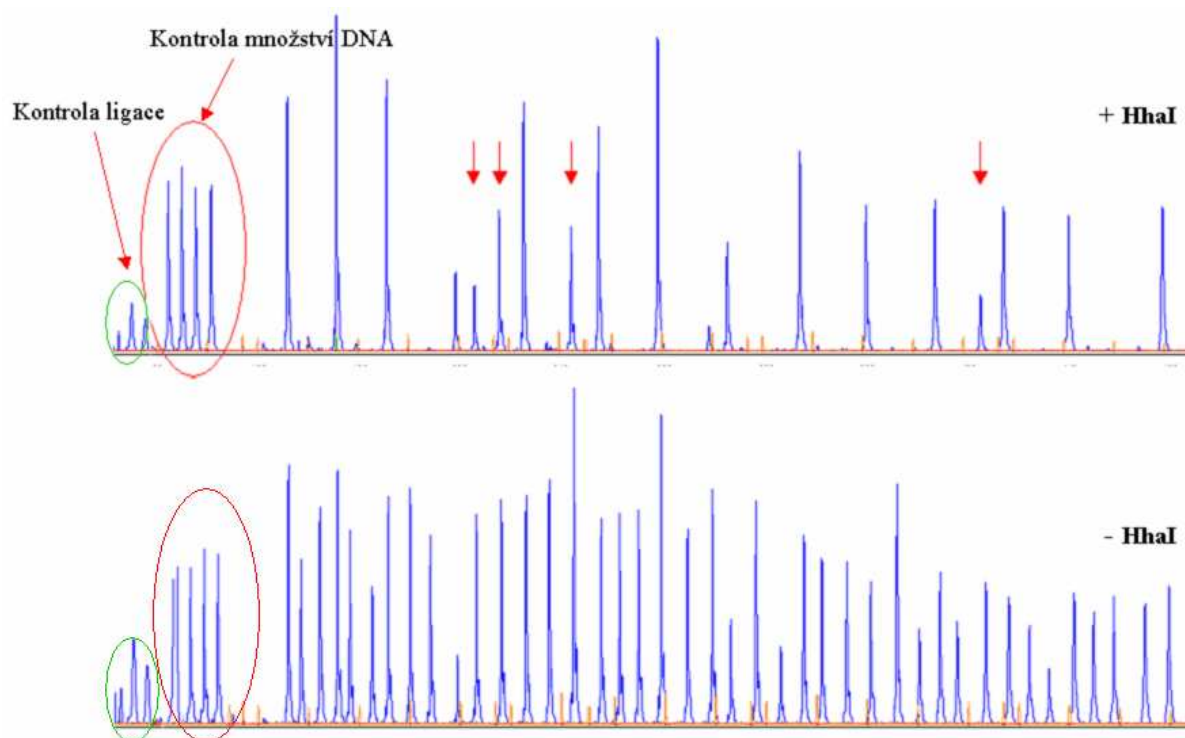
Reakční směs se po hybridizaci rozdělí do dvou zkumavek a v jedné zkumavce potom následuje ligace a v druhé restrikce a ligace. Reakce v první zkumavce slouží pro určení počtu kopií testovaných sekvencí, reakce v druhé zkumavce pro detekci stavu metylace. Průběh reakce ukazuje obrázek 11.



www.mlpa.com

**Obrázek 11:** Postup při MS-MLPA

Pro analýzu hypermetylace jsme použili kity MS-MLPA ME001 a ME002 (MRC Holland) a metylačně senzitivní restriční endonukleázu HhaI (Promega). Jako templát sloužilo vždy 90 ng nádorové DNA. Jako kontrola byla použita univerzálně metylovaná DNA (CpGenome Universal Methylated DNA, Intergen) a univerzálně metylovaná DNA s nemetylovanou DNA v poměru 1:1. Reakci jsme prováděli v polovičním doporučeném objemu dle instrukcí výrobce. Obrázek 12 ukazuje kontrolní nemetylovanou DNA analyzovanou kitem MS-MLPA ME002.



**Obrázek 12:** Výsledek analýzy MS-MLPA pomocí kitu ME002. Šipky ukazují metylaci promotorů genů *PAX5*, *CDH13*, *WT1* a *PAX6*

Kit ME001 obsahuje 26 sond pro detekci hypermetylace v promotorových oblastech 24 genů a 15 kontrol, které nemají restrikční místo pro HhaI. Kit ME002 obsahuje 27 sond pro detekci hypermetylace v promotorových oblastech 25 genů a 14 kontrol, které nemají restrikční místo pro HhaI. Oba kity tedy umožňují určit počet kopií u 49 úseků DNA. Kity ME001 a ME002 obsahují různé sondy k 13 stejným genům, čehož lze využít k ověření analýzy. Soubor použitých sond ukazují tabulky 9 a 10. Oba kity dále obsahují 4 interní kontroly pro detekci množství použité DNA a 3 pro kontrolu správného průběhu ligace.



**Tabulka 9: Přehled sond v kitu MS-MLPA ME001; - ukazuje místo ligace**

<b>Gen</b>	<b>Cílová sekvence s označeným HhaI restrikčním místem</b>
APC	GGCTGGGTGTGGGCGCACGT-GACCGACATGTGGCTGTATTGGTGCAGCCCGCCAGGGT
ATM	GGAGGGAGGAGGCGAGAGGAGTCCGGA- TCTGCGCTGCAGCCACCGCCGCGTTGATACTACTTT
BRCA1	TTCTCAGATAACTGGGCCCTGC-GCTCAGGAGGCCTTACCCTCTGCTCTGGGTAAAGG
BRCA2	CGGGAGAAGCGTGAGGGGACAGATTTGTG- CCGGCGCGGTTTTTGTGAGCTTACTCCGGCCAAAAAAGA
CASP8	CTTTCCAATAAAGCATGTCCAGCGCTC-GGGCTTTAGTTTGCACGTCCATGAATTGTCTGCCACA
CD44	CTCCTTTCGCCC GCGCCCTCC-GTTCGCTCCGGACACCATGGACAAGTTTTGGTGG
CDH13	TTCTGTGCGTTCCTGTCCAG-GTAGGGAAGAGGGGCTGCCGGCGCGCTCTG
CDKN1B	AGCCCCCTGCGCGCTCCTAGA-GCTCGGGCCGTGGCTCGTCGGGGTCTGTGTCTTT
CDKN2A	CAGAGGGGAAGGAAAGAGGAAGAAGCGCTCAGAT- GCTCCGCGGCTGTCTGTAAGGTTAAACCAGAAAATAAAAATGG = p14-ARF promotor region.
CDKN2B	CTGCGACAGCTCCTGGAAGCCGG-CGCGGATCCCAACGGAGTCAACCGTTTCGGGAGG
CHFR	CGCGAGAGTAGGCGCGTGGAGG-GCGCTCGGCCATCTTTGATCCTGACCAGGCGACTTCGT
DAPK1	CGCGAGGATCTGGAGCGAACTGCT-GCGCCTCGGTGGGCCGCTCCCTTCCCTCCCT
ESR1	CGCCCGCCGTGTACAACCTACCCCG-AGGGCGCCGCTACGAGTTCAACGCCGCGGC
FHIT	CGCGGGTCTGGGTTTTCCACGC-GCGCTCAGGTCATCACCCCGAGCCAGTGGG
GSTP1	CGAAGAGCGGCCGCGCGCTG-ACTCAGCACTGGGGCGGAGCGGGGGCGGGACC
HIC1	CCGCTCCAGATAAGAGTGTGCGGA-AAGCGCGCGGGGCTGAGACGCGACCAGGAC
IGSF4	CCTGGAGCCCGAGTCCTTGACGCCA- GGCGCCCGGGGAGAACACTTTTTCTTGATCCGGGAAAGCA
MLH1	CGTTGAGCATCTAGACGTTTCCTTGGCTCT- TCTGGCGCCAAAATGTCGTTTCGTGGCAGGGGTTATTC
MLH1	CTGCTGAGGTGATCTGGCGCAGA-GCGGAGGAGGTGCTTGGCGCTTCTCAGGCTCCTCCTCT
PTEN	CACCGGAGCGGGCGCAGGAGA-GGCCTGCGGGGTGCGTCCCACTCACAGGGAT
RARB	CCGCCGGCTTGTGCGCTCGCT-GCCTGCCTCTCTGGCTGTCTGCTTTTGCAGGGCTGCT
RASSF1	CAGTCCCTGCACCCAGGTTTCCA-TGCGCGGCTCTCCTCAGCTCCTTCCCGCCG
RASSF1	GTCCACAGGGCGGGCCCCGAC-TTCAGCGCTCCCCCAGGATCCAGACTG
TIMP3	TCCAGCGCCGAGGCAGCCTCGC-TGCGCCCCATCCCGTCCCGCCGGGCACTCGG
TP73	CGCCCGCAAGGGGACGCAGC-GAAACCGGGGCCCCGCGCCAGGCCAGCCGGGA
VHL	GCGAAGACTACGGAGGTCGACTCGGG-AGCGCGCACGCAGCTCCGCCCCGCTCCGACC
<b>Kontrolní geny</b>	
AI651963	CAATTGCCATTTTTTCTGACATTCAGTGT- GGAAATTTGGTGCACGACTGTTAGGGGAGATCTGT
BCL2	CTTCTCCTGGCTGTCTCTGAAGACTC-TGCTCAGTTTGGCCCTGGTGGGAGCTTG
BRCA2	GGCCATGGAATCTGCTGAACAAAA- GGAACAAGGTTTATCAAGGGATGTCACAACCGTGTGGAAGTTGCGT
CASR	CCAGTGCCTGTAACAAGTGCCAGATGACT- TCTGGTCCAATGAGAACCACACCTCCTGCATTGCCAAGGA
CDH1	CTATGAAGGAAGCGGTTCCGAAGCTGCTA- GTCTGAGCTCCCTGAACTCCTCAGAGTCAGACAAAGACCAGGAC
CDK6	GCGTGATTGGACTCCAGGAGAAGAAGACT- GGCCTAGAGATGTTGCCCTTCCAGGCAGGCTTTTCA
CREM	GCTCCTCCACCAGGTGCTACAAT- TGTACAGTACGCAGCACAAATCAGCTGATGGCACACAGCAGT
CTNNB1	GGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACA-GTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACT
KLK3	TGTGTCACCATGTGGGTCCCG-GTTGTCTTCTCACCTGTCCGTGACGTGGA
MLH3	GCGACCTGTTCTTCTTTCCTTCCGA- GAGCTCGAGCAGAGAGGACTGTGATGAGACAGGATAACAG
PAH	CAGTGGCCTGGTTCCCAAGAA-CCATTCAAGAGCTGGACAGATTTGCCAATCAGATTCTCAG
PARK2	CGTTCACGACCCTCAACTTGGCTACT- CCCTGCCTTGTGTGGGTAAGTCTAGCATGTTTTCTCTCCAT
TNFRSF1A	GCCACACTGCCCTGAGCCCAA-ATGGGGGAGTGAGAGGCCATAGCTGTCTGGC
TNFRSF7	GAAAGTCTGTGGAGCCTGCA-GAGCCTTGTCTGTTACAGCTGCCCCAGGGAGG
TSC2	GAGCCAGAGAGAGGCTCTGAGAAG- AAGACCAGCGGCCCTTTCTCCTCCACAGGGCCTCCTG



1  $\mu$ l reakční směsi byl smíchán s 9  $\mu$ l HiDi formamidu a 0,2  $\mu$ l standardu LIZ-600 (Applied Biosystems), denaturován při 95°C 3 min a analyzován na automatickém sekvenátoru Abi Prism 3130 (Applied Biosystems) za denaturujících podmínek ve 36 cm kapiláře plněné polymerem POP-7. Plochy křivek byly odečteny pomocí software GeneMapper (Applied Biosystems). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Microsoft Excel. Počet kopií každého testovaného úseku DNA byl zjištěn z reakce bez přidané restriktázy tak, že plocha dané křivky byla dělena plochou všech křivek a získaná relativní hodnota byla porovnána s referenční hodnotou. Delece jedné alely je provázána snížením relativní hodnoty o 35 – 55%. Metylace určitého promotoru byla spojena s přítomností odpovídající křivky v reakci s přidanou restriktázou. Kvantifikace byla provedena porovnáním poměrů ploch křivek mezi testovanou alelou s restriktčním místem pro HhaI a kontrolami bez restriktčního místa pro HhaI u reakce s přidanou restriktázou a bez přidané restriktázy. Jako aberantní byla hodnocena metylace testované sekvence vyšší než 10% [93].

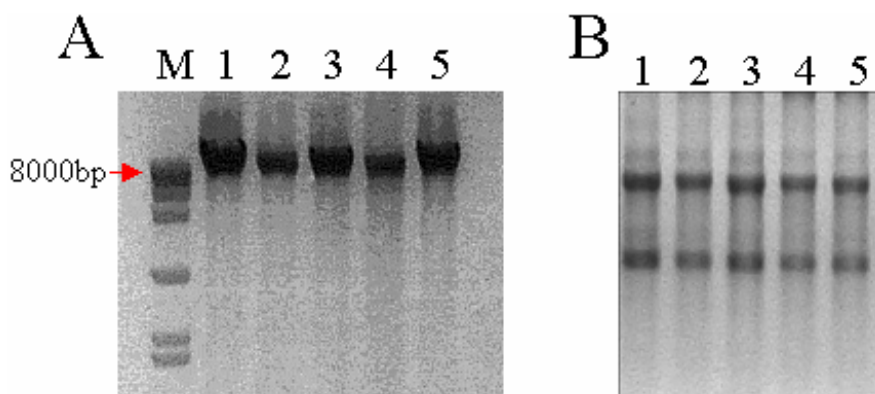
### **3.11 Imunohistochemická analýza**

Imunohistochemická analýza byla provedena MUDr. Pavlem Dundrem na Ústavu patologie 1.LF UK a VFN v Praze. U tří pacientek nesoucích mutaci v genu *ATM* byl vyšetřen vzorek nádorové tkáně fixované v parafínu pocházející z primárního nádoru a v jednom případě z metastázy. Dále byl vyšetřen soubor sporadických karcinomů prsu. Vzorky byly nejprve histologicky ověřeny a bylo určeno množství nádorových buněk. Dále bylo stanoveno množství estrogenových a progesteronových receptorů, proteinu ErbB2 a proliferační aktivita prostřednictvím exprese proteinu Ki67. Protein ATM byl stanoven pomocí myší monoklonální protilátky Ab-8 (clone ATX08) (Neomarkers – Lab Vision Corporation) specifické k jeho C konci podle návodu výrobce.

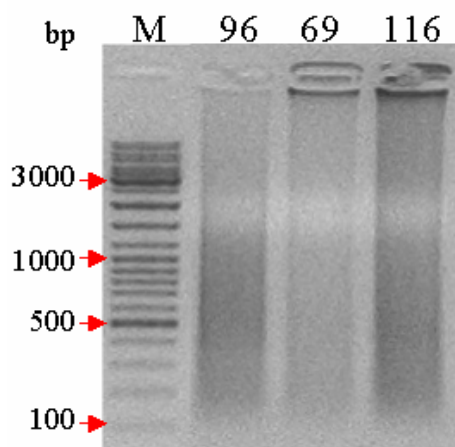
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Genetický materiál

Izolací genomové DNA a celkové buněčné RNA byl získán genetický materiál, jehož kvalita byla ověřena elektroforeticky (Obrázek 13 a 14).



**Obrázek 13:** Kontrola integrity izolované DNA (A) a RNA (B) pomocí 1% agarózové elektroforézy. M – velikostní standard.



**Obrázek 14:** Kontrola integrity DNA izolované z nádorové tkáně fixované v parafinu pomocí 1% agarózové elektroforézy. M – velikostní standard.

### 4.2 Výběr pacientek

#### 4.2.1 Dědičný karcinom prsu

Analýzu genu *ATM* jsme provedli u 161 vysoce rizikových pacientek s karcinomem prsu, které byly vybrány podle kritérií uvedených v kapitole 3.1 a nebyly nosičkami mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1/2* [94], a dále u 183 kontrol.

Od pacientek číslo 69, 96 a 116 byly získány vzorky nádorů zalité v parafinu. U těchto nádorů byl určen histologický typ a grade, bylo stanoveno množství nádorových buněk a dále množství estrogenových a progesteronových receptorů, proteinů p53, c-ErbB-2 a proliferační aktivita pomocí Ki-67. Tabulka 11 charakterizuje výše zmíněné nádory v daných parametrech.

**Tabulka 11:** Charakterizace nádorů získaných od nosiček mutací v genu *ATM*.

Sledovaný parametr:	Pacientka číslo:		
	69	96	116
Histologický typ	Metastáza IDC	IDC	IDC(80%)/DCIS(5%)/ILC (15%)
% nádorových buněk	50 - 60	30 - 40	40 - 50
Grade	-	3	2
ER	+	+	+
PR	-	-	+
c-ErbB-2	-	+	-
Proliferační aktivita (Ki-67)	-	-	-
p53	-	5%	1%

#### 4.2.2 Sporadický karcinom prsu

Pro analýzu genetických změn tumor supresorového genu *ATM* jsme měli k dispozici soubor 73 neselektovaných karcinomů prsu z peroperačních biopsií. 70 nádorů bylo získáno od pacientek ve věku 36 – 82 let, 3 nádory pak od pacientek mladších 36 let, které zároveň splňovaly indikační kritéria pro genetické vyšetření hlavních predispozičních genů *BRCA1/2* doporučené pacientkám s hereditárním karcinomem prsu. Tabulka 12 charakterizuje soubor vyšetřených nádorů a rovněž uvádí histopatologická data.

**Tabulka 12: Souhrn histopatologických dat vyšetřovaných nádorů**

Pacient č.	Diagnóza (roky)	Histol. typ	Grade	ER	PR	erbB2	Ki-67
1	65	IDLC	1	+	+	-	-
3	40	DCIS/IDC	3/2	+	+	-	-
4	66	IDC	3	-	-	+	0
5	36	ILC	2	+	+	-	-
6	66	IDC	1	+	+	-	-
7	51	IDC	3	-	-	+	+
8	70	ILC	0	+	+	-	0
9	76	IDC	2	-	-	+	0
10	59	IDC	1	+	+	+	0
11	54	IDC	2	+	+	+	0
12	46	IDC	0	+	+	+	0
13	72	IDC/DCIS	2/2	+	+	+	-
14	51	IDC	3	-	+	-	+
15	77	IDC	2	+	+	-	-
17	61	IDC	3	+	+	+	0
19	47	IDC	3	-	+	-	+
21	49	IDC	3	+	+	-	-
22	67	IDC	1	+	+	+	0
24	54	IDC	3	+	+	+	-
25	60	IDC	3	-	-	+	-
26	68	IDC	1	+	+	-	-
27	48	IDC	2	+	+	-	+
28	44	IDC/DCIS	3/3	+	+	-	-
29	48	AHP	0	0	0	0	0
32	64	IDC	2	+	+	-	-
33	65	IDC	2	+	+	-	-
35	69	IDC	1	+	+	-	-
36	78	ILC	1	+	+	-	-
37	81	IDC	3	+	+	+	+
40	55	IDC	3	+	+	+	+
42	60	IDC/DCIS	3/3	+	+	-	+
43	74	IDC/DCIS	1/1	+	+	-	-
46	37	IDC	3	-	-	+	0
48	59	ILC	2	+	+	+	0
49	45	IDC	3	-	-	-	+
53	51	ILC	0	+	+	+	0
56	37	ILC	3	+	+	0	0
61	51	IDC	3	+	+	-	+
62	78	ILC	1	+	+	-	+
63	68	IDC	3	+	+	-	+
65	58	ILC	1	+	-	-	-
66	58	IDC	3	+	-	-	+

(ER – estrogenový receptor, PR – progesteronový receptor). IDC – invazivní duktální karcinom, ILC – invazivní lobulární karcinom, ILDC – invazivní lobuloduktální karcinom, AHP – atypická hyperplázie, MC – medulární karcinom, IKC – invazivní kribriiformní karcinom, 0 – není k dispozici.

**Tabulka 12 - pokračování**

Pacient č.	Diagnóza (roky)	Histol. Typ	Grade	ER	PR	erbB2	Ki-67
67	49	MC	neurčuj e se	-	-	-	+
69	51	IDC	0	-	-	-	-
71	42	IDC	3	-	-	+	0
72	82	IDC	2	+	+	-	+
74	54	IDC/DCIS	3/3	-	-	-	+
75	51	IDLC	2/2	+	+	-	-
76	72	IDC	1	+	+	-	-
78	44	IDC/DCIS	2/2	+	+	-	+
79	46	IDC/DCIS	1/1	+	+	-	-
80	59	IDC/DCIS	1/2	-	-	+	-
83	72	ILC	3	+	+	-	+
84	37	IDC	3	-	-	+	+
86	68	IDC	2	+	+	-	-
87	44	IDC/DCIS	2/2	-	+	-	-
88	0	IDC	1	+	+	-	-
92	31	0	0	0	0	0	0
93	54	IDC/DCIS	1/1	+	+	-	-
95	51	IDC/DCIS	1/1	+	+	-	-
97	61	IDC/DCIS	1/3	+	+	-	-
98	61	IKC	1	+	+	-	-
99	61	0	0	0	0	0	0
100	71	IDC/DCIS	2/2	+	+	-	-
101	27	IDC/DCIS	2/3	+	+	-	+
102	65	IDC/DCIS	2/2	+	-	+	+
103	66	IDC	1	+	+	-	-
104	51	IDC	2	+	+	-	0
105	62	IDC	1	+	+	-	0
106	32	IDC	3	+	+	-	0
107	53	IDC	2	+	+	+	0
108	60	IDC	1	+	+	-	0

Zastoupení obou hlavních typů karcinomů ve vyšetřované skupině odpovídá jejich přibližnému výskytu v populaci. Většinu nádorů tvořily invazivní duktální karcinomy nebo invazivní duktální karcinomy s minoritní složkou duktálního karcinomu in situ (57 případů, 78%). 9 nádorů odpovídalo invazivnímu lobulárnímu typu (12,3%) a 2 smíšenému invazivnímu lobuloduktálnímu karcinomu (2,7%). V jednom případě se jednalo o atypickou hyperplázii, benigní prekancerózu, v jednom o invazivní kribriformní karcinom a jednou o medulární karcinom. Nejčastěji byly zastoupeny nádory stupně 3 (24 případů, 32,9%), následovaly nádory stupně 1 (22 nádorů, 30%). 19 případů (26%) bylo stupně 2.

U většiny nádorů byla registrována pozitivita estrogenových i progesteronových receptorů (51, 69,9%). Pouze estrogen pozitivní byly 3 nádory (4,1%), pouze progesteron pozitivní byly rovněž 3 nádory (4,1%). Estrogen i progesteron negativních bylo 13 nádorů (17,8%).

U 21 nádorů byla prokázána c-erbB-2 pozitivita (28,8%), 48 nádorů bylo c-erbB-2 negativních (65,8%), ve 4 případech tento údaj nebyl k dispozici.

Údaje o proteinu Ki-67 byly k dispozici u 51 nádorů, z nichž 20 (39,2%) bylo pozitivních a 31 negativních (60,8%).

Podíly ER, PR a c-ErbB-2 pozitivních a negativních nádorů přibližně odpovídají jejich procentnímu zastoupení, které je uváděno v literatuře.

### **4.3 Mutační analýza genu *ATM***

#### *4.3.1 Hereditární karcinom prsu*

U pacientek postižených hereditární formou karcinomu prsu byla pro prescreening mutací genu *ATM* použita PTT analýza, která slouží k zachycení mutací vedoucích k předčasné terminaci translace a ke zkrácení proteinu. Tyto inaktivující genové alterace tvoří minimálně 70% všech mutací (uvádí se 70 - 80%) detekovaných u pacientů s AT a představují alterace, u nichž není sporu o jejich patogenitě.

Ve skupině 161 vysoce rizikových pacientek byly v genu *ATM* nalezeny 4 mutace (2,8%) (Tabulka 13). Tyto alterace zahrnovaly jednu nonsense mutaci a 3 sestříhové mutace vedoucí k posunu čtecího rámce. Všechny měly za následek předčasné ukončení syntézy proteinu ATM.

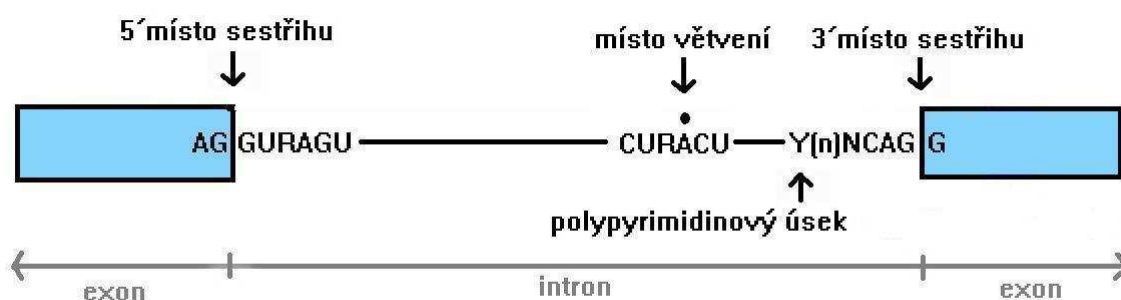


**Tabulka 13:** Mutace v genu ATM nalezené u vysoce rizikových pacientek.

Rodina č.	Mutace *	Předpokládaný efekt	Diagnóza (věk)	Nádory v rodině (věk)
410	c.5177+1G>A	Sestřih exonu 36, ter 1680	Bilaterální karcinom prsu (42, 44)	Pankreas (75), prs (64), prs (?)
116	c.5932G>T	E1978X	Bilaterální karcinom prsu (53,60), karcinom ovária (61)	Ovária (57), leukémie (?), ledvina (?), plíce (59)
96	c.6096-9delTTCTT	Sestřih exonu 44, ter 2032	Karcinom prsu (37)	Pankreas (73)
69	c.1066-6T>G	Sestřih exonu 11, ter 372	Karcinom prsu (32)	Prs (60), prs (?)

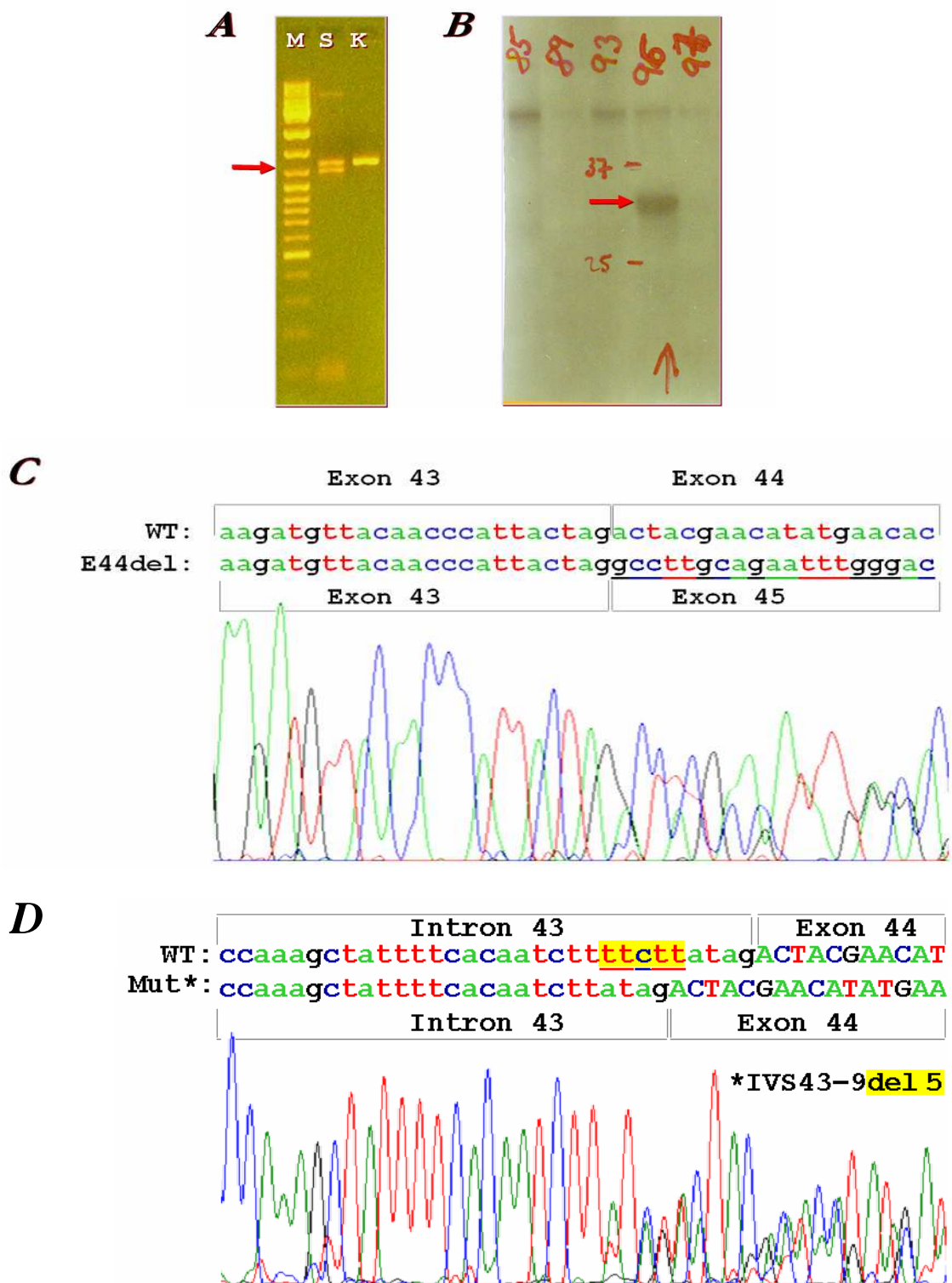
\* Pozice v cDNA odpovídá číslování sekvence # U33841 v databázi GenBank, přičemž +1 odpovídá A v iniciačním kodónu ATG.

Nonsense mutace c.5932G>T vede k předčasné terminaci translace na kodónu 1978 a byla popsána jako příčina AT [95]. Obrázek 15 ukazuje konzervativní struktury v intronech a vysvětluje účinky na genovou expresi u dalších genových alterací, které byly nalezeny.



**Obrázek 15:** Struktura intronu a přilehlých intron-exonových spojení s vyznačenými konzervativními úseky na konci intronových oblastí

Sestřihová mutace c.5177+1G>A (IVS36+1G>A) postihuje 5' místo sestřihu a vede k aberantnímu sestřihu exonu 36. Tato alterace nebyla dosud popsána, ale lze ji s vysokou pravděpodobností zařadit k patogenním mutacím způsobujícím AT (viz kapitola 4.3). Další sestřihová mutace c.6096-9delTTCTT (IVS43-9del15) vede k aberantnímu sestřihu exonu 44 v důsledku poškození konzervativního polypyrimidinového úseku, který se nachází v blízkosti 3' místa sestřihu (Obrázek 16). Tato mutace byla nalezena u pacienta s AT [95].



**Obrázek 16:** Mutace c.6096-9delTTCTT u pacientky číslo 96. **A.** Elektroforéza amplifikátu z cDNA zahrnujícího exon 44, M – marker, S – vzorek, K – kontrola, šipka ukazuje pozici PCR produktu s chybějícím exonem 44. **B.** Výsledek PTT analýzy, šipka ukazuje zkrácený proteinový produkt u pacientky číslo 96. **C.** Výsledek sekvenování cDNAs chybějícím exonem 44. **D.** Výsledek sekvenování DNA s delecí TTCTT.

Poslední detekovanou mutací byla c.1066-6T>G (IVS10-6T>G). Tato alterace zasahuje polypyrimidinový úsek v intronu 10 a vede k sestřihu exonu 11. Byla popsána u jednoho pacienta s AT v homozygotním stavu [67] a dále byla opakovaně detekována u pacientek s karcinomem prsu [68]. Její patogenita a význam při vzniku karcinomu prsu se v literatuře diskutuje [70]. V naší kontrolní skupině byla mutace c.1066-6T>G nalezena dvakrát (žena - 21 let, muž – 82 let) (1,1%) a byla jedinou alterací detekovanou pomocí PTT analýzy v této skupině.

U pacientek s mutacemi c.5177+1G>A a c.5932G>T byl diagnostikován bilaterální karcinom prsu a obě pacientky pocházely z rodin, kde byla zachycena řada malignit. U pacientky s mutací c.6096-9delTTCTT se vyvinul karcinom prsu před 40 rokem věku. U pacientky s alterací c.1066-6T>G byl diagnostikován karcinom prsu ve 32 letech a tato malignita se objevila i u dalších dvou příbuzných.

Tabulka 14 ukazuje výskyt mutací ve vztahu ke klasifikaci rizikových rodin.

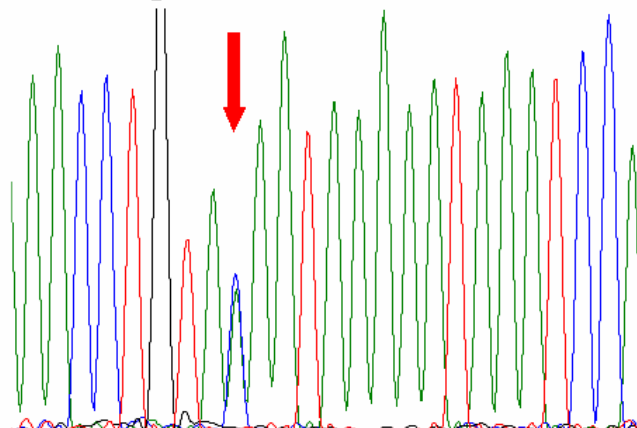
**Tabulka 14:** Četnost mutací ATM ve vztahu ke klasifikaci pacientek.

Klasifikace	# pacientek/ kontrol	# mutací mimo c.1066-6T>G (%)	c.1066-6T>G (%)
Pacientky s karcinomem prsu z HBC/HBOC rodin bez rodinného výskytu karcinomu prsu	114	2 (1.8)	1(0.9)
s bilaterálním karcinomem prsu do 50 let	5	0 (0)	0
s karcinomem prsu před 40 rokem	42	1 (2.4)	0
<b>Celkem</b>	<b>161</b>	<b>3 (1.9)</b>	<b>1 (0.6)</b>
Kontroly	183	0	2(1.1)

*HBC (hereditary breast cancer) – rodiny s výskytem karcinomu prsu, HBOC (hereditary breast and ovarian cancer) – rodiny s výskytem karcinomu prsu a ovária*

Prediktivní testování, zaměřené na detekci příslušné patogenní alely, bylo provedeno u dcery pacientky číslo 69. Byla provedena analýza intronu 10 a nalezena shodná mutace c.1066-6T>G (Obrázek 17).

WT: AAACctgtaaataaaaataaatcca  
MT: AAACctgta<sub>c</sub>aataaaaataaatcca



**Obrázek 17:** Prediktivní genetické vyšetření. WT – normální sekvence, MT – mutantní sekvence, šipka ukazuje mutaci c.1066-6T>G.

#### 4.3.2 Sporadický karcinom

Mutační analýza byla provedena u 15 sporadických karcinomů, u kterých byla detekována ztráta heterozygosity v lokusu *ATM* (viz kapitola 4.4.4). U těchto nádorů nebyla nalezena žádná inaktivující somatická mutace genu *ATM*.

### 4.4 Kvantitativní analýza sestřihových mutací

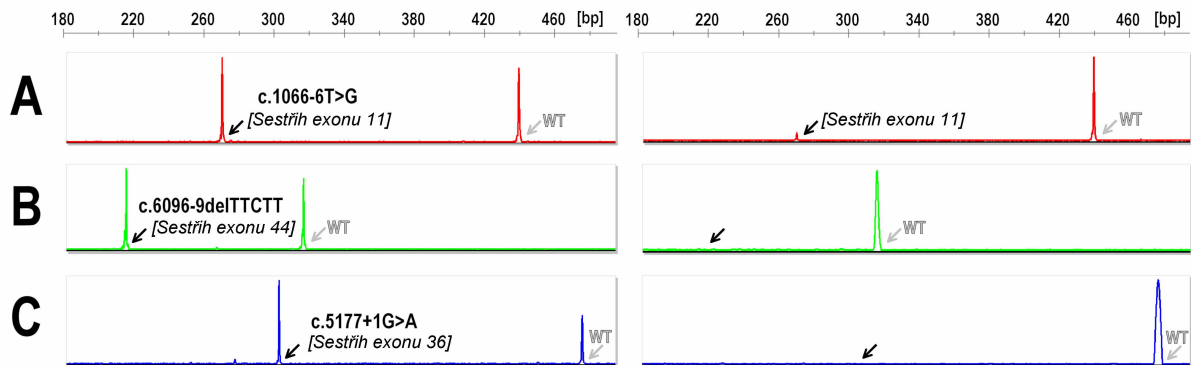
K charakterizaci účinku mutací zasahujících do sestřihových míst genu *ATM* jsme kvantitativně analyzovali vzorky RNA získané od pacientů s příslušnými mutacemi a od kontrol. Jako templát sloužila cDNA získaná z RNA periferních lymfocytů reverzní transkripcí. Úsek cDNA obsahující odpovídající exon jsme amplifikovali u pacientek s odpovídajícími mutacemi a u 10 zdravých kontrol. Amplifikaci jsme prováděli vždy v tripletu.

Fragmentační analýza u pacientky číslo 410 heterozygotní pro dosud nepopsanou mutaci c.5177+1G>A ukázala, že u 53,6% exprimované mRNA je exon 36 sestřižen a že tedy pouze 1 alela umožňuje vznik proteinu plné délky. Podobný výsledek jsme obdrželi i u pacientky číslo 96 nesoucí mutaci c.6096-9delTTCTT, která již byla popsána jako příčina AT. Zde zkrácený produkt s chybějícím exonem 44 odpovídal přítomnosti 47,2% sestřižené mRNA. U kontrol, které nenesly žádnou ze zmíněných mutací, nebyl zkrácený produkt detekován.

U jedinců (dvě kontroly a jedna pacientka s karcinomem prsu) heterozygotních pro mutaci c.1066-6T>G jsme detekovali 47-57% zkráceného produktu s chybějícím exonem 11 a

v nálezu u pacientky a kontrol nebyl významný rozdíl. Zkrácený produkt byl ovšem v menším množství (6 - 15%) přítomen i v lymfocytech všech zdravých kontrol, stejně jako ve vzorcích nádorové a nenádorové tkáně, kde nebyla detekována mutace c.1066-6T>G.

Obrázek 18 ukazuje výsledek fragmentační analýzy.



**Obrázek 18:** Kvantitativní analýza vzorků RNA u pacientek se sestříhovými mutacemi *ATM* a u zdravých kontrol. Černé šipky ukazují pozici zkrácených produktů, šedé šipky ukazují pozici transkriptu plné délky.

**A.** Vlevo pacientka s mutací c.1066-6T>G, vpravo kontrola

**B.** Vlevo pacientka s mutací c.6096-9delTTCTT, vpravo kontrola

**C.** Vlevo pacientka s mutací c.5177+1G>A, vpravo kontrola

#### 4.5 Analýza ztráty heterozygoty v lokusu *ATM*

Detekce výpadků alel genu *ATM* byla provedena pomocí analýzy ztrát heterozygoty jednoho intragenového a dvou přiléhajících mikrosatelitových markerů.

V DNA z periferní krve se po amplifikaci markeru buď detekuje jediná alela, pacient je pro daný marker homozygotní a marker je neinformativní (Obrázky 19 a 20A), nebo se v poměrně vysokém procentu případů jedná o heterozygota (tj. vzorek je informativní) se dvěma různými alelami. U nádorových vzorků těchto pacientů se prováděla analýza ztráty heterozygoty (Obrázky 19 a 20B).

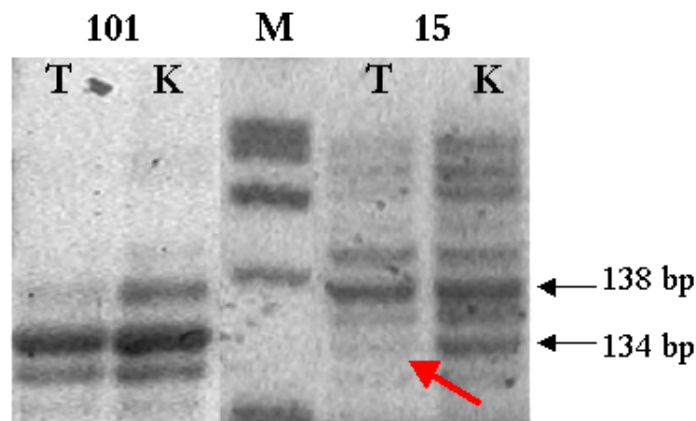
U všech pacientek byly v lokusu *ATM* analyzovány tři mikrosatelitové markery. Za vzorek s výpadkem alely byl považován nádor, u kterého byl alespoň jeden marker informativní a jeví ztrátu heterozygoty.

Pro analýzu byly použity dvě metody – elektroforéza na gelech Spreadex a fragmentační analýza na automatickém sekvenátoru Abi Prism 3130. Tyto metody byly

porovnány z hlediska jejich rychlosti, dostupnosti, technické a finanční náročnosti a možnosti přesné alelotypizace.

#### 4.5.1 Elektroforéza na gelech Spreadex

Metoda je jednoduchá, rychlá a finančně méně nákladná než fragmentační analýza. V našem provedení dovoluje analyzovat 50 dvojic vzorků DNA – vždy z nádorové a nenádorové tkáně - na jednom gelu během 3-5 hodin. Metoda však využívá specifickou elektroforetickou aparaturu. Elektroforetická analýza jako jediná umožňuje při vhodné volbě primerů a velikostního standardu přesné určení délek jednotlivých alel. Určení ztráty heterozygotity je však při použití této metody pouze vizuální. Pro objektivizaci proto byly elektroforeogramy posuzovány vždy dvěma osobami. Přítomnost přídatných PCR produktů, tzv. „stutter bandů“, zejména v případě markerů tvořených dinukleotidovou repeticí, významně znesnadňuje analýzu. Příklad analýzy je na obrázku 19.

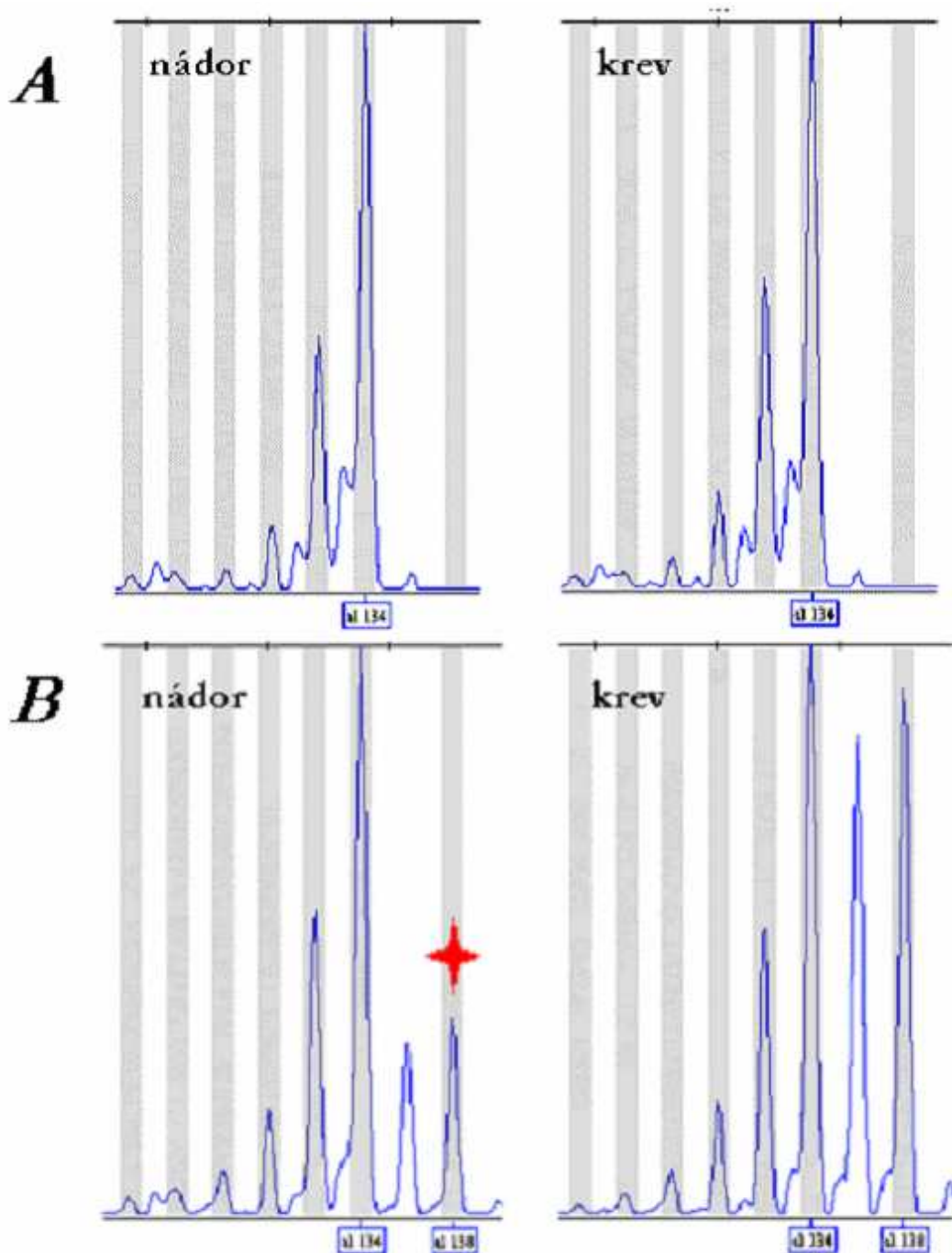


**Obrázek 19:** Příklad analýzy mikrosatelitového markeru D11S2179 na gelech Spreadex u nádorů číslo 101 a 15. T – nádorová tkáň, K – odpovídající krev, M – velikostní marker. Vzorek číslo 101 je neinformativní – je homozygotní pro alelu o velikosti 134 bp. Vzorek číslo 15 je heterozygotní s alelami o velikostech 134 a 138 bp. Šipka ukazuje delecí alely o 134 bp v nádorové tkáni.

#### 4.5.2 Fragmentační analýza na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130

Tato metoda je rychlá a jednoduchá na obsluhu. Nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje i náklady na provoz. Je třeba používat fluorescenčně značené primery. Ke každému vzorku je přidáván fluorescenčně značený velikostní standard a velikost analyzovaných fragmentů je softwarově dopočítána podle elučních časů, které jsou vztaženy k standardu. Přesto nelze přesně určit délku jednotlivých alel v důsledku rozdílné pohyblivosti fragmentů DNA o různém složení. Pomocí softwarového vybavení GeneMapper lze provést kvantitativní

vyhodnocení a objektivně určit ztrátu heterozygosity. Příklad analýzy je uveden na obrázku 20. Výstup a kvantitativní vyhodnocení analýzy je uvedeno v tabulce 15.



**Obrázek 20** : Fragmentační analýza mikrosatelitového markeru D11S2179.

**A.** Neinformativní vzorek (nádor číslo 101) – vzorek je pro tento marker homozygotní, **B.** Heterozygot (nádor číslo 14) s detekovanou ztrátou heterozygosity –LOH, hvězdička označuje výpadek alely, šedé pruhy ukazují pozici alel dosud identifikovaných v naší populaci.

**Tabulka 15:** Analýza mikrosatelitového markeru D11S2179 u vzorků číslo 14 a 101 pomocí programu GeneMapper, verze 4.0.

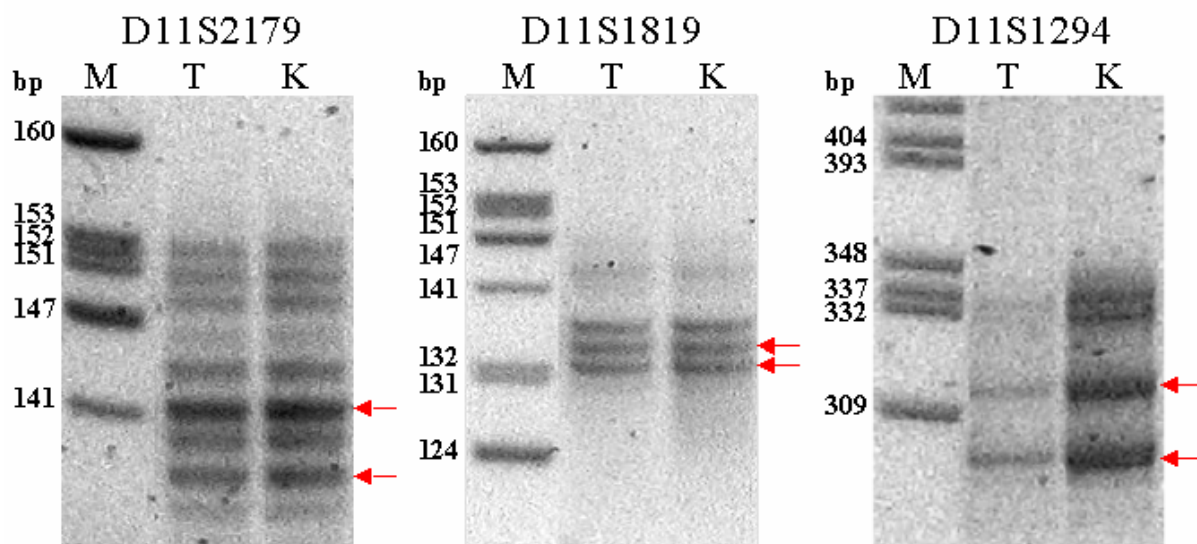
Sample	Marker	Peak 1	Allele 1-ht	Peak 2	Allele 2-ht	Allele Ratio	Allelic Imbalance	LOH Assessment
14 tumor	D11S2179	133.79	2404	137.59	2226	1,08		
14 blood	D11S2179	133.81	5694	137.6	1962	2,90	2,69	LOH Candidate
101 tumor	D11S2179	133.86	3224			Infinity		
101 blood	D11S2179	133.89	3674			Infinity	NaN	

V naší laboratoři je v současné době využívána především fragmentační analýza na automatickém sekvenátoru Abi Prism 3130.

#### 4.5.3 LOH analýza u nosiček mutací v genu ATM

Ztráta heterozygoty byla analyzována u 3 ze 4 pacientek s dědičnými mutacemi v genu *ATM* (číslo 69, 96 a 116), od kterých se podařilo získat vzorek nádorové tkáně zalitý v parafinu (kapitola 4.2.1). V jednom případě se jednalo o metastázu, ve dvou případech se jednalo o primární nádory.

Analýza všech tří mikrosatelitových markerů u těchto vzorků neprokázala ztrátu heterozygoty. Výsledek analýzy mikrosatelitových markerů u pacientky číslo 96 ukazuje obrázek 21. Výsledky shrnuje tabulka 16.



**Obrázek 21:** Analýza markerů D11S2179, D11S1819 a D11S1294 u pacientky číslo 96. M – velikostní marker, T – tumor, K – krev. Šipky ukazují polohu jednotlivých alel.



**Tabulka 16:** Analýza mikrosatelitových markerů u pacientek s mutacemi v genu *ATM*.

Pacient č.	D11S2179	D11S1819	D11S1294	LOH
69	He	He	He	Ne
96	He	He	He	Ne
116	He	He	Ho	Ne

*He* – heterozygot, *Ho* – homozygot.

#### 4.5.4 Ztráta heterozygotity u pacientů se sporadickým karcinomem prsu

Analýzovali jsme celkem 73 nádorů prsu. V této skupině jsou zastoupeny zejména oba nejběžnější histologické typy, a to invazivní duktální karcinom – 57 nádorů (78%) a invazivní lobulární karcinom - 9 nádorů (12,3%). V 72 informativních vzorcích jsme našli 15 případů výpadků alel genu *ATM* (20,8%), z toho 11 nádorů (73,3%) bylo invazivního duktálního typu, 2 nádory (13,3%) invazivního lobulárního typu, jeden byl invazivní lobuloduktální karcinom a jeden medulární karcinom. Ztráta heterozygotity v lokusu *ATM* byla tedy distribuována rovnoměrně mezi jednotlivými histologickými typy karcinomu prsu.

Heterozygotita použitých mikrosatelitových markerů v lokusu *ATM* byla vysoká. Největší stupeň heterozygotity vykazoval marker D11S2179 (97,2%), heterozygotita markerů D11S1819 a D11S1294 byla 80,6% a 81,9%. Nehodnocena (pro neinformativní markery) byla v lokusu *ATM* pouze jedna pacientka (1,4%).

U nádorů byla dále analyzována ztráta heterozygotity v lokusech *BRCA1/2* a *TP53* [78]. Tabulka 17 ukazuje četnost výpadků alel těchto genů. U 29 nádorů (39,7%) nebyl detekován LOH v žádném z testovaných lokusů.

**Tabulka 17:** Výsledek LOH analýzy genů *ATM*, *BRCA1/2* a *TP53* v našem souboru nádorů prsu.

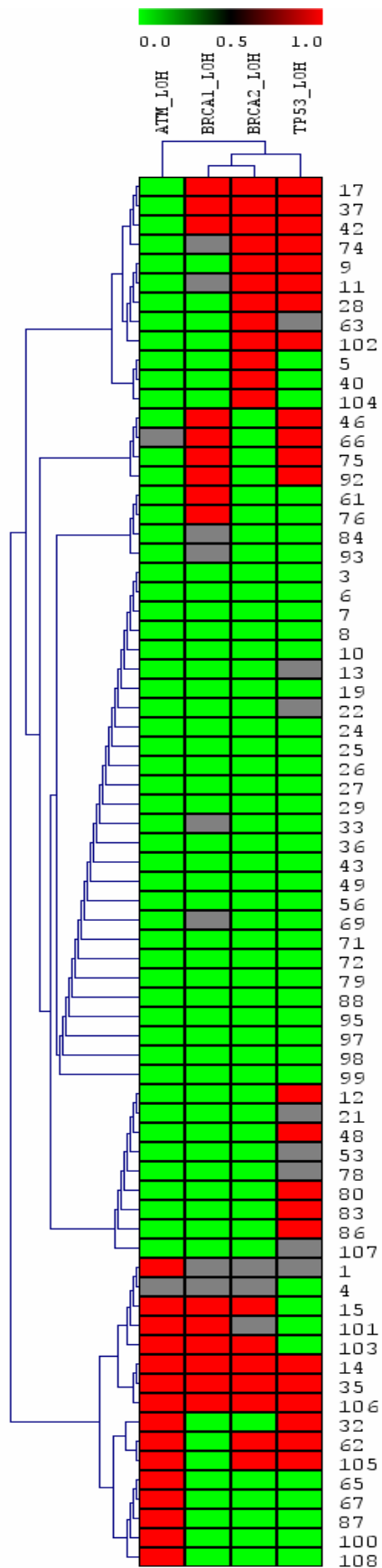
Gen	# informativních vzorků	# LOH	%
<i>ATM</i>	72	15	20,8
<i>BRCA1</i>	66	15	22,7
<i>BRCA2</i>	71	19	26,8
<i>TP53</i>	66	23	34,8

Tabulka 18 charakterizuje nádory s výpadkem alely *ATM*.

**Tabulka 18:** Nádory s výpadkem alely *ATM* a jejich charakteristika.

#	Histol. typ	Grade	ER	PR	erbB2	Ki-67	<i>ATM</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>TP53</i>
1	IDLC	1	+	+	-	-	LOH	neinf	neinf	neinf
14	IDC	3	-	+	-	+	LOH	LOH	LOH	LOH
15	IDC	2	+	+	-	-	LOH	LOH	LOH	ne
32	IDC	2	+	+	-	-	LOH	ne	ne	LOH
35	IDC	1	+	+	-	-	LOH	LOH	LOH	LOH
62	ILC	neurčeno	+	+	-	+	LOH	ne	LOH	LOH
65	ILC	neurčeno	+	-	-	-	LOH	ne	ne	ne
67	MC	neurčeno	-	-	-	+	LOH	ne	ne	ne
87	IDC/DCIS	2/2	-	+	-	-	LOH	ne	ne	ne
100	IDC/DCIS	2/2	+	+	-	-	LOH	ne	ne	ne
101	IDC/DCIS	2/3	+	+	-	+	LOH	LOH	neinf	ne
103	IDC	1	+	+	-	-	LOH	LOH	LOH	ne
105	IDC	1	+	+	-	0	LOH	ne	LOH	LOH
106	IDC	3	+	+	-	0	LOH	LOH	LOH	LOH
108	IDC	1	+	+	-	0	LOH	ne	ne	ne

Údaje o ztrátě heterozygosity a histopatologické údaje byly zpracovány za použití programu TIGR MultipleExperimentViewer v.4.0, který je volně dostupný na [http://www.tigr.org/software/tm4/menu/TM4\\_Biotechniques\\_2003.pdf](http://www.tigr.org/software/tm4/menu/TM4_Biotechniques_2003.pdf) [96]. Analýza je založena na porovnávání korelačních koeficientů. Data byla podrobena analýze hierarchického klastrování (HCL), která klasifikuje nasbíraná data do podskupin (klastřů) podle podobnosti nasbíraných dat. Pro posouzení podobnosti dat byl zvolen výpočet dle Euclideanovského modelu pro měření vzdáleností jednotlivých bodů. Distancí mezi dvěma podskupinami byl označen vážený průměr vzdáleností všech bodů jednoho klastru vůči všem bodům dalšího klastru. Na obrázku 22 je výsledek této analýzy ukazující možné souvislosti mezi porovnávanými parametry a na jejich základě i příbuznost analyzovaných vzorků. Pomocí této analýzy byly vzorky rozděleny do dvou hlavních skupin, které se lišily výpadkem alely v lokusu *ATM*.



**Obrázek 22:** Klastrování nádorů na základě přítomnosti (červená) nebo nepřítomnosti (zelená) LOH u testovaných genů pomocí softwaru TIGR MultipleExperimentViewer, neinformativní vzorky pro určitý lokus jsou označeny šedě.

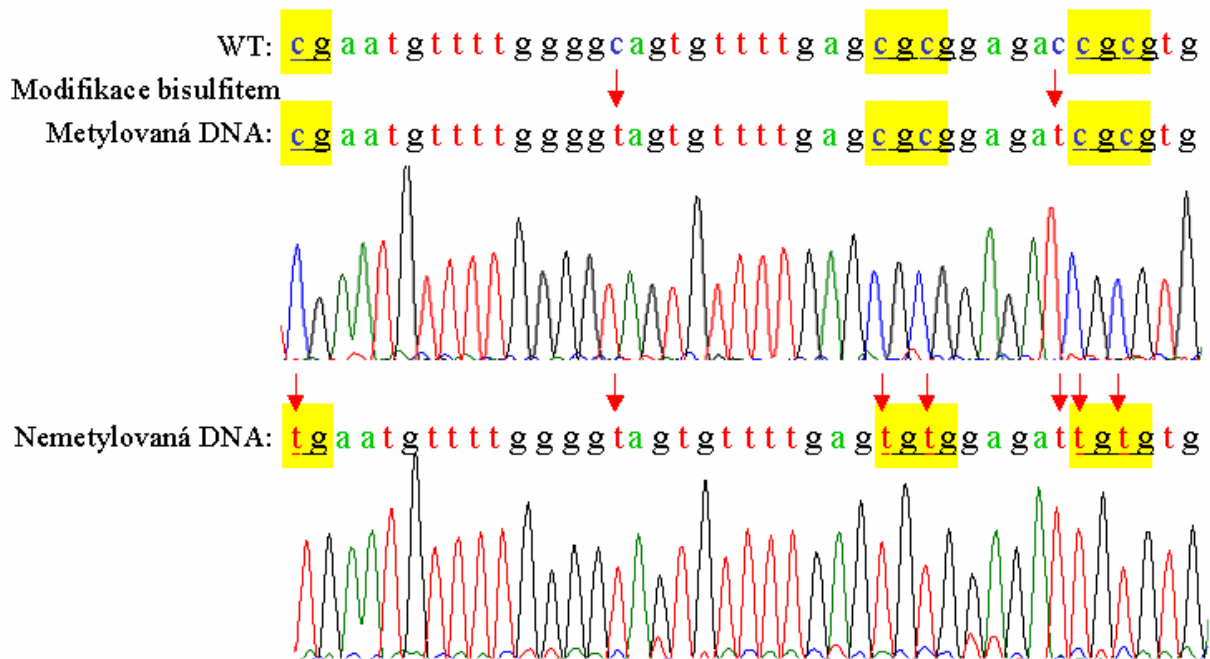
#### 4.6 Analýza metylace promotoru genu *ATM*

Analýza metylace promotoru genu *ATM* byla provedena pomocí dvou metod – bisulfitového sekvenování a MS-MLPA - založených na zcela odlišných principech detekce. Tyto metody byly porovnány z hlediska jejich dostupnosti a efektivity.

##### 4.6.1 Bisulfitové sekvenování

Tato metoda umožňuje analyzovat metylaci CpG dinukleotidů celého promotoru, neumožňuje však metylaci v těchto oblastech kvantifikovat. Metoda má nižší senzitivitu než MS-MLPA. Nevýhodou je potřeba relativně velkého množství genetického materiálu pro úvodní modifikaci DNA. Navíc modifikace DNA bisulfitem probíhá za podmínek vysokého pH, což může vést k částečné degradaci DNA.

Obrázek 23 ukazuje výsledek bisulfitového sekvenování části promotoru *ATM* univerzálně metylované a nemetylované DNA.



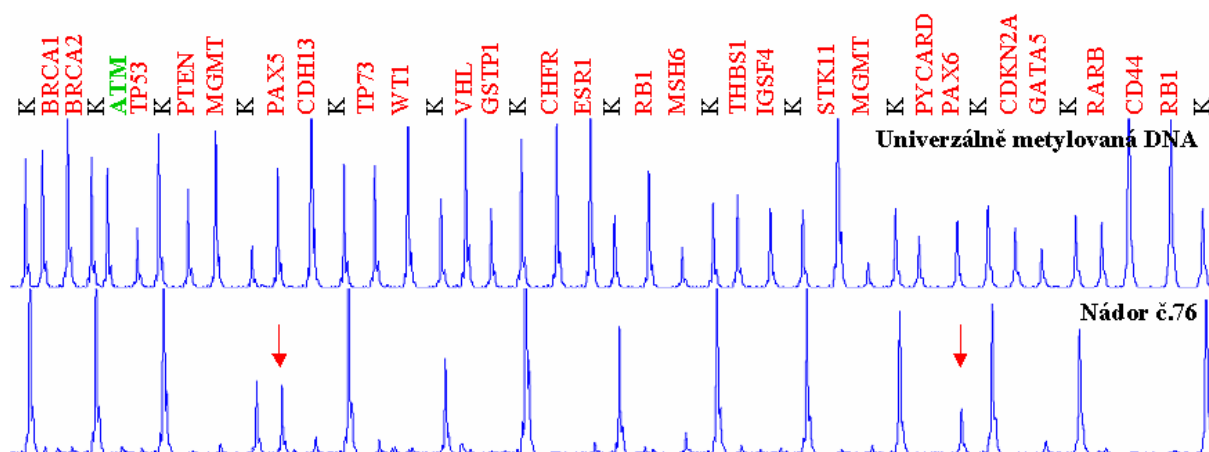
**Obrázek 23:** Analýza metylace promotoru *ATM* u metylované a nemetylované DNA. WT – sekvence DNA před modifikací, šipky ukazují místa modifikace, dinukleotidy CpG jsou zvýrazněny žlutě.

##### 4.6.2 MS-MLPA

Tato metoda je citlivější, jednodušší, ale finančně nákladnější než bisulfitové sekvenování. Umožňuje analyzovat a kvantifikovat stav metylace v promotorech 24, respektive 25 genů už z 20 ng DNA (my jsme používali 90 ng DNA). Nevýhodou je

skutečnost, že analyzuje stav metylace pouze v sekvenci CGCG, která odpovídá restriktivnímu místu metylačně senzitivní endonukleázy HhaI.

Výsledek analýzy univerzálně metylované a nádorové DNA (vzorek číslo 76) pomocí MS-MLPA ukazuje obrázek 24. Postupem uvedeným v kapitole 3.10.2 byla v nádorové DNA zjištěna metylace 29,9% genu *PAX5* a 39,6% genu *PAX6*.



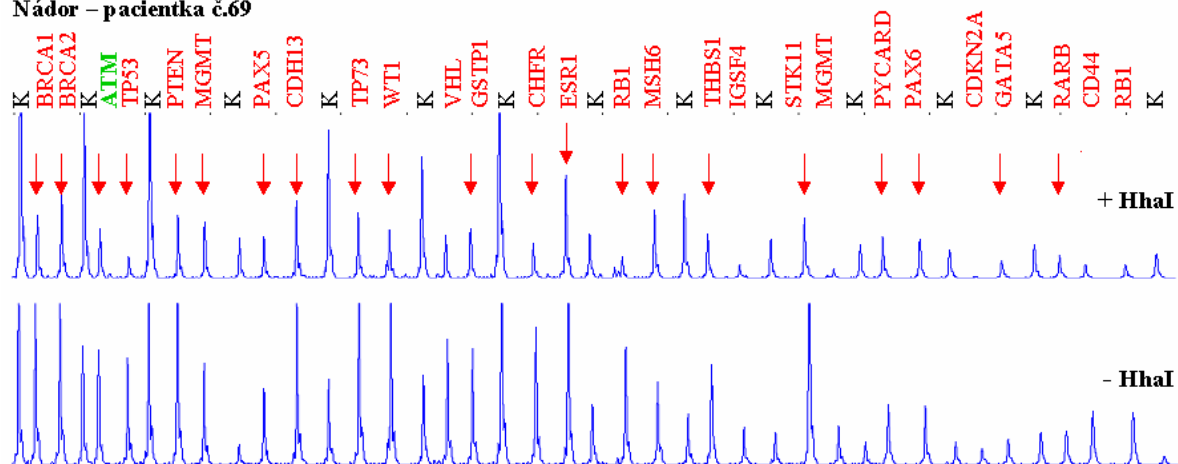
**Obrázek 24:** MS-MLPA (ME002) u univerzálně metylované DNA a nádoru číslo 76. Obrázek ukazuje pouze výsledek reakce s přidanou metylačně senzitivní endonukleázou HhaI. K – kontrola. Šipky u nádoru číslo 76 ukazují křivky, které odpovídají metylovaným promotorům genů *PAX5* a *PAX6*.

V současné době provádíme v naší laboratoři analýzu metylace promotorů genů *ATM*, *BRCA1* a *BRCA2* pomocí MS-MLPA i bisulfitovým sekvenováním, protože se tyto metody vzájemně doplňují.

#### 4.6.3 Analýza metylace promotorové sekvence u nosiček mutací genu *ATM*

Metylace promotoru byla analyzována u 3 nosiček mutací genu *ATM*, od kterých byly k dispozici parafinové bločky nádorové tkáň (vzorek č. 69 pocházel z metastázy u karcinomu prsu). Bisulfitovým sekvenováním nebyla nalezena hypermetylace ani v jednom ze tří testovaných vzorků. Analýza však byla velmi obtížná kvůli špatné kvalitě genetického materiálu, což se projevilo zejména u vzorku číslo 69 (Obrázek 14). Analýza pomocí MS-MLPA nečinila obtíží (částečná fragmentace DNA analýzu nekomplikuje) a metylace testovaného úseku promotoru *ATM* dosahovala u DNA číslo 69 27,7%. U tohoto vzorku však byla nalezena hypermetylace ve 21 z 27 sekvencí CGCG lokalizovaných v promotorech 25 testovaných genů (Obrázek 25). Naproti tomu v nádorech pacientek číslo 96 a 112 byly hypermetylace detekovány v 5 a 2 testovaných promotorových sekvencích. Výsledky analýz metylace u nosiček zárodečných mutací v genu *ATM* ukazuje tabulka 19.

**Nádor – pacientka č.69**



**Obrázek 25:** Analýza metylace (ME002) u metastázy invazivního duktálního karcinomu pacientky číslo 69. Šipky ukazují křivky, které odpovídají metylovaným promotorům.

**Tabulka 19:** Analýza metylace promotorových sekvencí 25 genů u nosiček zárodečných mutací genu ATM.

Promotor genu:	Methylace promotoru (%) u pacientky:		
	Pacientka č. 69	Pacientka č. 96	Pacientka č. 116
BRCA1	16,3	0	0
BRCA2	19,8	0	0
ATM	27,7	0	0
TP53	19,4	0	0
PTEN	25,1	0	0
MGMT	33,9	0	0
PAX5	43,0	14,7	30,2
CDH13	16,6	10,2	0
TP73	25,5	0	0
WT1	27,5	20,1	0
VHL	8,9	0	0
GSTP1	26,0	0	0
CHFR1	12,3	0	0
ESR1	25,0	10,8	0
RB1	12,7	0	0
MSH6	68,8	20,3	0
THBS1	29,8	0	0
IGSF4	0	0	0
STK11	11,2	6,7	0
MGMT	0	0	0
PYCARD	42,7	0	0
PAX6	53,0	0	0
CDKN2A	0	0	0
GATA5	37,3	0	0
RARB	49,6	0	0
CD44	7,6	0	58,3
RB1	7,3	5,7	7,1

Červeně jsou vyznačeny promotory s aberantní metylací, zeleně pak promotory vyhodnocené jako nemetylované.

#### 4.6.4 Analýza metylace promotoru genu ATM u sporadického karcinomu prsu

Metylace byla vyšetřena u 71 sporadických karcinomů prsu (viz kapitola 4.4.4). Bisulfitovým sekvenováním ani metodou MS-MLPA nebyla zjištěna metylace promotoru genu ATM u žádného vzorku. Výsledky analýzy metylace v dalších lokusech získané pomocí MS-MLPA ukazují tabulky 20 a 21.

**Tabulka 20:** Analýza metylace promotorových sekvencí (ME002) u sporadického karcinomu prsu.

vzorek	BRCA1	BRCA2	ATM	TP53	PTEN	MGMT	PAX5	CDH13	TP73	WT1	VHL	GSTP1	CHFR1	ESR1	RB1	MSH6	THBS1	IGSF4	STK11	MGMT	PYCARD	PAX6	CDKN2A	GATA5	RARB	CD44	RB1
1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
10	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
17	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
25	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
26	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
29	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
32	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

*Tabulka 20-pokračování*

vzorek	BRCA1	BRCA2	ATM	TP53	PTEN	MGMT	PAX5	CDH13	TP73	WT1	VHL	GSTP1	CHFR1	ESR1	RB1	MSH6	THBS1	IGSF4	STK11	MGMT	PYCARD	PAX6	CDKN2A	GATA5	RARB	CD44	RB1
46	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
66	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
67	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
72	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
80	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
87	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
102	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
103	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Σ	3	0	0	2	1	11	48	32	8	55	0	11	5	4	2	21	7	3	0	16	1	16	1	13	7	6	0
%	4	0	0	3	1	15	68	45	11	77	0	15	7	6	3	30	10	4	0	23	1	23	1	18	10	8	0



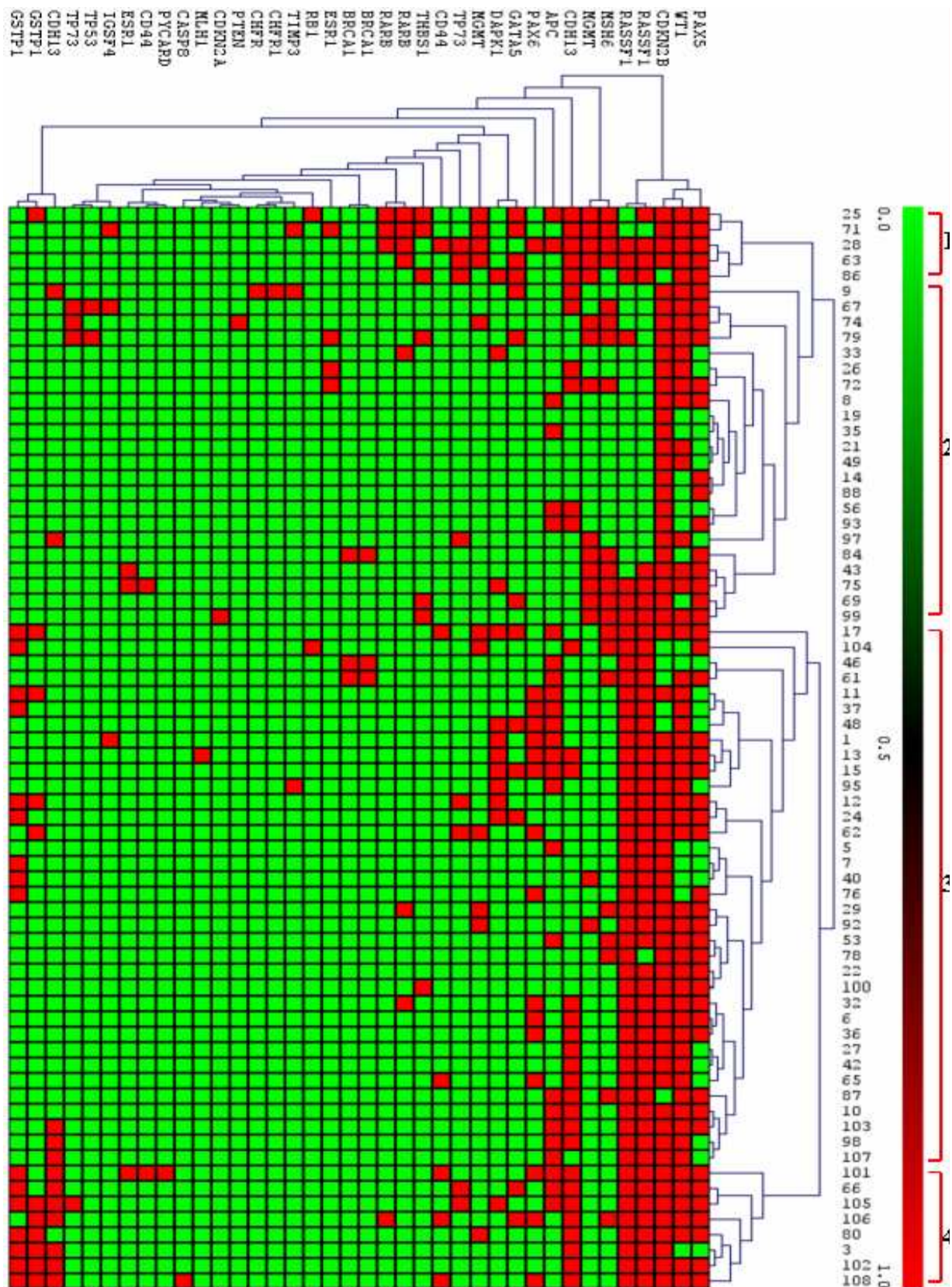
**Tabulka 21:** Analýza metylace promotorových sekvencí (ME001) u sporadického karcinomu prsu

vzorek	TIMP3	APC	CDKN2A	MLH1	ATM	RARB	CDKN2B	HIC1	CHFR1	BRCA1	CASP8	CDKN1B	PTEN	BRCA2	CD44	RASSF1	DAPK1	VHL	ESR1	RASSF1	TP73	FHIT	IGSF4	CDH13	GSTP1	MLH1
1-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
5-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
7-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
8-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
10-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
11-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
12-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
13-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
17-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
19-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
24-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
25-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
28-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
29-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
32-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
33-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
37-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
40-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
42-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
43-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
46-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
48-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
49-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
56-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
62-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
63-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
65-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
66-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
67-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
69-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

**Tabulka 21-pokračování**

Vzorek	TIMP3	APC	CDKN2A	MLH1	ATM	RARB	CDKN2B	HIC1	CHFR1	BRCA1	CASP8	CDKN1B	PTEN	BRCA2	CD44	RASSF1	DAPK1	VHL	ESR1	RASSF1	TP73	FHIT	JGSF4	CDH13	GSTP1	MLH1	
71+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
75-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
76-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
78-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
79-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
80-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
84-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
87-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
88-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
93-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
97-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
98-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
99-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
100-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
101-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
102-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
103-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
104-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
105-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
106-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
107-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
108-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Σ	3	26	1	1	0	4	63	0	1	3	1	0	0	0	2	50	12	0	3	49	4	0	0	12	16	0	
%	4	37	1	1	0	6	89	0	1	4	1	0	0	0	3	70	17	0	4	69	6	0	0	17	23	0	

Nejčastěji metylované geny byly *CDKN2B* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B) (89%), *WT1* (Wilms tumor 1) (79%), *PAX5* (69%) a *RASSF1* (Ras-associated domain family 1) (2 sondy, 69 a 70%). Nejčastěji bylo metylováno 7 testovaných sekvencí CGCG (medián = 7, průměr = 7,43). Údaje o stupni metylace DNA byly zpracovány softwarem TIGR Multiple Experiment Viewer, verze 4.0 (Obrázek 26).



**Obrázek 26:** Klastrování sporadických karcinomů prsu – zpracováno na základě přítomnosti (červená) nebo nepřítomnosti (zelená) metylace v promotorové sekvenci testovaných genů pomocí softwaru TIGR MultipleExperimentViewer.

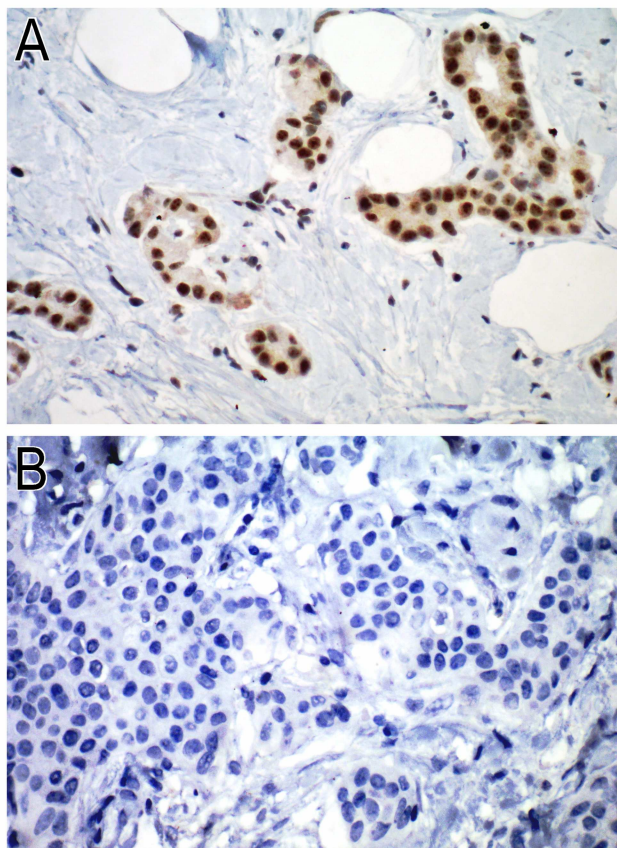
Pomocí programu TIGR Multiple Experiment Viewer byly nádory v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti metylace v testovaných úsecích DNA rozděleny do 4 skupin (Obrázek 26). Tyto skupiny se lišily jak metylací určitých genů, tak i počtem metylovaných testovaných promotorových sekvencí. Například ve druhé skupině nádorů jsme zpravidla nedetekovali metylaci v promotorové oblasti genu *RASSF1*, ve čtvrté skupině nádorů byla naopak nalezena metylace v promotorové oblasti genů *CDH13* a *GSTP1*. U první skupiny bylo metylováno 14 analyzovaných dinukleotidů CGCG, u druhé skupiny 4,5, u třetí 7 a u čtvrté 11,5 vyšetřovaných oblastí (vždy je uveden medián). Nejčastěji metylované geny *CDKN2B*, *WT1*, *PAX5* a *RASSF1* byly sdruženy v jednom klastru.

#### **4.7 Imunohistochemická analýza proteinu ATM**

Byla provedena imunohistochemická analýza proteinu ATM v parafinových řezech nádorů pomocí protilátky specifické k C-konci proteinu.

##### *4.7.1 Imunohistochemická analýza u nosiček hereditárních mutací v genu ATM*

Vzorky nádorové tkáně byly získány od tří nosiček mutací v genu *ATM* a ani u jednoho z nich nebyla prokázána přítomnost proteinu ATM. Naopak v nádorové tkáni od pacientek bez mutace v *ATM* byl tento protein exprimován (Obrázek 27)



**Obrázek 27:** *Imunohistochemická analýza v řezech nádorové tkáně pacientek s karcinomem prsu, u nichž nebyla prokázána mutace v genu ATM (A) a u nosiček mutací tohoto genu (B).*

#### *4.7.1 Imunohistochemická analýza u sporadického karcinomu prsu*

Expres proteinu ATM byla imunohistochemicky vyšetřena u 46 vzorků sporadického karcinomu prsu (tabulka 22).

Expres proteinu ATM byla snížena téměř ve všech vyšetřovaných nádorech, přičemž procentní zastoupení nádorových buněk exprimujících tento protein se u jednotlivých vzorků výrazně lišilo. LOH analýza nepotvrdila snížení exprese proteinu ATM v nádorových vzorcích s výpadky alel.

**Tabulka 22: Imunohistochemická analýza ATM u vzorků karcinomu prsu**

Vzorek číslo	% nádorových buněk exprimující protein ATM	LOH	Vzorek číslo	% nádorových buněk exprimující protein ATM	LOH
1	sl. 70-80%	LOH	56	-	ne
3	sl. a stř. 80-90%	ne	61	sl. a stř. 80-90%	ne
4	-	ne	62	stř. a sil. 80-90%	LOH
5	sl. a stř. 10-20%	ne	63	0%	ne
6	sl. oj. stř. 60-70%	ne	65	sl. a stř. 50-60%	LOH
7	sl. a stř. 10-20%	ne	66	sl. a stř. 70-80%	ne
8	-	ne	67	sl. oj. stř. 20-30%	LOH
9	-	ne	69	-	ne
10	-	ne	71	-	ne
11	-	ne	72	stř. a sil. téměř 100%	ne
12	-	ne	74	sl. a stř. 50-60%	ne
13	sl. 65-75%	ne	75	sl. oj. stř. 30-40%	ne
14	stř. asi 10%	LOH	76	sl. a stř. 30-40%	ne
15	sl. 65-75%	LOH	78	sl.<10%	ne
17	sl. a stř. 60-70%	ne	79	sl. a stř. 20-30%	ne
19	sl. a stř. asi 10%	ne	80	sl. oj. stř. 25-35%	ne
21	sl.<10%	ne	83	0%	ne
22	-	ne	84	-	ne
24	sl. a stř. 80-90%	ne	86	sl. 10%	ne
25	sl. 40-50%	ne	87	sl. oj. stř. 10-15%	LOH
26	sl.30-40%	ne	88	sl. oj. stř. 70-80%	ne
27	-	ne	92	-	ne
28	sl.<10%	ne	93	-	ne
29	-	ne	95	sl.<10%	ne
32	sl. oj. stř. 25-35%	LOH	97	-	ne
33	sl. a stř. 60-70%	ne	98	sl. a stř. 40-50%	ne
35	stř. a sil. 70-80%	LOH	99	sl. 10-15%	ne
36	sl. 30-40%	ne	100	sl. a stř. 20-30%	LOH
37	sl. a stř. asi 10%	ne	101	sl.<10%	LOH
40	sl. a stř. 10-20%	ne	102	sl. a stř. 30-40%	ne
42	sl.<5%	ne	103	sl. a stř. 40-50%	LOH
43	sl. 25-35%	ne	104	-	ne
46	-	ne	105	-	LOH
48	-	ne	106	-	LOH
49	sl. a stř. asi 10%	ne	107	-	ne
53	-	ne	108	-	LOH

Sl.-slabě, stř. – středně, sil. – silně, oj – ojediněle exprimovaný protein ATM. - - nebylo vyšetřováno.

## 5. DISKUZE

### 5.1 *ATM* a hereditární karcinom prsu

#### 5.1.1 Mutační analýza genu *ATM*

Ve skupině 161 vysoce rizikových pacientek pocházejících z rodin s hereditárním zatížením nebo postižených časným karcinomem prsu, z nichž žádná nebyla nosičkou mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1/2* [94], jsme detekovali 3 patogenní mutace v genu *ATM* (1,9%). Naproti tomu ve skupině 183 kontrol nebyla v tomto genu nalezena žádná patogenní mutace. Pro screening genových defektů byla použita PTT analýza, která slouží k zachycení alterací vedoucích ke zkrácení proteinu. Tyto alterace jsou v homozygotním stavu příčinou většiny případů (alespoň 70%) onemocnění ataxia telangiectasia [15,16] a je tedy, narozdíl od missense mutací, jasná jejich patogenita. Četnost mutací v genu *ATM* vedoucích ke vzniku zkráceného proteinu, které byly identifikovány v našem souboru je srovnatelná s jejich výskytem ve Velké Británii (9/443, 2,0%) [62] a Rakousku (4/270, 1,5%) [61]. Nicméně rozdíl v četnosti mutací spojených s AT v souboru pacientek s karcinomem prsu a v kontrolní skupině nebyl statisticky významný ( $P=0,0645$ ). Předběžné výsledky našich dalších analýz ukazují, že příčinou byla nedostatečná velikost souboru rizikových rodin, který jsme mohli v dané době vyšetřit.

Byla popsána jedna nová mutace genu *ATM* - c.5177+1G>A. Jedná se o mutaci, která zasahuje 5' místo sestříhu v intronu 36 a vede k posunu čtecího rámce a zkrácení proteinu. Pomocí kvantitativní analýzy bylo prokázáno, že zkrácený transkript s chybějícím exonem 36 představuje u pacientky s touto mutací v heterozygotním stavu přibližně 50% mRNA. Zároveň bylo prokázáno, že se takto zkrácené transkripty nevyskytují u zdravých kontrol. Lze tedy předpokládat, že mutace c.5177+1G>A může být příčinou AT a patří k alteracím genu *ATM*, které u heterozygotních nosiček zvyšují riziko vývoje karcinomu prsu. Podobné výsledky byly získány i v případě už popsané patogenní mutace c.6096-9delTTCTT. Dále jsme detekovali nonsense mutaci c.5932G>T, která již byla popsána jako příčina AT [95].

Dále jsme detekovali sestříhovou variantu c.1066-6T>G – jednou v souboru pacientek s karcinomem prsu (1/161, 0,6%) a dvakrát ve skupině kontrol (2/183, 1,1%). Podobné výsledky byly publikovány i v rozsáhlé studii Szabo *et al.* [70], kde byla četnost této alterace u pacientek s karcinomem prsu 0,8% (8/961) a u kontrolní skupiny 0,7% (4/543). Podobně ani ve studii Bernstein *et al.* [97] nebyla nalezena asociace mezi mutací c.1066-6T>G a

karcinomem prsu. Alterace c.1066-6T>G vede k sestřihu exonu 11 a ke zkrácení proteinu ATM. K sestřihu exonu 11 však v menší míře dochází i v buňkách s normální sekvencí genu *ATM* (zkrácený transkript představuje přibližně 10% *ATM* mRNA), a to jak v lymfocytech tak i u karcinomu prsu či okolní nenádorové tkáni. Je ovšem otázkou, jaký je význam této varianty sestřihu vyskytující se i v nepřítomnosti mutace genu *ATM*. Výše zmíněné výsledky spíše ukazují na to, že varianta c.1066-6T>G nezvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu. Na druhé straně, jedinci nesoucí c.1066-6T>G v heterozygotním stavu exprimují okolo 50% zkráceného transkriptu podobně jako je tomu v případě jasně patogenní mutace c.6096-9delTTCTT. Velmi rozporuplná je i role c.1066-6T>G u AT. Přestože tato sekvenční varianta představuje nejčastější alteraci v genu *ATM*, doposud byla nalezena pouze u jednoho pacienta s AT. Jednalo se o homozygota s mutací c.1066-6T>G postihující obě alely [67].

Mutace c.1066-6T>G byla rovněž nalezena u dospělé příbuzné (dcera, 21 let) pozitivně testované pacientky číslo 69. Ikdyž, jak vyplývá z výše uvedeného, nelze v tomto případě určit riziko onemocnění, byla nosička mutace zařazena do programu dispenzarizace zaměřené na prevenci či časnou detekci nádorového onemocnění. Při preventivním sledování by měla být pokud možno vyloučena rtg vyšetření.

### 5.1.2 Analýza nádorové tkáně u nosiček mutací v genu *ATM*

Buňky získané od AT heterozygotů vykazují zvýšenou chromozomovou instabilitu a zvýšenou radiosenzitivitu [98,99]. To naznačuje, že haploinsuficience může být spouštěcím mechanismem procesu tumorigeneze. Na druhou stranu v lokusu *ATM* byla nalezena vysoká frekvence LOH [74] a to spíše podporuje klasickou Knudsonovu hypotézu, která říká, že pro výpadek funkce tumorsupresorového genu je nutná inaktivace obou jeho alel. Proces inaktivace alel je ovšem v případě *ATM* neznámý. Vzhledem k tomu, že imunohistochemická analýza prokázala u nosiček dědičných mutací absenci proteinu ATM, předpokládáme, že v nádorových buňkách dochází k inaktivaci obou alel. V nádorové DNA jsme se po potvrzení dané mutace zaměřili na průkaz inaktivace druhé alely na základě detekce ztráty heterozygoty či metylace CpG ostrůvků v promotoru *ATM*. V žádném vzorku nebyl nalezen výpadek druhé alely. Metylace promotoru *ATM* byla prokázána jen u vzorku od pacientky číslo 69 nesoucí mutaci c.1066-6T>G. Od této pacientky nebyla k dispozici tkáň primárního nádoru, ale pouze tkáň z metastázy, v níž byla detekována metylace ve 21 z 27 testovaných úseků CGCG lokalizovaných ve 25 genech. U vzorku číslo 96 byla nalezena metylace v 7, u čísla 116 pak ve 3 testovaných úsecích DNA. Metylace promotoru tedy pravděpodobně není častým způsobem inaktivace druhé alely u nosiček dědičných patogeních mutací v *ATM*.



Hypermetylace *ATM* v nádorové tkáni pacientky číslo 69 pravděpodobně souvisí s pokročilým stádiem onemocnění. Hypermetylace může být způsobena zvýšenou expresí *de novo* DNA-metyltransferázy 3 (obou izoform Dnmt3a i Dnmt3b), která je v nádorech častá [100-102]. Hypermetylace může vést ke zvýšení nestability genomu nádorové buňky a získání selekční výhody způsobující stimulaci růstu.

Způsob inaktivace druhé alely v nádorech s hereditární mutací genu *ATM* se nám nepodařilo odhalit. Mohla by být způsobena somatickou mutací druhé alely, ale mutační analýzu celého genu jsme nemohli provést kvůli nedostatku geneckého materiálu izolovaného z tkáně fixované v parafinu a velikosti genu *ATM*. Další příčiny absence proteinu mohou být například přestavby v promotorové oblasti nebo represe na úrovni RNA.

## 5.2 *ATM* a sporadický karcinom prsu

### 5.2.1 Popis souboru

Ke genetickému vyšetření byla získána nádorová tkáň a odpovídající referenční nenádorová tkáň (periferní krev, v některých případech i okolní tkáň) od neselektovaných pacientek s karcinomem prsu. Zastoupení hlavních histologických typů karcinomů ve vyšetřované skupině přibližně odpovídalo jejich výskytu v populaci [5].

V naší skupině 73 sporadických karcinomů jsme analyzovali inaktivaci tumorsupresorového genu *ATM* na základě ztráty heterozygosity, přítomnosti somatické mutace či hypermetylace promotorové oblasti.

### 5.2.2 Analýza ztrát heterozygosity v lokusu *ATM*

Výpadky alel *ATM* jsme detekovali na základě průkazu ztráty heterozygosity (LOH) vysoce polymorfních mikrosatelitových markerů lokalizovaných intragenově nebo v blízkosti genu *ATM*. Sekvence jednotlivých primerů byly převzaty z databáze The Genome Database <http://www.gdb.org/>.

V naší studii jsme zaznamenali LOH v lokusu *ATM* u 20,8% nádorů, což je výrazně více než uváděná pravděpodobnost náhodné ztráty alely (~5%) [73]. I další práce identifikovaly ztrátu heterozygosity u významné části sporadických karcinomů prsu [73,74]. Nalezené výsledky tedy svědčí o úloze genu *ATM* při vývoji sporadického karcinomu prsu. Četnost ztrát alel byla v lokusu *ATM* nižší než v případě genů *BRCA1* (22,7%), *BRCA2* (26,8%) a *TP53* (34,8%). Na základě klastrové analýzy vycházející z údajů o ztrátě heterozygosity a histopatologických údajů (údaje byly zpracovány LOH analýz s

histologickým typem a gradem nádorů) lze usuzovat na častý souběh v inaktivaci genů *BRCA1*, *BRCA2* a *TP53*. Naproti tomu, LOH v genu *ATM* se zřejmě vyskytuje v odlišné skupině karcinomů prsu. Z toho lze usuzovat, že tumorsupresorové geny *BRCA1*, *BRCA2* a *TP53* se uplatňují v jedné dráze tumorogeneze, zatímco *ATM* v jiné.

Karcinomy prsu, u nichž byly prokázány výpadky alely *ATM*, nelze na základě histopatologické klasifikace nebo receptorového statutu (exprese ER a PR) odlišit od ostatních karcinomů prsu. Vyjímkou ze sledovaných parametrů je exprese proteinu c-ErbB-2. Všechny nádory s LOH v lokusu *ATM* byly c-ErbB-2 negativní, zatímco v celkovém souboru bylo negativních pouze 65,8%.

### 5.2.3 Mutační analýza genu *ATM*

U nádorů jevících ztrátu heterozygoty jsme provedli mutační analýzu genu *ATM*. Spektrum dosud objevených hereditárních mutací zasahujících celou kódující oblast genu je velice široké. Protože většina těchto mutací vede ke zkrácení proteinového produktu, prováděli jsme prescreening mutací metodou PTT. V souboru 15 nádorů s výpadkem alely v genu *ATM* jsme nedetekovali žádnou somatickou mutaci.

Přes poměrně vysoké procento nehereditárních karcinomů prsu se ztrátou heterozygoty v lokusu *ATM* je inaktivace druhé alely tohoto genu v důsledku somatické mutace patrně raritní. Vyplývá to ze studií, které se zabývaly touto problematikou [77], i ze studie naší. Žádné alterace genu *ATM* nebyly dosud v nádorové tkáni nalezeny. Podobné je to i v případě genů *BRCA1/2*, hlavních predispozičních genů u syndromu hereditárního karcinomu prsu a ovaria, jejichž somatické mutace jsou také velice vzácné [78]. Výsledky analýz genu *ATM* dosud nelze považovat za definitivní. Pouze velmi málo studií bylo zaměřeno na mutační analýzu genu *ATM* u sporadických karcinomů prsu. Většina prací se zabývala analýzou mutací u hereditárních karcinomů, kdy zdrojem genetického materiálu byla periferní krev.

### 5.2.4 Analýza metylace promotoru *ATM*

Metylace je epigenetická změna, která hraje významnou roli v kontrole genové exprese, jak v procesech fyziologické diferenciaci buňky tak i v procesech nádorové transformace. Je nástrojem epigenetické regulace exprese genů během vývoje organismu a podílí se i na tvorbě tkáňově specifického expresního profilu. Metylace probíhá na 5'cytozinu v dinukleotidech CpG, které se v promotorových oblastech shlukují do CpG ostrůvků. Na

místa s metylovaným cytosinem nasedají přes vazebné proteiny histondeacetylázy a dochází k dalším epigenetickým změnám (deacetylace a metylace histonů). Výsledkem je uzavření struktury chromatinu. Transkripční aparát tak nemá dostatečný přístup k důležitým regulačním promotorovým sekvencím [103]. Změny v metylaci DNA jsou běžným jevem v nádorových buňkách a bylo prokázáno, že metylace normálně nemetylovaných CpG ostrůvků lokalizovaných v promotorových oblastech je asociována se sníženou expresí mnoha tumor supresorových genů v lidských nádorech. Míra metylace a frekvence metylace určitých genů se liší u jednotlivých typů lidských nádorů [104].

Metylaci promotoru *ATM* se doposud zabývaly tři práce. První práce publikovaná na toto téma sledovala metylaci ve 23 buněčných liniích odvozených od karcinomů prsu a detekovala metylaci 78% vzorků [84]. Naopak v práci Treilleux *et al.* [85] (74 sporadických karcinomů prsu) ani Allinen *et al.* [86] (30 tumorů) nebyla metylace promotoru *ATM* prokázána. V souboru 71 testovaných sporadických karcinomů prsu jsme nedetekovali metylaci promotoru *ATM* u žádného vzorku.

Metoda MS-MLPA odhalila metylaci promotoru genu *BRCA1* u 3 vzorků a genu *TP53* ve 2 případech. Methylace *BRCA2*, stejně jako *ATM* nebyla detekována u žádného nádorového vzorku. Tyto výsledky byly ověřeny bisulfitovým sekvenováním (mimo analýzy metylace promotoru genu *TP53*). Naše výsledky ukazují, že je metylace promotoru důležitých predispozičních genů u dědičného karcinomu prsu není obvyklým mechanismem genové inaktivace u karcinomu sporadického.

Nejčastěji metylovanými byly v našem souboru sporadických karcinomů prsu promotory genů *CDKN2B*, *WT1*, *PAX5* a *RASSF1*. Gen *CDKN2B* kóduje protein p15, který působí jako inhibitor cyklin dependentních kináz Cdk4 nebo Cdk6, čímž blokuje průchod G1 fází buněčného cyklu. V práci Zemliakove *et al.* [105] zabývající se metylací promotorové oblasti tohoto genu byla detekována metylace ve 2% (2/105) vyšetřovaných sporadických karcinomů prsu, zatímco my jsme našli metylaci u 89% nádorových vzorků. Tumorsupresorový gen *RASSF1* kóduje protein příbuzný proteinu Ras. *RASSF1* inhibuje akumulaci cyklinu D1 a tak blokuje průchod buněčným cyklem. Methylace *RASSF1* je nejen u karcinomu prsu častou alterací ke které dochází v časně fázi vývoje nádoru [106,107]. Gen *WT1* kóduje transkripční faktor, který působí jako aktivátor nebo represor celé řady genů. U karcinomu prsu pak může v závislosti na exprimovaných izoformách a na jejich vzájemném poměru dojít buď k posílení maligního fenotypu nebo naopak k jeho supresi [108]. Gen *PAX5* kóduje také transkripční faktor, který hraje roli v buněčné diferenciaci a embryonálním vývoji [109]. Hypermethylace genu *WT1* nebyla u sporadického karcinomu prsu dosud publikována,

v případě genu *PAX5* se uvádí, že je metylován u přibližně 65% karcinomů prsu, což odpovídá i našim zjištěním [109].

U jednotlivých genů není dosud známo, metylace kterých specifických CpG dinukleotidů u jednotlivých genů vede k významnému snížení nebo úplnému umlčení transkripce. Dalším krokem naší práce proto bude analýza exprese vybraných genů (tj. genů s hypermethylací promotoru, která byla detekována metodou MS-MLPA) pomocí real-time PCR.

#### 5.2.5 Inaktivace genu *ATM*

V souboru sporadických karcinomů prsu jsme v lokusu 11q21-23 detekovali LOH ve 20,8% případech. U žádného vzorku jsme v genu *ATM* nenalezli somatickou mutaci, ani nebyla detekována hypermethylace tohoto genu v promotorové oblasti. Imunohistochemická analýza v našem souboru sporadických karcinomů prokázala snížené množství proteinu ATM u téměř všech vyšetřovaných vzorků. Stejně tak i literatura uvádí, že velká část sporadických karcinomů prsu (~75%) vykazuje sníženou expresi proteinu ATM [85,110]. Bylo zjištěno, že snížení transkripce *ATM* může být způsobeno sníženou expresí proteinu DNA-PK (jedná se o protein kinázu, která se uplatňuje při reparaci dvouřetězcových zlomů DNA mechanismem nehomologního spojování konců). Mechanismus této pozitivní regulace je neznámý. Na základě výsledků celé řady prací lze předpokládat, že změny v expresi genů uplatňujících se v opravě dvouřetězcových zlomů DNA jsou spojeny s patogenezí karcinomu prsu [85,110].

## 6. ZÁVĚR

Incidence zhoubných nádorů prsu má v České republice z dlouhodobého hlediska zvyšující se tendenci. Vývoj nádoru je výsledkem kumulace genových alterací. Postiženy jsou geny, které se podílejí na regulaci (pozitivní i negativní) buněčného růstu a dělení. Dědičné karcinomy představují asi 5-10% všech karcinomů prsu a jsou v 60-80% případů způsobeny dědičnou mutací v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2*. V patogenezi karcinomu prsu se uplatňují i další geny s nižší penetrancí, mezi něž je řazen také gen *ATM*. Jedná se o tumorsupresorový gen, jehož produkt je důležitý pro opravu dvouřetězcových zlomů DNA.

Cílem této práce bylo zjistit frekvenci mutací v genu *ATM* u dědičného karcinomu prsu v naší populaci a dále určit, do jaké míry je tento gen alterován u sporadického karcinomu prsu. To zahrnovalo navržení a optimalizaci metod pro detekci mutací, analýzu výpadků alel a metylace promotorové oblasti genu *ATM*.

Pro screening mutací byla vybrána metoda PTT (protein truncation test), pro analýzu ztráty heterozygoty pak 2 metody umožňující analýzu vhodných mikrosatelitových markerů zasahujících do lokusu *ATM* - analýza fragmentů DNA pomocí elektroforézy na gelech Spreadex a pomocí analýzy na automatickém sekvenátoru. Metylací promotoru genu *ATM* jsme vyšetřovali 2 metodami - bisulfitovým sekvenováním a MS-MLPA.

V souboru 161 vysoce rizikových pacientek, u kterých nebyla prokázána mutace v hlavních predispozičních genech byly nalezeny 3 patogenní mutace (1,9%), zatímco u 183 kontrol žádná. Ve dvou případech se jednalo o sestřihovou mutaci. Aberantně sestřižený produkt se ale u jedinců s normální sekvencí genu *ATM* nevyskytoval. Dále byla nalezena sestřihová varianta c.1066-6T>G v souboru pacientek jednou (0,6%) a u kontrolní skupiny dvakrát (1,1%). Sestřižený produkt jsme detekovali jak u nosiček mutace, tak u zdravých kontrol, přičemž jsme nepozorovali rozdíl v genové expresi mezi lymfocyty periferní krve a buňkami nenádorové tkáně prsu. Naše výsledky naznačují, že se patogenní mutace v genu *ATM* podílí v České republice na vývoji dědičného karcinomu prsu a dále že sekvenční varianta c.1066-6T>G nezvyšuje riziko vzniku tohoto nádoru. Význam genu *ATM* v patogenezi tohoto hereditárního nádorového onemocnění je však ve srovnání s geny *BRCA1/2* výrazně menší. Podařilo se nám získat nádorovou tkáň fixovanou v parafinu od 3 nosiček mutací v *ATM*. Zatímco dědičné karcinomy u pacientek s mutací v genu *BRCA1/2* jsou ve většině případů doprovázeny ztrátou druhé intaktní alely postiženého genu, v případě

*ATM* jsme nenašli způsob inaktivace druhé alely. Nicméně protein ATM nebyl exprimován v žádném z nádorů s dědičnou mutací v *ATM*.

Pro zjištění úlohy genu *ATM* v patogenezi sporadického karcinomu prsu jsme provedli analýzu ztráty heterozygoty, metylace promotoru a mutační analýzu v souboru 73 sporadických karcinomů. Detekovali jsme LOH u 20,8% nádorů, což naznačuje, že se gen *ATM* uplatňuje v tumorogenezi. Metylaci promotorové oblasti genu ani somatickou mutaci jsme neprokázali u žádného vzorku. Klastrová analýza pomocí softwaru MeV TIGR v.4.0 ukázala, že by se geny *BRCA1* a *BRCA2* spolu s genem *TP53* mohli uplatňovat v určité společné dráze tumorogeneze, zatímco gen *ATM* v jiné. Metodou MS-MLPA jsme pak vybrali často metylované geny (jedná se o geny *CDKN2B*, *WT1*, *PAX5* a *RASSF1*), jejichž expresí se budeme dále zabývat.

Závěrem lze říci, že gen *ATM* má pravděpodobně význam při vzniku dědičného karcinomu prsu u minoritní části vysoce rizikových patientek v naší populaci, ale četnost mutací je oproti *BRCA1/2* významně nižší a vzhledem k velikosti genu v současné době preventivní screening tohoto genu neprovádíme. Máme zavedenu mutační analýzu genu *ATM* a dosud jako jediní v ČR nabízíme molekulární diagnostiku pacientům s dědičným autozomálně-recesivním onemocněním ataxia telangiectasia.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli doc. MUDr. Petru Pohlreichovi, CSc. za navržení zajímavého tématu a za vedení a podporu při jeho zpracování.

Další dík patří kolegům a kamarádům z naší laboratoře, především pak MUDr. Zdeňku Kleiblovi, PhD. za cenné rady, Mgr. Ivance Tiché za pomoc se zpracováním dat, a MUDr. Pavlu Dundrovi z Ústavu patologie 1.LF UK a VFN za provedení histologických vyšetření.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a trpělivost.

V Praze dne 1. května 2008

Tato práce vznikla za podpory IGA MZ 9051-3/2006 a MSM 002160808.

## SEZNAM ZKRATEK

DCIS	Duktální karcinom <i>in situ</i>
LCIS	Lobulární karcinom <i>in situ</i>
IDC	Invazivní duktální karcinom
ILC	Invazivní lobulární karcinom
MC	Medulární karcinom
ER	Estrogenové receptory
PR	Progesteronové receptory
EREs	Estrogenové responzivní elementy (Estrogen responsive elements)
ErbB-2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
EGF	Epidermální růstový factor (Epidermal growth factor)
Ki-67	Antigen detekovaný protilátkou Ki-67
BRCA1/2	Brest cancer 1/2 genes
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
AT	Ataxia telangiectasia
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinases
BLM	Bloom syndrome
HR	Homologní rekombinace (Homologous recombination)
NHEJ	Nehomologní spojování konců (Nonhomologous end-joining)
MDM2	Mouse double minute 2
FANCD2	Fanconi anemia complementation group D2
CHK1/2	Checkpoint kinases 1/2
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
CDK	Cyclin dependent kinases
RPA	Replication protein A
ssDNA	Jednořetězcová DNA (Single-stranded DNA)
GADD45	Growth arrest and DNA-damage-inducible protein
MPF	Mitosis promoting factor
TRF2	Telomere recognition factor 2
RAG	Recombination activating genes
cDNA	Komplementární DNA (Complementary DNA)
LOH	Ztráta heterozygoty (Loss of heterozygosity)



PTT	Protein truncation test
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STRs	Krátké tandemové repetice (Short tandem repeats)
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MS-MLPA	Methylation specific multiplex ligation-dependent probe amplification
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
PAX5	Paired box gene 5
CDH13	Cadherin 13, H-cadherin
TP73	Tumor protein p73
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
MRE11	Meiotic recombination 11
WT1	Wilms tumor 1
VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor
GSTP1	Glutathione S-transferase pi
ESR1	Estrogen receptor 1
RB1	Retinoblastoma 1
MSH6	MutS homolog 6
THBS1	Thrombospondin 1
IGSF4 (CADM1)	Cell adhesion molecule 1
STK11	Serine/threonine kinase 11
PYCARD	PYD and CARD domain containing
PAX6	Paired box gene 6
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
GATA5	GATA binding protein 5
RARB	Retinoic acid receptor, beta
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
APC	Adenomatous polyposis coli
MLH1	MutL homolog 1
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
HIC1	Hypermethylated in cancer 1

CASP8	Caspase 8
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
RASSF1	Ras association domain family member 1
DAPK1	Death-associated protein kinase 1
FHIT	Fragile histidine triad gene
TP53	Tumor protein p53
H2AX	H2A histone family, member X

## POUŽITÁ LITERATURA

1. World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female genital Organs. 2003. IARC Press: Lyon.
2. Kliewer EV, Smith KR: Breast cancer mortality among immigrants in Australia and Canada. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87:1154-1161.
3. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF et al.: Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85:1819-1827.
4. Kelsey JL, Horn-Ross PL: Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology. *Epidemiol Rev* 1993, 15:7-16.
5. Abrahamova J PCHJak. Atlas nádorů prsu. 2000. Grada Publishing.
6. UICC. 'TNM classification of of malignant tumors. John Wiley & Sons: Nex York . 2002.
7. Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, Ellis I, Elston C: Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol* 1995, 26:873-879.
8. Osborne CK: Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 1998, 51:227-238.
9. Bundred NJ: Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2001, 27:137-142.
10. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, Elledge RM: Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97:1254-1261.
11. Hortobagyi GN: Developments in chemotherapy of breast cancer. *Cancer* 2000, 88:3073-3079.
12. Park D, Karesen R, Noren T, Sauer T: Ki-67 expression in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases: clinical implications. *Virchows Arch* 2007, ..
13. Swift M, Morrell D, Cromartie E, Chamberlin AR, Skolnick MH, Bishop DT: The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am J Hum Genet* 1986, 39:573-583.
14. Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G: The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 1995, 4:2025-2032.
15. Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, Bedenham T, Bradwell AR, Easton DF, Lennox GG et al.: ATM mutations and phenotypes in

ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet* 1998, 62:334-345.

16. Concannon P, Gatti RA: Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat* 1997, 10:100-107.
17. Gatti RA, Tward A, Concannon P: Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab* 1999, 68:419-423.
18. Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K et al.: Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 1988, 336:577-580.
19. Uziel T, Savitsky K, Platzer M, Ziv Y, Helbitz T, Nehls M, Boehm T, Rosenthal A, Shiloh Y, Rotman G: Genomic Organization of the ATM gene. *Genomics* 1996, 33:317-320.
20. Shafman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D et al.: Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* 1997, 387:520-523.
21. Khanna KK: Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:795-802.
22. Beamish H, Kedar P, Kaneko H, Chen P, Fukao T, Peng C, Beresten S, Gueven N, Purdie D, Lees-Miller S et al.: Functional link between BLM defective in Bloom's syndrome and the ataxia-telangiectasia-mutated protein, ATM. *J Biol Chem* 2002, 277:30515-30523.
23. Lim DS, Kirsch DG, Canman CE, Ahn JH, Ziv Y, Newman LS, Darnell RB, Shiloh Y, Kastan MB: ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:10146-10151.
24. Fry MJ: Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Res* 2001, 3:304-312.
25. Jiang X, Sun Y, Chen S, Roy K, Price BD: The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM. *J Biol Chem* 2006, 281:15741-15746.
26. Rotman G, Shiloh Y: Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress? *Bioessays* 1997, 19:911-917.
27. Lakin ND, Weber P, Stankovic T, Rottinghaus ST, Taylor AM, Jackson SP: Analysis of the ATM protein in wild-type and ataxia telangiectasia cells. *Oncogene* 1996, 13:2707-2716.
28. Bakkenist CJ, Kastan MB: DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003, 421:499-506.

29. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ: ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001, 276:42462-42467.
30. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y et al.: Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998, 281:1674-1677.
31. Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D: Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:14973-14977.
32. Chen G, Yuan SS, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B, Cong F, Goff SP, Wu Y, Arlinghaus R et al.: Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem* 1999, 274:12748-12752.
33. Wang H, Guan J, Wang H, Perrault AR, Wang Y, Iliakis G: Replication protein A2 phosphorylation after DNA damage by the coordinated action of ataxia telangiectasia-mutated and DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res* 2001, 61:8554-8563.
34. Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P: A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J* 2003, 22:2860-2871.
35. Lee JH, Paull TT: ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 2005, 308:551-554.
36. Lee JH, Paull TT: Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 2004, 304:93-96.
37. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, III, Hays L, Morgan WF, Petrini JH: The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 1998, 93:477-486.
38. Hopfner KP, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP, Tainer JA: Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 2001, 105:473-485.
39. Taylor AM, Groom A, Byrd PJ: Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)* 2004, 3:1219-1225.
40. Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ: Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999, 286:1162-1166.
41. Li S, Ting NS, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY, Lee WH: Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature* 2000, 406:210-215.

42. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, Lane WS, Kastan MB, D'Andrea AD: Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 2002, 109:459-472.
43. Bartek J, Lukas J: Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 2003, 3:421-429.
44. Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J: The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 2001, 410:842-847.
45. Gatei M, Sloper K, Sorensen C, Syljuasen R, Falck J, Hobson K, Savage K, Lukas J, Zhou BB, Bartek J et al.: Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 2003, 278:14806-14811.
46. Pommier Y, Sordet O, Rao VA, Zhang H, Kohn KW: Targeting chk2 kinase: molecular interaction maps and therapeutic rationale. *Curr Pharm Des* 2005, 11:2855-2872.
47. Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J: The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 2002, 30:290-294.
48. Formichi P, Battisti C, Tripodi SA, Tosi P, Federico A: Apoptotic response and cell cycle transition in ataxia telangiectasia cells exposed to oxidative stress. *Life Sci* 2000, 66:1893-1903.
49. Gladdy RA, Nutter LM, Kunath T, Danska JS, Guidos CJ: p53-Independent apoptosis disrupts early organogenesis in embryos lacking both ataxia-telangiectasia mutated and Prkdc. *Mol Cancer Res* 2006, 4:311-318.
50. Piret B, Schoonbroodt S, Piette J: The ATM protein is required for sustained activation of NF-kappaB following DNA damage. *Oncogene* 1999, 18:2261-2271.
51. Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JH, de Lange T: The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2004, 2:E240.
52. Morrell D, Cromartie E, Swift M: Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia. *J Natl Cancer Inst* 1986, 77:89-92.
53. Gummy-Pause F, Wacker P, Sappino AP: ATM gene and lymphoid malignancies. *Leukemia* 2004, 18:238-242.
54. Su Y, Swift M: Mortality rates among carriers of ataxia-telangiectasia mutant alleles. *Ann Intern Med* 2000, 133:770-778.
55. Inskip HM, Kinlen LJ, Taylor AM, Woods CG, Arlett CF: Risk of breast cancer and other cancers in heterozygotes for ataxia-telangiectasia. *Br J Cancer* 1999, 79:1304-1307.

56. Lantelme E, Turinetto V, Mantovani S, Marchi A, Regazzoni S, Porcedda P, De Marchi M, Giachino C: Analysis of secondary V(D)J rearrangements in mature, peripheral T cells of ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Lab Invest* 2003, 83:1467-1475.
57. Angele S, Hall J: The ATM gene and breast cancer: is it really a risk factor? *Mutat Res* 2000, 462:167-178.
58. Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL: Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 1991, 325:1831-1836.
59. Broeks A, Urbanus JH, Floore AN, Dahler EC, Klijn JG, Rutgers EJ, Devilee P, Russell NS, van Leeuwen FE, 't Veer LJ: ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. *Am J Hum Genet* 2000, 66:494-500.
60. Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, Byrd P, Taylor M, Easton DF: Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97:813-822.
61. Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, Jenkins MA, Yu KM, Bachrich T, Muhr D, Wayne TL, Chu G, Davis RW et al.: Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 2003, 63:3325-3333.
62. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, North B, Jayatilake H, Barfoot R, Spanova K et al.: ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 2006, ..
63. Teraoka SN, Malone KE, Doody DR, Suter NM, Ostrander EA, Daling JR, Concannon P: Increased frequency of ATM mutations in breast carcinoma patients with early onset disease and positive family history. *Cancer* 2001, 92:479-487.
64. Sommer SS, Jiang Z, Feng J, Buzin CH, Zheng J, Longmate J, Jung M, Moulds J, Dritschilo A: ATM missense mutations are frequent in patients with breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2003, 145:115-120.
65. FitzGerald MG, Bean JM, Hegde SR, Unsal H, MacDonald DJ, Harkin DP, Finkelstein DM, Isselbacher KJ, Haber DA: Heterozygous ATM mutations do not contribute to early onset of breast cancer. *Nat Genet* 1997, 15:307-310.
66. Ramsay J, Birrell G, Lavin M: Testing for mutations of the ataxia telangiectasia gene in radiosensitive breast cancer patients. *Radiother Oncol* 1998, 47:125-128.
67. Dork T, Bendix R, Bremer M, Rades D, Klopper K, Nicke M, Skawran B, Hector A, Yamini P, Steinmann D et al.: Spectrum of ATM gene mutations in a hospital-based series of unselected breast cancer patients. *Cancer Res* 2001, 61:7608-7615.
68. Broeks A, Urbanus JH, de Knijff P, Devilee P, Nicke M, Klopper K, Dork T, Floore AN, van't Veer LJ: IVS10-6T>G, an ancient ATM germline mutation linked with breast cancer. *Hum Mutat* 2003, 21:521-528.

69. Thompson D, Antoniou AC, Jenkins M, Marsh A, Chen X, Wayne T, Tesoriero A, Milne R, Spurdle A, Thorstenson Y et al.: Two ATM variants and breast cancer risk. *Hum Mutat* 2005, 25:594-595.
70. Szabo CI, Schutte M, Broeks A, Houwing-Duistermaat JJ, Thorstenson YR, Durocher F, Oldenburg RA, Wasielewski M, Odefrey F, Thompson D et al.: Are ATM mutations 7271T-->G and IVS10-6T-->G really high-risk breast cancer-susceptibility alleles? *Cancer Res* 2004, 64:840-843.
71. Clarke RA, Fang ZH, Marr PJ, Lee CS, Kearsley JH, Papadatos G: ATM induction insufficiency in a radiosensitive breast-cancer patient. *Australas Radiol* 2002, 46:329-335.
72. Weil MM, Kittrell FS, Yu Y, McCarthy M, Zabriskie RC, Ullrich RL: Radiation induces genomic instability and mammary ductal dysplasia in *Atm* heterozygous mice. *Oncogene* 2001, 20:4409-4411.
73. Hampton GM, Mannermaa A, Winqvist R, Alavaikko M, Blanco G, Taskinen PJ, Kiviniemi H, Newsham I, Cavenee WK, Evans GA: Loss of heterozygosity in sporadic human breast carcinoma: a common region between 11q22 and 11q23.3. *Cancer Res* 1994, 54:4586-4589.
74. Rio PG, Pernin D, Bay JO, Albuissou E, Kwiatkowski F, De Latour M, Bernard-Gallon DJ, Bignon YJ: Loss of heterozygosity of BRCA1, BRCA2 and ATM genes in sporadic invasive ductal breast carcinoma. *Int J Oncol* 1998, 13:849-853.
75. Koike M, Takeuchi S, Park S, Hatta Y, Yokota J, Tsuruoka N, Koeffler HP: Ovarian cancer: loss of heterozygosity frequently occurs in the ATM gene, but structural alterations do not occur in this gene. *Oncology* 1999, 56:160-163.
76. Bay JO, Uhrhammer N, Pernin D, Presneau N, Tchirkov A, Vuillaume M, Laplace V, Grancho M, Verrelle P, Hall J et al.: High incidence of cancer in a family segregating a mutation of the ATM gene: possible role of ATM heterozygosity in cancer. *Hum Mutat* 1999, 14:485-492.
77. Feng J, Yan J, Chen J, Schlake G, Jiang Z, Buzin CH, Sommer SS, Dritschilo A: Absence of somatic ATM missense mutations in 58 mammary carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2003, 145:179-182.
78. Janatova M, Zikan M, Dunder P, Matous B, Pohlreich P: Novel somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic breast tumors. *Hum Mutat* 2005, 25:319.
79. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y et al.: BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994, 266:120-122.
80. Boultonwood J: Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma. *J Clin Pathol* 2001, 54:512-516.
81. Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002, 3:415-428.



82. Gao G, Bracken AP, Burkard K, Pasini D, Classon M, Attwooll C, Sagara M, Imai T, Helin K, Zhao J: NPAT expression is regulated by E2F and is essential for cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 2003, 23:2821-2833.
83. Kim WJ, Vo QN, Shrivastav M, Lataxes TA, Brown KD: Aberrant methylation of the ATM promoter correlates with increased radiosensitivity in a human colorectal tumor cell line. *Oncogene* 2002, 21:3864-3871.
84. Vo QN, Kim WJ, Cvitanovic L, Boudreau DA, Ginzinger DG, Brown KD: The ATM gene is a target for epigenetic silencing in locally advanced breast cancer. *Oncogene* 2004, 23:9432-9437.
85. Treilleux I, Chapot B, Goddard S, Pisani P, Angele S, Hall J: The molecular causes of low ATM protein expression in breast carcinoma; promoter methylation and levels of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *Histopathology* 2007, 51:63-69.
86. Allinen M, Peri L, Kujala S, Lahti-Domenici J, Outila K, Karppinen SM, Launonen V, Winqvist R: Analysis of 11q21-24 loss of heterozygosity candidate target genes in breast cancer: indications of TSLC1 promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer* 2002, 34:384-389.
87. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology* 2002, 41:151.
88. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD: Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 2000, 53:125-130.
89. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM: Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998, 11:155-168.
90. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987, 162:156-159.
91. Telatar M, Teraoka S, Wang Z, Chun HH, Liang T, Castellvi-Bel S, Udar N, Borresen-Dale AL, Chessa L, Bernatowska-Matuszkiewicz E et al.: Ataxia-telangiectasia: identification and detection of founder-effect mutations in the ATM gene in ethnic populations. *Am J Hum Genet* 1998, 62:86-97.
92. Den Dunnen JT, Paalman MH: Standardizing mutation nomenclature: why bother? *Hum Mutat* 2003, 22:181-182.
93. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A: Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 2005, 33:e128.

94. Pohlreich P, Zikan M, Stribrna J, Kleibl Z, Janatova M, Kotlas J, Zidovska J, Novotny J, Petruzelka L, Szabo C et al.: High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res* 2005, 7:R728-R736.
95. Sandoval N, Platzer M, Rosenthal A, Dork T, Bendix R, Skawran B, Stuhmann M, Wegner RD, Sperling K, Banin S et al.: Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Hum Mol Genet* 1999, 8:69-79.
96. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M et al.: TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003, 34:374-378.
97. Bernstein JL, Teraoka S, Southey MC, Jenkins MA, Andrulis IL, Knight JA, John EM, Lapinski R, Wolitzer AL, Whittemore AS et al.: Population-based estimates of breast cancer risks associated with ATM gene variants c.7271T>G and c.1066-6T>G (IVS10-6T>G) from the Breast Cancer Family Registry. *Hum Mutat* 2006, 27:1122-1128.
98. Bay JO, Uhrhammer N, Pernin D, Presneau N, Tchirkov A, Vuillaume M, Laplace V, Grancho M, Verrelle P, Hall J et al.: High incidence of cancer in a family segregating a mutation of the ATM gene: possible role of ATM heterozygosity in cancer. *Hum Mutat* 1999, 14:485-492.
99. Lu S, Shen K, Wang Y, Santner SJ, Chen J, Brooks SC, Wang YA: Atm-haploinsufficiency enhances susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors. *Carcinogenesis* 2006, 27:848-855.
100. Yang X, Yan L, Davidson NE: DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001, 8:115-127.
101. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E: Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 1999, 236:87-95.
102. Roll JD, Rivenbark AG, Jones WD, Coleman WB: DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer* 2008, 7:15.:15.
103. Newell-Price J, Clark AJ, King P: DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol Metab* 2000, 11:142-148.
104. Park SY, Kim BH, Kim JH, Cho NY, Choi M, Yu EJ, Lee S, Kang GH: Methylation profiles of CpG island loci in major types of human cancers. *J Korean Med Sci* 2007, 22:311-317.
105. Zemliakova VV, Zhevlova AI, Strel'nikov VV, Liubchenko LN, Vishnevskaja I, Tret'iakova VA, Zaletaev DV, Nemtsova MV: [Abnormal methylation of several tumor suppressor genes in sporadic breast cancer]. *Mol Biol (Mosk)* 2003, 37:696-703.

106. Yeo W, Wong WL, Wong N, Law BK, Tse GM, Zhong S: High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumorous and non-tumorous tissue of breast cancer. *Pathology* 2005, 37:125-130.
107. Hesson LB, Cooper WN, Latif F: The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers* 2007, 23:73-87.
108. Burwell EA, McCarty GP, Simpson LA, Thompson KA, Loeb DM: Isoforms of Wilms' tumor suppressor gene (WT1) have distinct effects on mammary epithelial cells. *Oncogene* 2007, 26:3423-3430.
109. Palmisano WA, Crume KP, Grimes MJ, Winters SA, Toyota M, Esteller M, Joste N, Baylin SB, Belinsky SA: Aberrant promoter methylation of the transcription factor genes PAX5 alpha and beta in human cancers. *Cancer Res* 2003, 63:4620-4625.
110. Angele S, Treilleux I, Bremond A, Taniere P, Hall J: Altered expression of DNA double-strand break detection and repair proteins in breast carcinomas. *Histopathology* 2003, 43:347-353.