

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Klára Zdařilová

**Studium inaktivace tumor supresorových genů zúčastněných
v patogenezi sporadických nádorových onemocnění**

Inactivation of tumor suppressor genes contributing to pathogenesis of
sporadic cancers

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Markéta Janatová PhD.

Praha, 2015

Prohlášení

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

V Praze, 30.4.2015

Klára Zdařilová

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své školitelce RNDr. Markétě Janatové PhD. za ochotu, cenné rady a trpělivost, kterou mi věnovala během zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala celému týmu ústavu biochemie a experimentální onkologie za pomoc a psychickou podporu.

ABSTRAKT

Proteinový produkt tumor supresorového genu *PALB2* se podílí na opravné dráze dvouřetězcových zlomů mechanismem homologní rekombinace. Význam patogenních variant tohoto genu v hereditárních formách karcinomu prsu u *BRCA1/2*-negativních pacientek v rodinách s mnohočetným výskytem karcinomů prsu může být v České republice srovnatelný s významem genu *BRCA2*. Role genu *PALB2* při vzniku sporadických karcinomů prsu, tvořících 90 – 95 % nádorových onemocnění, nebyla zatím objasněna.

Tato práce se zabývá způsobem inaktivace tumor supresoru *PALB2* ve sporadické formě karcinomu prsu a to mechanismem výpadku jedné alely pomocí analýzy ztráty heterozygosity (LOH) odpovídajících mikrosatelitových markerů a hypermetylací jeho promotorové oblasti jakožto nejčastějšími mechanismy doprovázejí inaktivaci tumor supresorových genů v počátcích tumorogeneze.

V souboru 51 neselektovaných pacientek se sporadickým nádorovým onemocněním prsu byly nalezeny 4 vzorky DNA z nádorové tkáně s výpadkem jedné alely genu *PALB2*. U těchto vzorků byla provedena analýza somatických mutací. Žádné mutace nebyly nalezeny. U všech vzorků byla dále analyzována hypermetylace promotorové oblasti genu *PALB2*. Její přítomnost také nebyla detekována.

Tyto výsledky naznačují roli inaktivace genu *PALB2* při vzniku pouze minoritní skupiny sporadických karcinomů prsu.

Klíčová slova: gen *PALB2*, ztráta heterozygosity, metylace promotoru, somatické mutace, inaktivace tumor supresorového genu

ABSTRACT

Protein product tumor suppressor *PALB2* gene plays a major role in pathway of DNA repair of double-strand breaks through the homologous recombination mechanism. Significance of its pathogenic variants in hereditary forms of breast cancer in *BRCA1/2*-negative patients in families with multiple breast cancers may be in the Czech Republic comparable with the *BRCA2* gene. A role of the *PALB2* gene in sporadic breast cancer occurrence, which represent 90 – 95 % of all cancers, is still unknown.

This thesis focuses on inactivation pathway of tumor suppressor *PALB2* in the sporadic breast cancer by a mechanism of allelic loss detecting by loss of heterozygosity (LOH) of corresponding microsatellite markers and hypermethylation of promoter region as the most common mechanisms of inactivation tumor suppressors in early tumorigenesis.

In a group of 51 nonselected patients with sporadic breast cancer we found four samples with *PALB2* locus allelic loss. These samples were analyzed for somatic mutations. No mutation was found. There is no evidence of promoter hypermethylation in any of the samples.

Our data suggest a role of the *PALB2* gene inactivation in a minority group of sporadic breast cancers.

Key words: *PALB2* gene, loss of heterozygosity, promoter methylation, somatic mutations, tumor suppressor inactivation

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
1 ÚVOD	8
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1 KNUDSONOVA TEORIE.....	9
2.2 LOH (Loss of heterozygosity – ztráta heterozygosity)	10
2.2.1 DNA Sekvence	11
2.2.2 Určování výpadků alel pomocí mikrosatelitů.....	12
2.3 HAPLOINSUFICIENCE	12
2.4 METYLACE	13
2.4.1 DNA metylace	13
2.4.2 Metylace DNA v karcinogenezi	14
2.4.2.1 Ztráta DNA metylace	14
2.4.2.2 Hypermetylace promotorových oblastí	14
2.4.3 CpG ostrovy.....	15
2.4.4 Umlčení genu.....	16
2.4.5 DNA metyltransferázy (DNMTs).....	16
2.4.6 Klinický význam epigenetických změn v průběhu karcinogeneze	17
2.5 FUNKCE TUMOR SUPRESORU PALB2	18
2.5.1 Homologní rekombinace	18
2.5.2 BRCA1	18
2.5.3 BRCA2	19
2.5.4 PALB2.....	19
2.5.5 PALB2 a další interakční partneři	21
2.5.5.1 KEAP1 a oxidativní stres	21
2.5.5.2 MRG15	22
2.6 HEREDITÁRNÍ KARCINOM PRSU	22
2.7 FANCONIHO ANÉMIE	22
2.8 PALB2 A JINÁ NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	23
3 CÍLE PRÁCE	24
4 METODY A MATERIÁL	25
4.1 MATERIÁL	25

4.2 METODY	26
4.2.1 Analýza ztráty heterozygosity	26
4.2.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR – polymerase chain reaction) – amplifikace mikrosatelitových markerů	26
4.2.1.2 Elektroforéza PCR amplikonu.....	27
4.2.1.3 Fragmentační analýza na genetickém analyzátoru ABI3130 (Applied Biosystems, USA)	28
4.2.2 Analýza somatických mutací (Sekvence DNA)	28
4.2.3 Analýza hypermetylace promotorové oblasti	31
4.2.3.1 Princip bisulfitové modifikace	31
4.2.3.2 Bisulfitová modifikace	31
4.2.3.3 Navržení primerů pro amplifikaci modifikované DNA	32
4.2.3.4 Optimalizace podmínek amplifikace	34
4.2.3.5 Amplifikace promotorové oblasti genu <i>PALB2</i>	35
5 VÝSLEDKY	36
5.1 ANALÝZA VÝPADKŮ ALEL GENU <i>PALB2</i>	36
5.2 HYPERMETYLACE PROMOTOROVÝCH OBLASTÍ.....	39
5.2.3 Modifikace DNA bisulfitem sodným	39
5.2.4 Sekvenování promotorové oblasti	40
6 DISKUZE	42
6.1 ZTRÁTA HETEROZYGOSITY	42
6.2 HYPERMETYLACE PROMOTOROVÉ OBLASTI.....	46
7 ZÁVĚR	49
8 SEZNAM ZKRATEK	50
9 CITACE.....	52

1 ÚVOD

Karcinom prsu je nejčastější příčinou úmrtí u žen v České republice. 90 – 95 % tvoří sporadická forma tohoto onemocnění, která vzniká na základě náhodných somatických mutací v buňkách prsní žlázy. Ve zbylých případech se jedná o hereditární formu, jejíž příčinou jsou dominantně zděděné mutace v některém z predispozičních genů rakoviny prsu (Lodygin a Hermeking 2005, Pohlreich, Kleibl et al. 2012).

Hlavní predispoziční geny pro vznik karcinomu prsu *BRCA1* a *BRCA2* patří do skupiny tzv. vysoce penetrantních genů a mutace v těchto genech objasňují vznik okolo 16 % hereditárních karcinomů prsu (2000). Proto se stále hledají noví kandidáti z nízké nebo středně penetrantních genů jako jsou geny *ATM*, *CHEK2* nebo *PALB2*, které zvyšují riziko karcinomu prsu v menší míře, zato se však tato skupina stále rozrůstá (Walsh a King 2007).

Většina těchto genů má společnou funkci v kontrole buněčného dělení nebo v opravách poškozené DNA. Tyto geny dělíme na onkogeny a tumor supresorové geny.

Onkogeny vznikají z protoonkogenů, čili genů zajišťujících proliferační procesy v buňce a díky jejich dominantnímu fenotypu, stačí pouze jedna mutovaná alela pro začátek tumorogeneze. Tumor supresorové geny jsou na rozdíl od onkogenů tzv. antiproliferační a vykazují recesivní fenotyp, takže k rozvoji tumorogeneze je zapotřebí inaktivace obou alel genu.

Zvláštní podskupinou jsou geny zajišťující opravy poškozené DNA. Tyto geny patří do skupiny tumor supresorových genů, vykazující recesivní fenotyp. Do této skupiny je zařazen i gen *PALB2*.

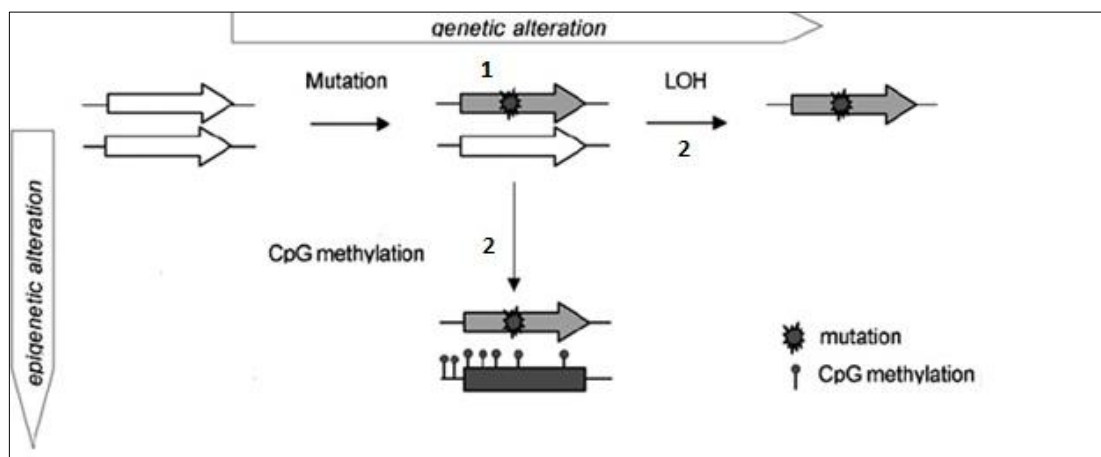
Během tumorogeneze dochází k mnoha významným změnám na úrovni DNA. Inaktivace tumor supresorového genu je jedním z nejzásadnějších kroků v patogenezi mnoha nádorových onemocnění. Mechanismy úplné ztráty funkce genu nejsou zatím úplně známy. Mechanismů inaktivace je několik, přičemž mezi nejčastější patří ztráta heterozygosity (Loss of Heterozygosity – LOH) a hypermetylace promotorových oblastí následující po náhodné somatické mutaci na první alele.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 KNUDSONOVA TEORIE

V roce 1970 vědci studující nádorové viry provedli experiment, při němž nechali sfúzovat nádorovou buňku s normální a pozorovali ztrátu schopnosti buňky vytvářet nádor. Když byl ale nádor vyvolán virovou infekcí, buňka si schopnost ponechala ((Harris, Miller et al. 1969) převzato z Count 2011). Recessivní fenotyp byl tedy pozorován u spontánního rakovinného bujení, zatímco virový onkogen vyvolal fenotyp dominantní. Tento výsledek vedl k závěru, že v genomu existují geny, které jsou zodpovědné za potlačení nádorového bujení a k inhibici jejich funkce je potřeba inaktivovat obě kopie genu. Tyto geny byly popsány jako tumor supresorové. Později tato představa byla potvrzena na studii retinoblastomu, čili na *Rb* genu.

Koncept tumor supresorového genu v karcinogenezi vysvětlil později Alfred Knudson teorií dvou zásahů („two hits theory“). Předpokládal, že hereditární forma retinoblastomu, potřebuje dva zásahy do genu, aby došlo k rozvoji onemocnění. První zásah je mutace zděděná v jedné kopii genu. Jestliže byla zasažena funkce druhé kopie genu (druhý zásah), a to náhodnou mutací nebo ztrátou heterozygosity (LOH), pak mohlo dojít k rozvoji nádoru (obrázek č. 1).

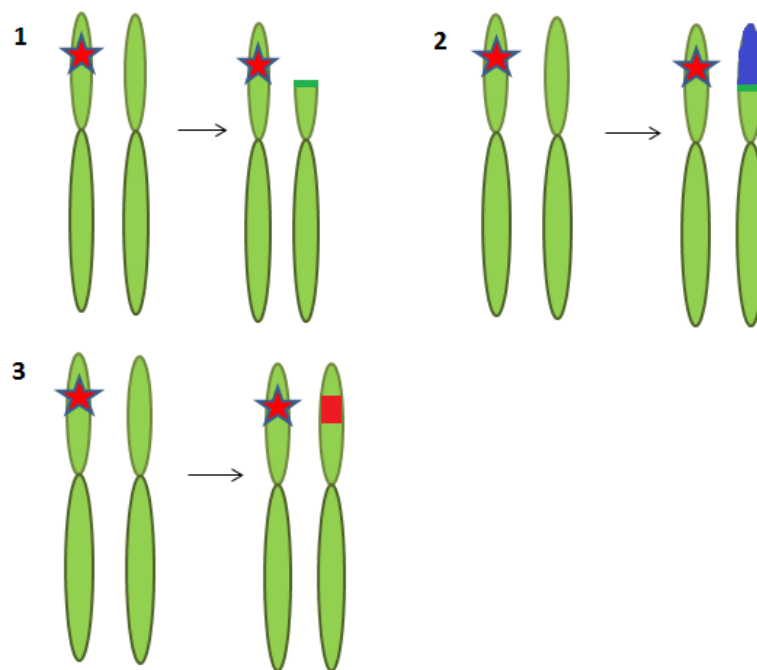


Obrázek č. 1 – Grafické znázornění podstaty Knudsonovy teorie. 1 – první zásah do jedné alely genu somatickou mutací. 2 – možnosti druhého zásahu do druhé zdravé alely genu a to úplnou ztrátou alely (LOH) nebo metylací promotoru vedoucí k úplné inaktivaci genu. (Převzato a upraveno z Lodygin a Hermeking 2005).

Ztráta heterozygosity je jedním z nejčastějších a nejdůležitějších mechanismů inaktivace tumor supresorových genů, mimo různé mutace. U sporadických nádorů musí v buňce dojít k inaktivaci obou alel genu náhodně, což vysvětluje pozdější nástup nedědičných forem onemocnění.

2.2 LOH (Loss of heterozygosity – ztráta heterozygosity)

V jedné buňce je velmi malá pravděpodobnost, že obě alely jednoho genu budou inaktivovány náhodnými mutacemi (pravděpodobnost byla vypočítána na 10^{-12}) (Count 2011). Přijatelnější vysvětlení je, že jedna alela se inaktivuje náhodnou mutací a druhá alela je inaktivována mechanismem jiným, například mitotickou rekombinací (rekombinace části chromozomů při mitóze), genovou konverzí, či delecí celé části chromozomu (obrázek č. 2).



Obrázek č. 2 – Znázornění způsobů ztráty heterozygosity. Hvězdičkou označena náhodná somatická mutace v jedné alele genu. 1 – znázornění delecce celé části chromozomu v druhé alele. 2 – znázornění mitotické rekombinace (záměna celé části chromozomu). 3 – znázornění genové konverze na druhé alele genu.

Při tomto ději je po inaktivaci jedné alely gen heterozygotní a po inaktivaci i druhé alely dochází ke ztrátě heterozygosity. Mechanismus, při němž jsou

inaktivovány obě alely genu, tedy nazýváme jako ztrátu heterozygosity neboli LOH (Radman a Kinsella 1980).

Nicméně je známo, že ztráta heterozygosity je jedním z nejčastějších a nejdůležitějších mechanismů inaktivace tumor supresorového genu. Objevení LOH také naopak přispělo k objevení mnoha tumor supresorových genů v odpovídajícím lokusu (Count 2011).

Nejsnadnějším markerem pro detekci „ztracené alely“ jsou mikrosatelity.

2.2.1 DNA Sekvence

Sekvence v DNA můžeme rozdělit na jedinečné, které tvoří většinu DNA (přibližně 75 %) a repetitivní. Repetitivní sekvence jsou dále děleny na disperzní, neboli rozptýlené a satelitní. Disperzní repetice jsou rozmístěny všude po genomu, zatímco satelitní jsou soustředěny do klastrů s jasným začátkem a koncem. Tyto úseky se liší jak počtem, tak variabilitou repetic. V závislosti na délce satelitních repetic rozeznáváme 2 typy těchto úseků.

Minisatelity, také VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) jsou úseky repetic o 20 až 70 nukleotidech a mohou být dlouhé až několik tisíc bází, přičemž jsou ohraničeny po stranách restričními místy. Minisatelity jsou obvykle příliš dlouhé na to, aby mohly být amplifikovány pomocí PCR.

Mikrosatelity, také SSRs (Simple Sequence Repeats) jsou menší než minisatelity, jsou složeny pouze z repetic dlouhých 1 až 6 páru bází a jejich celková velikost nepřesahuje několik desítek párů bází. Nejčastější jsou dinukleotidové repetice, ve kterých převažuje typ (CA)_n. Mikrosatelity nemají žádnou známou funkci, ale jsou rozšířeny po celém genomu v nekódujících sekvencích a to u všech obratlovců. Odchytky v délce a uspořádání repetic způsobené chybou replikace jsou dostatečně časté, aby vznikaly jedinečné markery, ale ne natolik, aby k nim docházelo s každou generací (Hartwell, Hood et al. 2000). Tyto vlastnosti dělají z těchto úseků vhodné markery pro nádorové studie, ale také pro určování paternit, či zařazení do fylogenetického systému (Janatova a Pohlreich 2004).

2.2.2 Určování výpadků alel pomocí mikrosatelitů

Analýza ztráty heterozygosity (LOH) pomocí mikrosatelitů je jedna z nejčastějších metod pro zjišťování výpadku jedné alely sledovaného genu. Výpadek alely je způsoben delecí dané oblasti v genomové DNA během tumorogeneze. Druhá, tzv. „wild-type“ alela zůstává zachována. K detekci ztráty dané oblasti jsou používány nejméně dva nejbližší či intragenové mikrosatelitové markery, pokud gen takové obsahuje. Využívá se analýzy dvou vzorků od jednoho jedince, kdy je srovnáván vzorek DNA zdravé nenádorové tkáně se vzorkem DNA z nádorové tkáně. Díky rozdílné délce mikrosatelitového markeru zděděného po otci a matce, můžeme pomocí PCR reakce naamplifikovat dva různě dlouhé produkty, každý odpovídající jedné alele. Pokud jsou ve zdravé tkáni přítomny dvě různě dlouhé alely, je vzorek heterozygotní (vykazující dvě alely) a může sloužit pro detekci LOH. V případě, že odpovídající nádorová tkáň od stejného pacienta vykazuje pouze jednu alelu, hovoříme o ztrátě heterozygosity daného mikrosatelitového markeru.

2.3 HAPLOINSUFICIENCE

Haploinsuficience (polonedostatečnost) je stav buňky v diploidním organismu, kdy je přítomna pouze jedna funkční alela genu a druhá alela je mutovaná. Tento stav neumožňuje produkci dostatečného množství funkčního proteinu, což vede k abnormálnímu stavu buňky nebo k onemocnění.

U tumor supresorových genů platí podle Knudsonovy teorie, že pro úplnou inaktivaci genu, vedoucí následně k rozvoji nádorového onemocnění, je zapotřebí inaktivovat obě alely genu (teorie dvou zásahů). Byly ale nalezeny tumor supresorové geny jako *PTEN*, *p53*, *p27* a další které se vymykají klasickému dělení a jsou označovány za tzv. haplo-insuficientní tumor supresorové geny (Berger a Pandolfi 2011). Bylo dokázáno, že u těchto genů, přestože se jedná o tumor supresorové geny, stačí mutace jedné alely, aby buňka měla tendenci stát se nádorovou. V případě tumor supresorového genu *PTEN*, jehož mutace jsou spojovány s celou řadou karcinomů včetně sporadického karcinomu prsu, bylo dokonce prokázáno, že heterozygotní stav podporuje rozvoj karcinogeneze více než stav homozygotní – úplná ztráta genu (Chen, Trotman et al. 2005). Důkazem této hypotézy může být i Li-Fraumeni syndrom, který je způsoben mutací v genu *p53*. Pouze ve 40 % případů onemocnění byla detekována úplná ztráta genu *p53* (Varley, Evans et al. 1997).

Jelikož druhý zásah nebyl prokázán u více tumor supresorových genů, tak vysvětlením, proč i přesto došlo k tumorogenezi, může být právě haploinsuficience.

2.4 METYLACE

Epigenetika je termín popisující dědičné změny v genové expresi, které jsou způsobeny jinak než změnou v sekvenci nukleotidů (Russo, Martienssen et al. 1996). O epigenetických změnách v karcinogenezi se vědělo už v 90. letech, ale až v poslední době se k nim zase vrací pozornost. Mezi takové změny patří metylace promotorové oblasti. V nádorových buňkách mluvíme o abnormálním umlčení genové exprese („silencing“) (Jones a Baylin 2002). Jedná se o hypermetylaci těchto úseků, tedy oblastí důležitých pro regulaci transkripce DNA do RNA. Důležitým faktem je, že takto jsou inaktivovány především tumor supresorové geny v počátcích rozvoje tumorogeneze.

2.4.1 DNA metylace

DNA obsahuje 4 báze a to adenin, guanin, cytosin a thymin. Díky kovalentní modifikaci postreplikativní DNA může vznikat i modifikovaná báze 5-metylcytosin. Donorem metylové skupiny je S-adenosylmethionin. S-adenosylmethionin vzniká z adenosintrifosfátu (ATP) a methioninu pomocí methionin-adenosyltransferázy a je častým substrátem reakcí, při nichž dochází k přenosům metylové skupiny. Z S-adenosylmethioninu je metylová skupina odštěpena enzymem DNA metyltransferázou (DNMT), která následně metylovou skupinu přidává na cytosin a vytváří tak metylcytosin. Taková změna ale funguje pouze u cytosinů, které předcházejí guaninům, čili vytvářejí tzv. CpG dinukleotidy, CpG ostrovy jsou pak úseky genomu s vyšší frekvencí CpG míst (Rideout, Coetzee et al. 1990).

DNA metylace slouží k udržení neaktivity nekódujících částí DNA. Metylované části DNA se replikují později než nemetylovaná DNA (Antequera a Bird 1993), protože metylace pomáhá formaci inaktivního chromatinu nekódujících částí. Methylace tedy pomáhá zajistit pozdější replikaci většiny genomu, což znamená prevenci transkripce oblastí obsahujících repetitivní sekvence, vložené virové segmenty nebo transpozony (DNA sekvence, které se přemístily z jejich normální polohy do polohy nové v genomu).

2.4.2 Metylace DNA v karcinogenezi

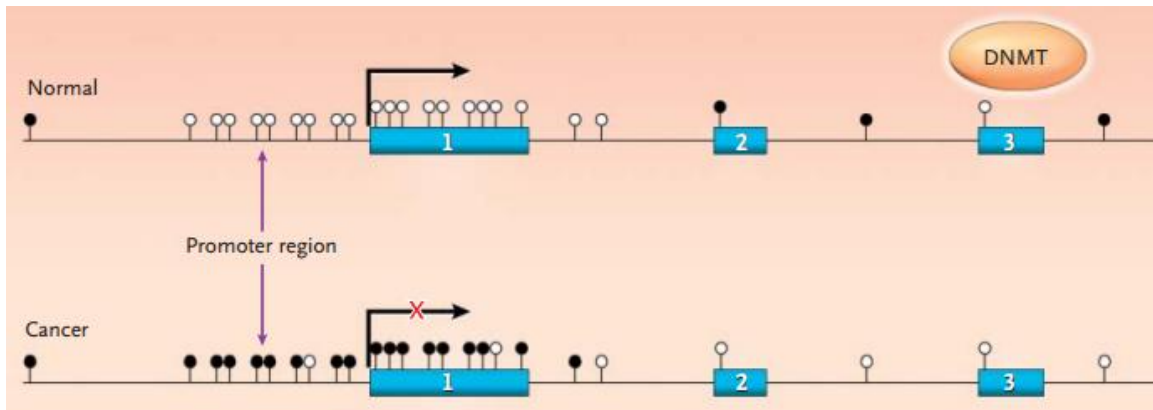
V karcinogenezi mohou nastat různé situace z hlediska metylací - ztráta metylace nebo naopak hypermetylace promotorových oblastí.

2.4.2.1 Ztráta DNA metylace

Ztráta metylace v tumorogenezi má dva důsledky. Za prvé, slabou represi transkripce v oblastech, které za normálních okolností bývají transkripčně neaktivní, což vede k jejich částečné aktivaci a může dojít k poškození buňky, např. transkripce virových částí či transpozonů. Nebo může dojít k aktivaci genů, které jsou normálně imprintovány – vznik bialelické exprese např. na inaktivním X chromozomu. Za druhé, metylace pericentrických oblastí chromozomů je důležitá pro stabilitu chromozomů a zároveň správný průběh replikace DNA. V některých nádorových buňkách byly pozorovány strukturní alterace pericentrických oblastí.

2.4.2.2 Hypermetylace promotorových oblastí

Abnormální hypermetylace promotorové oblasti může mít stejný následek jako mutace v kódující oblasti. U sporadických karcinomů je pravděpodobnost bodové mutace obou alel malá, častěji nacházíme hypermetylované oblasti na jedné z alel. Epigenetická změna není většinou prvním zásahem (tzv. první „hit“), ale zásahem druhým. Vliv metylace na regulaci exprese genu záleží na její pozici (uvnitř nebo okolo promotoru) a pouze metylace promotorové oblasti ovlivňují transkripci. Hustě metylované CpG dinukleotidy v těle genu nemají na umlčení genu žádný vliv (obrázek č. 3). Konečným procesem vedoucím k umlčení genu není samotná metylace CpG dinukleotidů, ale navázání proteinů na metylovaná místa, které pozmění strukturu chromatinu a jsou pro represi transkripce klíčové (Bird a Wolffe 1999). Jedná se o metylcytosin vazebné proteiny.



Obrázek č. 3 – Znázornění rozdílu mezi metylačním stavem genu v normální – zdravé buňce (nahore) a v rakovinné buňce (dole). Ve zdravých buňkách je promotor genu typicky hypometylován a tělo genu hypermetylováno, na rozdíl od rakovinné buňky, kde je promotor typicky hypermetylován a tělo genu hypometylováno (Převzato a upraveno z Herman a Baylin 2003).

2.4.3 CpG ostrovy

CpG ostrovy jsou místa hojně obsahující dinukleotidy cytosin a guanin které jsou v genomu asymetricky rozloženy a matematická predikce množství těchto ostrovů je vždy vyšší než skutečný počet těchto ostrovů. Tyto ostrovy jsou většinou soustředěny do promotorů, tedy do míst kde začíná a je regulována transkripce. Více než polovina genů má ve svých promotorech CpG bohaté oblasti. Okolo 80 % CpG dinukleotidů, které nejsou v těchto CpG ostrovech promotorových oblastí, je hojně metylováno (Ehrlich, Gama-Sosa et al. 1982). Exprese genů je tedy určena metylací CpG ostrovů v promotorových oblastech. Toto tvrzení můžeme opřít o příklady inaktivního X chromozomu nebo různých imprintovaných genů, které díky rodičovské determinaci jsou naprogramovány tak, aby ve tkáních byl exprimován určitý gen pouze od jednoho z rodičů. Výjimku tvoří tkáňově specifická exprese genu, kde ač je promotor genu nemetylován k expresi nedochází (Bird 2002).

2.4.4 Umlčení genu

Pro umlčení genu nejsou důležité pouze CpG ostrovy, ale především struktura chromatinu kolem těchto ostrovů, protože ta ovlivňuje přístupnost specifických oblastí DNA pro DNA metyltransferázy (DNMTs). V nádorových buňkách je ochrana proti metylaci porušena nebo překonána a tato oblast pak nemůže být překládána. Za normálního stavu buňky s nemetylovanými CpG ostrovy v promotorech jsou histony rozmístěny nepravidelně, DNA nepřiléhá tak těsně a je tedy umožněn přístup pro proteiny aktivující transkripci (Kass, Pruss et al. 1997). V případě, že CpG ostrovy jsou silně metylovány, histony jsou symetricky rozestavěné a DNA vážou těsně, což znemožňuje přístup pro regulační proteiny.

Další způsob regulace transkripce je pomocí modifikace postranních řetězců aminokyselin histonů. Acetylace histonu aktivuje transkripci genu, v případě umlčeného genu jsou histony deacetylovány. V rakovinných buňkách, ve kterých dochází k umlčení genové exprese, je upřednostňována DNA metylace před deacetylací histonů (Suzuki, Gabrielson et al. 2002).

2.4.5 DNA metyltransferázy (DNMTs)

DNMTs jsou enzymy katalyzující proces metylace, čili připojení metylové skupiny na DNA. V savčích buňkách rozeznáváme 3 aktivní DNA metyltransferázy a to: DNMT1, DNMT3a a DNMT3b (Okano, Xie et al. 1998).

DNMT1 je nejhojněji zastoupená metyltransferáza v savčích buňkách, která přednostně metyluje hemi-metylované dinukleotidy CpG, na kterých je až 100 krát aktivnější než na nemetylovaných dinukleotidech. Tento poměrně velký enzym o velikosti 193,5 kDa obsahuje katalytickou C-terminální doménu a N-terminální regulační doménu, která tvoří většinu proteinu. Tato doména je zodpovědná za navedení transferázy do replikačního místa (Robertson, Uzvolgyi et al. 1999). Je klíčová také pro tzv. udržovací metylaci. V rakovinných buňkách je zodpovědná za „*de novo*“ metylace tumor supresorových genů (Jair, Bachman et al. 2006).

DNMT3 je rodina transferáz, která je strukturně podobná DNA metyltransferázám 1, čili mají jak katalytickou tak regulační doménu. Na rozdíl od DNMTs 1 metylují nemetylované a hemimetylované CpG ve stejném poměru. Rodina DNMT3 zahrnuje 3 známé členy, DNMT3a, DNMT3b a DNMT3L. Tyto

metyltransferázy DNMT3a a DNMT3b jsou důležité pro „*de novo*“ metylace a zároveň zprostředkovávají metylace nezávislé na represi genu (Okano, Bell et al. 1999). DNMT3a i 3b interagují s DNMT1, přičemž bylo dokázáno, že metyltransferáza DNMT3b kooperuje s DNMT1 a ovlivňuje její funkci v některých rakovinných buňkách (Rhee, Bachman et al. 2002).

Bylo dokázáno, že DNMTs neovlivňují represi transkripce pouze navázáním metylové skupiny, ale také pomocí proteinů, které váží. Každá DNA metyltransferáza přímo interaguje s histon deacetylázami a může je navést do místa promotoru. To pak má za následek, že DNA vytvoří komplex s proteiny v oblasti promotorů, což může vést k represi transkripce (Herman a Baylin 2003). V leukemických buňkách například dochází k přesunu proteinu do promotorů genů s vysokou transkripční aktivitou (Di Croce, Raker et al. 2002).

2.4.6 Klinický význam epigenetických změn v průběhu karcinogeneze

Epigenetické změny jako metylace mají jednu velkou výhodu a to, že tyto změny na DNA mohou být reversibilní. V poslední době byla proto věnována pozornost látce 5-azacytidinu, u které bylo na leukemických buňkách dokázáno, že reaktivoval gen inhibitoru cyklin dependentní kinázy p15, který byl umlčen pomocí hypermetylace promotorové oblasti (Daskalakis, Nguyen et al. 2002). Látky jako 5-azacytidin nebo deoxy-5-azacytidin, které se do DNA inkorporují s větší specifitou než 5-azacytidin, mohou být využity nejen k samotné léčbě, ale i v prevenci. Nevýhodou je zatím nízká stabilita těchto látek.

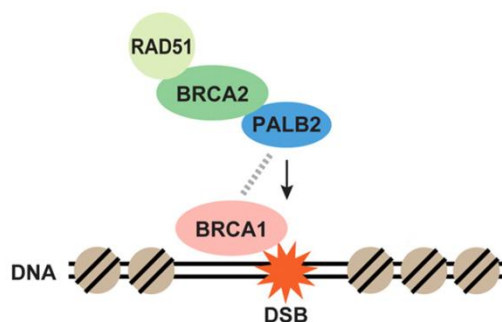
V neposlední řadě nám tyto změny slouží jako dobré markery možné začínající tumorogeneze. Hypermetylace promotorových oblastí genů je velmi častá v různých typech karcinomů (Esteller, Corn et al. 2001). Díky tomu je snadná detekce genů, které se podílely na rozvoji tumorogeneze a jejich mapování. Tyto epigenetické změny jsou detekovatelné až o několik let dříve než dochází než klinickým projevům (Palmisano, Divine et al. 2000) a jsou slibným nástrojem pro včasnou diagnostiku.

2.5 FUNKCE TUMOR SUPRESORU PALB2

PALB2 (Partner And Localizer of BRCA2) je gen, jehož proteinový produkt se podílí na opravách poškozené DNA cestou homologní rekombinace a tím hraje klíčovou roli v udržování genomové integrity.

2.5.1 Homologní rekombinace

Při poškození DNA mohou vznikat dvouřetězcové zlomy, které indukují spuštění signální dráhy vedoucí k jejich opravení. Do blízkosti takovýchto zlomů se prvotně váží MRN komplexy (Mre11, Rad50 a Nbs1), které vytvářejí jednořetězcové přesahy DNA vlákna, na které se posléze váže protein RPA (replikační protein A). Do blízkosti zlomu se váže i protein BRCA1, který navádí komplex BRCA2 s rekombinázou RAD51 pomocí linkeru PALB2 do místa zlomu (obrázek č. 4) (Zhang, Ma et al. 2009). Rekombináza RAD51 po lokalizaci oligomerizuje na jednořetězcových přesazích a takto vzniklý nukleoprotein napadá dvoušroubovici DNA v oblasti identických sekvencí sesterského vlákna. Poté dojde k invazi ramen, prodloužení 3' konce vlákna, vzniku Hollidayovy struktury a homologní rekombinaci.



Obrázek č. 4 - Schématické znázornění způsobu navedení rekombinázy RAD51 do místa dvouřetězcového zlomu na DNA pomocí komplexu BRCA2-PALB2-BRCA1. Protein BRCA1 je navázán v blízkosti zlomu a navádí rekombinázu RAD51 v komplexu s BRCA2. Tato vazba je zprostředkována pomocí vazby na linker PALB2 (Převzato a upraveno z Hayakawa, Zhang et al. 2010).

2.5.2 BRCA1

Gen *BRCA1* (Breast Cancer Susceptibility Gene 1) patří společně s genem *BRCA2* mezi hlavní predispoziční geny asociované s rozvojem karcinomu prsu a ovaria (Miki, Swensen et al. 1994). Protein BRCA1 je v důsledku poškození DNA hyperfosforylován a následně se váže a hromadí v místech označených PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) v blízkosti zlomu DNA (Scully, Chen et al. 1997). Tento krok v procesu zastavení buněčného cyklu a zahájení opravy

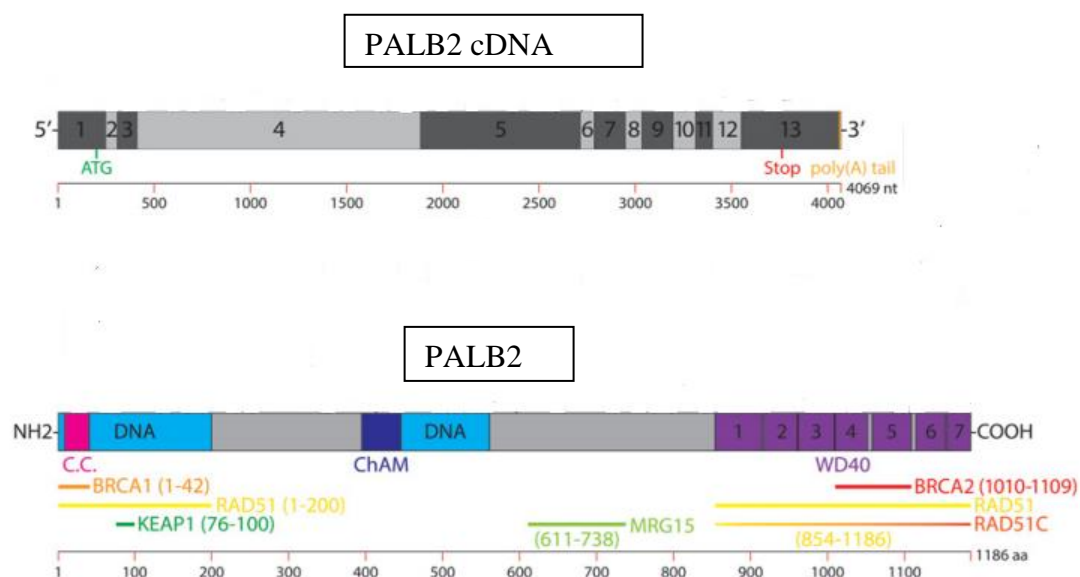
dvouřetězcového zlomu mechanismem homologní rekombinace je proveden BRCA1 proteinem v komplexu s proteinem BRCA2 (Chen, Silver et al. 1998). Funkční spojení těchto proteinů zajišťuje právě protein PALB2, což bylo později potvrzeno více studiemi (Sy, Huen et al. 2009, Zhang, Fan et al. 2009, Zhang, Ma et al. 2009). BRCA1 váže přes coiled-coil motiv své „pre-BRCT“ domény coiled-coil motiv PALB2 (Sy, Huen et al. 2009). Vzhledem k tomu, že pro navázání celého BRCA komplexu (BRCA1-PALB2-BRCA2-RAD52) je nejdůležitější prvotní navázání BRCA1 na DNA k místě zlomu, funguje tedy BRCA1 jako „up-stream“ regulátor (Zhang, Fan et al. 2009).

2.5.3 BRCA2

Gen *BRCA2* byl objeven jako jeden z genů mající podíl na vzniku rakoviny prsu. Proteinový produkt tohoto genu má esenciální funkci v homologní rekombinaci. Jeho hlavní úlohou je napomáhat rekombináze RAD51 vázat se na DNA vlákno v místě dvouřetězcového zlomu v jádře přímou interakcí (Davies, Masson et al. 2001). Tato vazba byla potvrzena již dříve v *BRCA2* deficientních buňkách, které nedokázaly lokalizovat dvouřetězcový zlom (Sharan, Morimatsu et al. 1997). Další studie později poukázaly na další funkce. *BRCA2* stimuluje tvorbu filament RAD51 na jednořetězcovém přesahu ssDNA, které je chráněno RPA, zabraňuje tvorbě filament na dsDNA, inhibuje disociaci RAD51 filament jako důsledku ATP hydrolýzy a stimuluje aktivitu RAD51 filament (Davies, Masson et al. 2001, Jensen, Carreira et al. 2010, Liu, Doty et al. 2010, Thorslund, McIlwraith et al. 2010).

2.5.4 PALB2

Gen *PALB2* byl identifikován roku 2006 kdy byl jeho proteinový produkt nalezen jako součást endogenního *BRCA2* komplexu (Xia, Sheng et al. 2006). Nachází na krátkém raménku chromozomu 16 v pozici 12.2. , skládá se z 13 exonů a kóduje protein o 1186 aminokyselinách (131kDa) (Tischkowitz a Xia 2010). Protein PALB2 je lokalizován v jádře na chromatinu, což koresponduje se subnukleární lokalizací *BRCA2* a rekombinázou RAD51. Od doby jeho objevení byla přesně charakterizována struktura proteinu PALB2 a bylo popsáno více proteinových domén podílejících se na interakci s DNA a dalšími proteiny (obrázek č. 5).



Obrázek č. 5 – Grafické znázornění genu *PALB2* s umístěním a velikostí exonů na cDNA (*PALB2* cDNA) a vazebných domén na proteinovém produktu (*PALB2*). Převzato a upraveno z Pauty, Rodrigue et al. 2014).

Na N-terminálním konci je tzv. coiled-coil motiv, který zprostředkovává interakci s proteinem BRCA1 a zároveň *PALB2* homodimerizaci (Buisson a Masson 2012). Při absenci tohoto motivu dochází ke zvýšení sensitivity buňky na látky způsobující poškození DNA, stejně jako při absenci celého proteinu *PALB2*, což napovídá, že vazba BRCA1 přes coiled-coil motiv je esenciální pro navedení celého opravného komplexu, specificky rekombinázy RAD51 do místa zlomu a formaci jeho filament na DNA vlákne v místě zlomu (Buisson a Masson 2012). Zároveň lokalizace *PALB2* není nezbytná pro lokalizaci BRCA1, což naznačuje že BRCA1 je „upstream“ regulátor proteinu BRCA2 a *PALB2* (Zhang, Ma et al. 2009).

Za nepřítomnosti poškození se *PALB2* vyskytuje v jádře jako málo aktivní dimer. Za tvorbu dimeru zodpovídá také právě coiled-coil motiv na jeho N-konci. Po vzniku dvouřetězcového zlomu na DNA *PALB2* disociuje a interaguje s BRCA1, což umožní lokalizaci *PALB2* a aktivaci homologní rekombinace (Buisson a Masson 2012).

Na C-konci *PALB2* interaguje přes oblast tzv. „seven-bladed“ WD 40 repetice (repetice aminokyselin tryptofanu a kyseliny asparagové) se svým hlavním

interakčním partnerem BRCA2. Zároveň bylo zjištěno, že na oblast WD 40 se přímo váže RAD51. U některých pacientů s karcinomem prsu byla zaznamenána zkrácená forma proteinu právě o oblast WD40, což vedlo ke snížení efektivity vazby RAD51 a BRCA2. Poslední studie také objevily, že na oblast WD40 se váže polymeráza η (Pol η), což má v konečném důsledku vliv na správný průběh pozdní homologní rekombinace. Polymeráza η je důležitá při Pol η -dependentní DNA syntéze v D-smyčce. Tato polymeráza se však účastní pouze homologní rekombinace, která je asociována s DNA replikací (Buisson, Niraj et al. 2014).

Další doménou je tzv. ChAM motiv (chromatin-association motif). Tento motiv je evolučně konzervovaný a zprostředkovává asociaci s chromatinem jak v poškozených tak ve zdravých buňkách. Při absenci tohoto motivu byl sledován trend klesající akumulace PALB2 a RAD51 v místech dvouřetězcových zlomů a vyšší citlivost k činidlům (mitomycinu C) způsobujících zesíťování DNA (ICLs- interstrand crosslinks) (Bleuyard, Buisson et al. 2012).

2.5.5 PALB2 a další interakční partneři

2.5.5.1 KEAP1 a oxidativní stres

PALB2 má mimo jiné i úlohy v signalizaci buněčného stresu. PALB2 dokáže reagovat s proteinem KEAP1. KEAP1 (Kelch-like ECH-Associated Protein 1) je sensor oxidativního stresu bohatý na cystein. V normálních podmínkách v buňce KEAP1 váže NRF2 (Nuclear Factor – Erythroid 2 – Related Factor 2), funguje jako E3 ubikvitin ligáza a určuje NRF2 k degradaci. V případě, že v buňce nastane oxidativní stres, cysteinové zbytky KEAP1 jsou modifikovány, přeruší se vazba s NRF2 a váže se místo něj PALB2. Takto uvolněný NRF2 funguje jako transkripční faktor a v jádře iniciuje expresi ARE (antioxidant-response elements). Bioinformatické analýzy identifikovali KEAP1 vazebné místo na PALB2, motiv 7 aminokyselin (LDEETGE), který je v savcích vysoce evolučně konzervovaný a je částečně identický s ETGE motivem na NRF2, který je zodpovědný za vazbu s KEAP1 v jádře (Ma, Cai et al. 2012).

2.5.5.2 MRG15

MRG15 je konzervovaný protein s chromodoménou na svém N-konci, který asociuje s histon deacetylázou a zároveň je součástí histon acetyl transferázového komplexu (HAT) (Hayakawa, Ohtani et al. 2007). MRG15 protein se váže do střední části proteinu PALB2 a pravděpodobně napomáhá jeho lokalizaci do dvouřetězcového zlomu. Hlavní úloha tohoto proteinu je především v regulaci transkripce a ovlivňování struktury chromatinu (Strahl a Allis 2000), ale některé studie ukazují i pravděpodobnou úlohu v opravách dvouřetězcových zlomů. (Doyon a Cote 2004; Kusch et al. 2004). MRG15 interaguje s histonem H2B, rozvolňuje chromatin a navádí do míst zlomů proteiny důležité pro reparaci zlomů (Hayakawa, Zhang et al. 2010). Zároveň se účastní signalizace dvouřetězcového zlomu. Přesnější spojení s PALB2 je předmětem vyšetřování.

2.6 HEREDITÁRNÍ KARCINOM PRSU

Patogenní mutace genu *PALB2* byly nalezeny napříč všemi populacemi světa v menší či větší míře, čili jeho role při vzniku hereditární formy karcinomu prsu je nesporná. Frekvence mutací je 0,6 – 3,4 % u *BRCA1* a *BRCA2* negativních rodin (Casadei, Norquist et al. 2011). Mezi patogenní mutace patří sestřihové mutace s posunem čtecího rámce, posunové mutace a nonsense mutace (Hellebrand, Sutter et al. 2011). Tyto mutace nevykazují žádné „hot-spots“, vyskytují se po celé oblasti genu. Byly však nalezeny tzv. „founder“ mutace – populačně specifické mutace unikátní pro daný geografický region.

V České republice je frekvence patogenních mutací relativně vysoká, dosahuje hodnot až 5,5 % (Janatova, Kleibl et al. 2013). Relativní riziko rozvoje tumoru u nosiček mutace v genu *PALB2* může dosahovat až 6,1 (Erkko, Dowty et al. 2008). Na základě těchto studií je gen *PALB2* řazen do skupiny středně penetrantních genů vyššího řádu a v některých případech může riziko mutací být srovnatelné s rizikem mutací v genu *BRCA2* (Southey, Teo et al. 2010).

2.7 FANCONIHO ANÉMIE

Vrozená bialelická mutace genu *PALB2*, stejně jako u jeho hlavního interakčního partnera *BRCA2*, způsobuje Fanconiho anémii. Toto autozomálně

recesivní onemocnění je velmi vzácné a je výsledkem mutací v genech regulujících opravy ICLs (interstrand crosslinks). Proteinové produkty těchto genů se společně podílejí na signální dráze tzv. FA-BRCA cesta (Kee a D'Andrea 2010). Fanconiho anémie je rozdělena do 15 subtypů podle genu, který onemocnění zapříčiní. U genu *PALB2* hovoříme o Fanconiho anémii subtypu N (FANCN), u kterého je zřetelná fenotypová podobnost se subtypem FANCD1, který je odvozen od genu *BRCA2* (Reid, Schindler et al. 2007). Fanconiho anémie je charakteristická hypersenzitivitou k činidlům způsobující meziřetězcové spoje (ICLs), např. mytomycin C a diepoxybutan, zvýšeným výskytem chromozomových aberací, což v konečném důsledku může vést ke vzniku malignit v nízkém věku (Kutler, Singh et al. 2003).

2.8 PALB2 A JINÁ NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Podobně jako *BRCA1/2* geny se i gen *PALB2* podílí na rozvoji dalších nádorových onemocnění. Gen *PALB2* je druhým nejčastěji mutovaným genem u hereditárních karcinomů pankreatu (Jones, Hruban et al. 2009). Byla popsána jeho úloha i při vzniku karcinomu ovaria (Dansonka-Mieszkowska, Kluska et al. 2010). Některé studie také uvádějí *PALB2* jako predispoziční gen pro hereditární karcinomy prostaty (Tischkowitz, Sabbaghian et al. 2008, Pakkanen, Wahlfors et al. 2009). U karcinomu prsu u mužů je role tohoto genu sporná. V některých studiích byly patogenní varianty genu nalezeny u mužů s karcinomem prsu, jiné studie roli tohoto genu u karcinomu prsu u mužů nepotvrdily (shrnutí v Vietri, Caliendo et al. 2015).

3 CÍLE PRÁCE

Gen *PALB2* patří mezi významné predispoziční geny při vzniku hereditárního karcinomu prsu.

Výsledek studií patogenních mutací genu *PALB2* ukazuje, že frekvence výskytu těchto mutací dosahuje v jednotlivých populacích ve vysoce rizikových rodinách s vícečetným výskytem karcinomu prsu 1 – 3,4 %. V ČR je oproti jiným regionům vyšší a lze tedy předpokládat, že analýza tohoto genu může být klinicky významná. Role tohoto genu v patogenezi sporadických karcinomů prsu ale není stále zcela jasná.

Tato diplomová práce se zabývá studiem inaktivace genu *PALB2* v tumorogenezi sporadického karcinomu prsu a skládá se z několika dílčích cílů.

- 1) Studium výpadků alely genu *PALB2* pomocí analýzy ztráty heterozygosity (LOH) přiléhajících mikrosatelitových markerů.
- 2) Studium metylace promotorové oblasti genu *PALB2* jako možného epigenetického způsobu jeho inaktivace:
 - a. optimalizace metody bisulfite sequencing.
 - b. analýza promotorových oblastí.
- 3) Analýza somatických mutací genu *PALB2* u nádorů s LOH či hypermetylací promotoru pomocí přímého sekvenování celé kódující sekvence.

4 METODY A MATERIÁL

4.1 MATERIÁL

VZORKY

Vzorky nádorové tkáně pro analýzy tumor supresorového genu *PALB2* byly odebrány pacientkám operovaných na Gynekologicko-porodnické klinice a I. Chirurgické klinice 1. LF UK a VFN. Při peroperační biopsii byla odebrána část nádoru, která byla zmrazena v tekutém dusíku a skladována při -80°C a zároveň byla odebrána okolní nenádorová tkáň. K analýze bylo k dispozici 51 nádorů a odpovídajících referenčních vzorků periferní krve.

Z každého vzorku nádoru byly standardním postupem připraveny dva histologické řezy a obarveny hematoxylinem-eozinem. V případě, že vzorky obsahovaly méně než 50 % nádorových buněk, byly vyřazeny ze souboru.

DNA z referenční nenádorové tkáně byla izolována z 5 ml periferní krve každé pacientky.

Všechny vzorky byly odebrány s písemným souhlasem pacientek o genetickém vyšetření a tyto protokoly byly schváleny etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice.

IZOLACE GENOMICKÉ DNA

Pro účely této práce byl použit genetický materiál, který byl izolován pro analýzy tumor supresorových genů *BRCA1*, *BRCA2* a *p53* v rámci předešlých projektů.

Izolace DNA z periferní krve

Genomická DNA byla izolovaná ze 400 μl materiálu pomocí Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) podle přiloženého návodu.

Izolace DNA ze zmražené tkáně

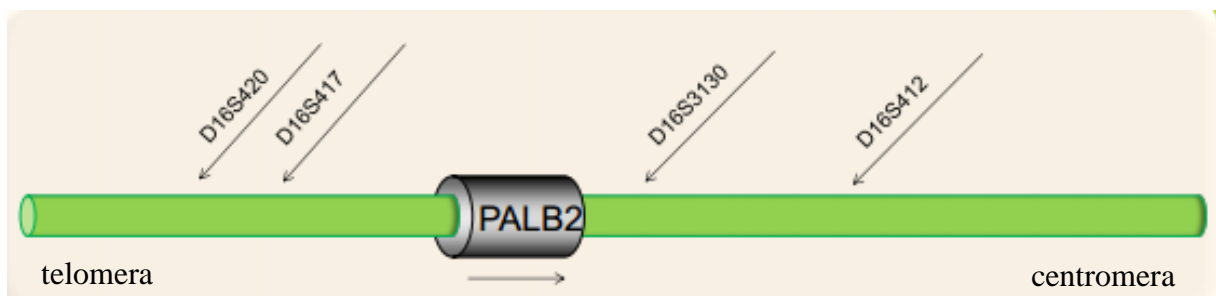
DNA ze zmražené tkáně byla izolována s DNeasy Tissue Kitem (Qiagen, SRN). Z nádoru byla za sterilních podmínek oddělena část o hmotnosti cca 25 – 50 mg a přenesena do 1,5 ml zkumavky s odpovídajícím množstvím lyzačního pufru. Postup izolace byl proveden dle přiloženého návodu.

4.2 METODY

4.2.1 Analýza ztráty heterozygosity

4.2.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR – polymerase chain reaction) – amplifikace mikrosatelitových markerů

Pro analýzu ztráty heterozygosity byly vybrány 4 mikrosatelitové markery (D16S420, D16S417, D16S3130, D16S412), které přiléhají ke genu *PALB2* a to dva z centromerické a dva z telomerické strany (obrázek č. 6). Pro jejich amplifikaci byly navrženy primery značené fluorescenčním barvivem 6-FAM (tabulka č. 1), které umožňuje detekci vzniklých PCR produktů po kapilární elektroforéze v genetickém analyzátoru.



Obrázek č. 6 – Schématické znázornění polohy mikrosatelitů vzhledem k poloze genu *PALB2* na krátkém raménku chromozomu 16. Šipkou znázorněn směr transkripce vzhledem k orientaci krátkého raménka chromozomu. Gen *PALB2* se nachází na reverse vlákne DNA.

Název mikrosatelitu	Sekvence primeru	Vzdálenost od <i>PALB2</i>
D16S417	F 6FAM-TCCTTCTTCCCATAACAACA	-43,317bp (upstream)
	R GGATAATGAGTCTCTCTTTCCC	
D16S420	F 6FAM-ACAAGGGTTATGGGAGGTATGAG	-502,369 bp (upstream)
	R GGCAATATAGTGAGAATACAGTAG	
D16S3130	F 6FAM-GTGTGAGCCACCATGC	+421,671 bp (down stream)
	R TTATTTATGTCAACAAGTAGTGGG	
D16S412	F 6FAM-GCCTGGTTGTTAGAGTGAGA	+ 571,274 bp (downstream)
	R CTTACTCATTATTCGGTACCCA	

Tabulka č. 1 – Primery pro amplifikaci mikrosatelitových oblastí.

Primery byly naředěny na koncentraci 20 pmol/μl.

PCR genomových fragmentů probíhala v 10 μl směsi, která obsahovala:

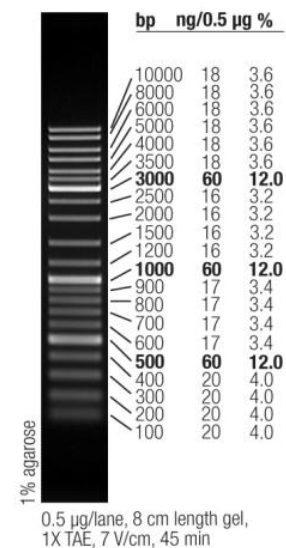
- 1 μl PCR pufr (10 mM tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; Fast Start Taq DNA Polymerase – PCR Buffer, Roche)
- 0,2 mM dNTPs (dNTPs Mix – PCR Grade Nucleotide Mix, Roche)
- 0,2 μl forward primeru + 0,2 μl reverse primer
- 0,4 U DNA polymerázy (Poly-Fast-Start Taq DNA polymerase, Roche)
- 50 – 100 ng genomové DNA.

Amplifikace v termocykléru (Bio-rad, USA) zahrnovala úvodní denaturaci 5 minut při 95°C, 35 cyklů – 20 sekund při 95°C, 20 sekund při 60°C a 30 sekund při 72°C – a závěrečnou elongaci 10 minut při 72°C.

4.2.1.2 Elektroforéza PCR amplikonu

Pro ověření účinnosti PCR, jsme provedli elektroforézu amplifikovaného fragmentu. Na 1,5 % agarózový gel bylo nanášeno 5 μl PCR produktu s 1 μl 6x DNA pufru. Jako velikostní marker byl použit Gene Ruler™ – DNA Ladder Mix (Fermentas) (obrázek č. 7). Pro vizualizaci DNA bylo do gelu přidáno fluorescenční barvivo GelRed v ředění 1:10000 (Biotium). Elektroforéza byla pouštěna pro 7 cm gel na 70 V.

GeneRuler DNA Ladder Mix



Obrázek č. 7 – Znázornění velikostního markeru na agarózovém gelu.

4.2.1.3 Fragmentační analýza na genetickém analyzátoru ABI3130 (Applied Biosystems, USA)

Fragmentační analýza na automatickém sekvenátoru byla použita pro přesné určení délek a relativní kvantifikaci jednotlivých alel amplifikovaných mikrosatelitových markerů. K 9 μ l formamidu (HiDiTM Formamide, AB Life Technologies) a 0,4 μ l velikostního standardu (Gene Scan-600 LIZ – Size standart, AB Life technologies) byl přidán 1 μ l PCR produktu. Směs byla denaturována 2 minuty při 95°C a ihned ochlazená na 4°C v předchlazeném kovovém bločku. Rozdělení PCR produktů dle délky probíhalo na 36 cm dlouhé kapiláře plněné polymerem POP-7 a elektroforéza probíhala za denaturujících podmínek dle pokynů výrobce. Snížení jedné z alel v nádorové tkáni o 50 a více procent bylo vyhodnoceno jako ztráta heterozygosity. K výpočtu bylo použito srovnání ploch pod „píkem“ pomocí software GeneMapper verze 3.7.1 (Applied Biosystems, USA).

4.2.2 Analýza somatických mutací (Sekvence DNA)

U vzorků vykazujících ztrátu heterozygosity byla provedena analýza somatických mutací přímým sekvenováním. K sekvenaci byly použity pouze vzorky DNA z nádorové tkáně. Byly navrženy primery pokrývající celou kódující oblast genu *PALB2*. Jednotlivé exony a přilehlé intron-exonové spoje byly u každého vzorku amplifikovány za stejných podmínek jako mikrosatelitové markery (viz kapitola 4.2.1.1). Sekvence použitých primerů jsou v tabulce č. 2. Přítomnost PCR produktu byla ověřena na gelové elektroforéze.

Primer lokalizace	Sekvence primeru
1 exon	F GGCTGCTCTTTTCGTTCTGTC R GACACAAAGCCAGGCCTAAA
2 exon	F GACTCCACCTTTCCACTTGC R GAGACAAAAACAGCCCCAGAAA
3 exon	F AGAAAACGTATTTCTGGGGCTG R CAATAGCCAAAATATACCTGGGAAATG
4 exon	F TCATCTGCCTGAATGAAATGTCAC R CACTTGGCCCTGTCACTTTT
5 exon	F TGTTGGGTTTTGTTACTATTTTGTGAC R GCAAGTCATGCTGTTTACATTCAC
6 exon	F AGTGGGTAATGCAGGCAGA R CATATGTAAGACACGAGACACTGG
7 exon	F TGCTTTGCATAAAACAGCACTC R TGGTAAGCTGCCCATCTACA
8 exon	F ACCAAGCATAATTTTTGGCTGC R TGCACTTAAAACCAGCTGACA
9 exon	F ATTAAAAGGTTACTCCTCACATCACC R TTACCCAACCTTTCTCTGAAACCTG
10 exon	F CCTAGAGACTGCTTTAGTGCAAAG R CTACAGATGAGGGAACTGAGGAC
11 exon	F GTTTGTTGGAAGAATGTGATCAGC R CTGCTTATGACTTACTGCTCTCAC
12 exon	F GTTTGGTTTTTTGTCTCTGCCAG R GTGTTTGCACAGTGCCTTTC
13 exon	F TTTGGATATGTAATCTGAATTATATCTTCTTTG R AGGCCCAATATATCCAGAAAATTG

Tabulka č. 2 – Sekvence primerů pro amplifikaci jednotlivých exonů genu *PALB2*. F – forward, R – reverse.

Po ověření přítomnosti PCR produktu na agarózovém gelu byl PCR produkt purifikován smícháním 1 μ l PCR produktu s 1,2 μ l H₂O a s 0,6 μ l ExoSAP-IT (ExoSAP-IT, Affymetrix), který obsahuje exonukleázu I a alkalickou fosfatázu, jejichž působením dojde k odstranění zbytků primerů a dNTPs před následující sekvenční reakcí. Vzorky byly poté vloženy do termocykléru na program:

1. 15 minut – 37°C
2. 15 minut – 80°C

Po přečištění byla provedena sekvenační reakce obsahující:

- 1 µl pufru (BigDye Terminator v1.1 v & v3.1 5X Sequencing Buffer, Life Technologies)
- 0,5 µl BigDye Mix terminator 3.1 obsahující fluorescenčně značené dideoxynukleotidové terminátory (Life Technologies)
- 0,2 µl sekvenačního primeru (tabulka č. 2 a 3)
- 0,5 µl H₂O

exon	primer	exon	primer
1	reverse	8	reverse
2 + 3	reverse	9	reverse
4	forward + reverse	10	forward + reverse
5	forward + reverse	11	reverse
6	reverse	12	forward
7	reverse	13	forward + reverse

Tabulka č. 3 – Přehled primerů použitých pro sekvenaci jednotlivých exonů genu *PALB2*.

Tento sekvenační mix byl vložen do termocykléru na program:

1. 3 minuty – 96°C

a 25 cyklů:

2. 10 sekund – 96°C

3. 5 sekund – 50°C

4. 4 minuty – 60°C

Produkty sekvenační reakce byly připraveny pro analýzu pomocí acetát/etanolové precipitace podle následujícího postupu:

1. přidat 1,3 µl NaAc (0,1 M acetát sodný), 30 µl 100 % etanolu a 1,3 µl 4mM EDTA

2. centrifugovat (14 000 rpm, 20 minut při 4°C)

3. odstranit supernatant
4. přidat 60 μ l 70 % etanolu
5. centrifugovat (14 000 rpm, 20 minut při 4°C)
6. odstranit supernatant
7. precipitát vysušit 4 minuty při 90°C v termocykléru.

K precipitátu bylo přidáno 12 μ l formamidu a směs denaturována 2 minuty při 95°C a ihned ochlazená na 4°C v předchlazeném kovovém bločku. Takto připravený vzorek byl analyzován na automatickém sekvenátoru ABI3130 (Applied Biosystems). K analýze sekvencí byl použit program FinchTV 1.3.1 (Geospiza, Inc.).

4.2.3 Analýza hypermetylace promotorové oblasti

4.2.3.1 *Princip bisulfitové modifikace*

Nejpoužívanější technikou k detekci metylací ve vzorcích je metoda bisulfitové konverze. Tato metoda je založena na modifikaci DNA bisulfitem sodným (hydrogensířičitan sodný, NaHSO), který konvertuje nemetylované cytosiny na uracily. V následující PCR reakci je metylcytosin amplifikován jako cytosin, kdežto uracil jako tymin. Metylované cytosiny mohou být poté determinovány například sekvenováním.

4.2.3.2 *Bisulfitová modifikace*

Pro bisulfitovou modifikaci promotorové sekvence byl vybrán Kit EZ DNA Methylation – Gold™ Kit (Zymo Research). Pomocí toho kitu byla provedena teplotní denaturace a bisulfitová konverze DNA ve vzorku. Reagencie byly připraveny dle přiloženého oficiálního protokolu (instruction manual – EZ DNA Methylation – Gold™ Kit).

Mix DNA (500 ng) určené k modifikaci s CT konvertujícím činidlem byl inkubován v termocykléru během programu:

1. 98°C – 10 minut
2. 53°C – 4 hodiny
3. 4°C – po zbytek času

Modifikovaná DNA byla dále přečištěna dle přiloženého návodu na kolonkách a eluována do 10 µl vody.

4.2.3.3 Navržení primerů pro amplifikaci modifikované DNA

Sekvence promotorové oblasti byla vybrána na základě internetových databází UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>) a Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)

Byla vybrána část promotoru od – 982 bp upstream do + 22 bp downstream v *PALB2* mRNA od iniciačního ATG kodonu o celkové délce 1155 bp, zaujímající 22,2 % celkové promotorové oblasti s nejvyšším zastoupením CpG dinukleotidů (86 CpG z celkového počtu 152) (obrázek č. 8 a 9).

```

CCAACACGGTGAAACCCCGTCTCTACCAAAAAATACAAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCGGGCGCCT
GTAATCCCAGCTACTCGAGACGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAAACCCGGGAGGCGGGAGGTTGCAGT
GAGCAGAGATCGCGCGCGGCCCTCAGGACTGGGCGACAGAGTCTCCGCCCCCAACCCCTTCCTC
AAAAAAAAAGAACCGAATCGTTTTTTAGCGCAAGTTAACAGATACAAAAGGCAGTGTAAAAGGGCCCG
AAGTCGAGCTGTAATTCGTATGAACAGGATGGGACTTGTCTATCCTCCCGAAGGCACTTTACCCC
TATGAGAAAATCAGGAATAAATACAAAAGGCCTCAACTGGCCAAGCGCGGAGTAAACAGCAAAGCCA
GACGGTTACACGGGGCATCGCTAGATAATCGGGACTAATGGCCAAAGGGACAGGGGTTGGTGGGGTA
GGGGCAGGTTGGGAACGCCGACCAGGCCTCAAAGGGACGCAGGGTTGGAAAGAGGAGGATACATATC
TGGACCCGCGCACCGTCTCGATGTACTCAGACTTGTGTAGAGCAGCTCGCCCAACTCCATGGCCGC
CGCCTCTTCCCTCAGCCCCGGATCCTGTCAGAGTCAGTCGGTCAGTCTTTCAGAGATTCGGCTAC
TTCGGCCGCTCTCCACTTCGCTCCAGGTGGCCACTGGGACTCATCGACAGCGCGGCTCTCCTT
TAGGCGGCCTCGCTCCACTGCTCGGCCGTCTACGGCTGCGCGTGCGCAGGCCGAATGGTGGATTTAA
TTGGCCGGAGTTTAGGGCGCGCTTGGCCCGCGTGGGTGAGCTGATCGCGCACTGAGGGTCGATCCC
GGGCTCCCCATTCCTTCCCTGGGGCGCCTCCCCGGCCAGGGCCAACTGGGTTCCCGGTTGTCGGCAGGC
CTGGGGTCGGCGACCGGCTGCTCTTTTCGTTCTGTCGCCTGCCCGATGACCGAGCCTCCCGGGAAGCC
CCTCAGCTGTGAGGAGAAGGAAAAGGTGCCGGGGTGCGGGAAGGGCGGACCGCAGGACTCTGACCCC
GCTTTCCAGGGTTTTAGGCCTGGCTTTGTGTCTCGGCAGTCGAGGGCAGCAGTATCATCTGACC
ACCCCTCCTCTTAGG

```

Obrázek č. 8 – Vybraná oblast promotoru genu *PALB2* se zastoupením CpG dinukleotidů (modře). Žlutě vyznačen ATG iniciační kodon.


```

TTAAATACGGTGAAA TTT CGTTTTTATTAAAAAATAAAAAATTAGTCGGGCGTGGTGGCGGGCGTTT
GTAA TTTTAGTTATT CGAGACGGTTGAGGTAGGAGAA TCGTTTTGAATTCGGGAGGCGGAGGTTGTAGT
GAGTAGAGATCGCGTCGCGTTTTTTAGGATTTGGGCGATAGAGTTTTTCGTTTTTTAA TTTTTTTTTTTT
AAAAAAAAAAGAA TCGAATCGTTTTTAGCGTAAGTTAATAGATATAAAAAGGTAGTGTAAAAGGTTCG
AAGTT CGAGTTGTAATT CGTATGAATAGGATGGGATTTGTTTTATTTTTTCGAAGGTATTTTTATTT
TATGAGAAAA TTAGGAATAAATAAAAAGGTTTTAA TTTGGTTAAGCGCGGAGTAAATAGTAAAGTTA
GACGGTATACGGGGTATCGTTAGATAAATCGGGATTAATGGTTAAAGGGATAGGGGTTGGTGGGGTA
GGGGTAGGTTGGGAA CGTCGATTAGGTTTTAAAGGGACGTAGGGTTGGAAAGAGGAGGATATATATT
TGGATT CGCGTATCGTTTCGATGTATTTAGATTTGTTGTAGAGTAGTT CGTTTTA TTTTTATGGT CGT
CGTTTTTTTTTTTTTAGTTTCGGATTTTTGTTAGAGTTAGT CGGTTAGTTTTTTAGAGATTT CGGTTAT
TTTCGGTCGTTTTTTTTATTTTTCGTTTTAGGTGGTTTTATTGGGATTTATCGATAGCGCGTTTTTTTT
TAGGCGGTTTCGTTTTATTGTT CGGTTCGTTTACGGTTGCGCGTCCGTAGGTCGAATGGTGGATTTAA
TTGGT CGGAGTTTAGGGCGCGTTTGGTT CGCGTGGGTTAGTTGATCGCGTATTGAGGGTTCGATTTTC
GGGTTTTTTATTTTTTTTTGGGGCGTTTTTTTCGGTTTTAGGGTTAATTTGGGTTTCGGTGTTCGGTAGGT
TTGGGGTTCGGCGACGGTTGTTTTTTTTCGTTTTTGTTCGTTTGTTCGATGACAGTTTTTTTCGGGAAGTT
TTTTAGTTGTGAGGAGAAGGAAAAGGTGT CGGGGGTTCGGGAAGGGCGGACGTAGGATTTTGA TTTTC
GTTTTTTTTAGGGTTTTAGGTTTTGGTTTTGTGTTTT CGGTAGTT CGAGGGTAGTAGTATTTATTTGATT
ATTTTTTTTTTTTTTAGG

```

Obrázek č. 9 – Vybraná oblast promotoru genu *PALB2* po bisulfitové modifikaci, na kterou byly navrženy primery pro amplifikaci a následně sekvenování. CpG dinukleotidy (modře). Tyminy a konvertované cytosiny na tyminy mimo CpG ostrovy (červeně). Žlutě je vyznačen iniciační kodon ATG.

Navrhování PCR primerů se musí řídit určitými pravidly, kvůli „ztracené“ jedné bázi (cytosinu). Tyto primery musí být delší cca 26 – 30 bází. DNA po bisulfitové konverzi je méně stabilní a doporučovaná velikost amplikonu takto modifikované DNA je 500 bp – 600 bp. Proto byly navrženy 4 páry primerů pro amplifikaci oblasti promotoru ve čtyřech kratších amplikonech o délkách 300 bp – 400 bp. V navrhování sekvence primeru byla snaha se vyhnout CpG ostrovům, popřípadě je směřovat na 5' konec. Primery byly navrženy tak, aby nasedaly na modifikovanou DNA (viz tabulka č. 4).

Tyto primery byly označeny následovně:

PB2_PR_1f + PB2_PR_1Ar velikost amplikonu 331 bp

PB2_PR_1Bf + PB2_PR_1r velikost amplikonu 297 bp

PB2_PR_2f + PB2_PR_2Cr velikost amplikonu 366 bp

PB2_PR_2Df + PB2_PR_2r velikost amplikonu 349 bp

název primeru	sekvence primeru
PB2_PR_1f	GAGGTTAAGAGTTAGGGATTTGTTTGG
PB2_PR_1Ar	TAAAACAAATCCCATCCTAATTCATAC
PB2_PR_1Bf	GTTAACAGATACAAAAGGCAGTGTA AAAAGG
PB2_PR_1r	AACTACTCTACAACAAATCTAAATAC
PB2_PR_2f	GGTTGGAAAGAGGATATATATTTG
PB2_PR_2Cr	AAACCCAATTAACCCTAAACC
PB2_PR_2Df	GGTYGAATGGTGGATTTAATTGG
PB2_PR_2r	CATTTTCATTTTCTATACCCCTCAAC

Tabulka č. 4 – Sekvence primerů pro amplifikaci bisulfitem modifikovaného promotoru genu *PALB2*. Y v sekvenci PB2_PR_2Df značí CpG místo na vlákně, kde se může vyskytovat jak cytosin, tak tymin. f – forward, r – reverse.

4.2.3.4 Optimalizace podmínek amplifikace

Pro správný průběh PCR bylo nutné optimalizovat podmínky amplifikace, protože anelační teplota (T_m) ovlivňuje výslednou specifickou PCR. Při nízkých teplotách mohou primery nasedat nespecificky, tvořit vlásenky nebo tzv. primer – dimery. Naopak při vysokých teplotách je znemožněna hybridizace primerů s cílovou sekvencí a je snížena účinnost PCR.

Bylo optimalizováno množství modifikované DNA a primerů v 10 μ l reakční směsi. Pro optimalizaci byly použity 3 objemy primeru do 10 μ l směsi a to: 0,2 μ l, 0,1 μ l a 0,05 μ l při počáteční koncentraci primerů 20 pmol/ μ l. Modifikovaná DNA byla ředěna tak aby ve výsledné 10 μ l směsi byla zastoupena v množství 200 ng, 100 ng, 50 ng, 20 ng a 10 ng. Počáteční koncentrace DNA po modifikaci byla měřena na spektrofotometru (NanoDrop1000, Thermo Scientific) a ředěna vodou do odpovídající koncentrace. Optimalizační PCR reakce byla provedena při anelační teplotě 58°C a při 35 cyklech.

Po získání nejvhodnějšího poměru koncentrace DNA a primeru v PCR směsi byla provedena teplotní optimalizace anelační teploty primerů pomocí gradientové PCR při různých teplotách hybridizace. PCR směsi byly optimalizovány na teploty: 53°C, 55°C, 58,2°C, 60°C, 63°C, 65°C.

4.2.3.5 Amplifikace promotorové oblasti genu PALB2

Na základě předchozích výsledků optimalizace byly pro následující amplifikace promotorové oblasti genu *PALB2* ve vzorcích modifikované DNA z nádorových tkání použity následující podmínky:

- 0,05 µl primeru
- 10 ng modifikované DNA
- teplota anelace primerů 53°C

Po ověření přítomnosti PCR produktu na agarózovém gelu byl PCR produkt purifikován smícháním 0,7 µl PCR produktu s 1,5 µl H₂O a s 0,6 µl ExoSAP-IT, sekvenační reakce a precipitace probíhaly za stejných podmínek (viz kapitola 4.2.2).

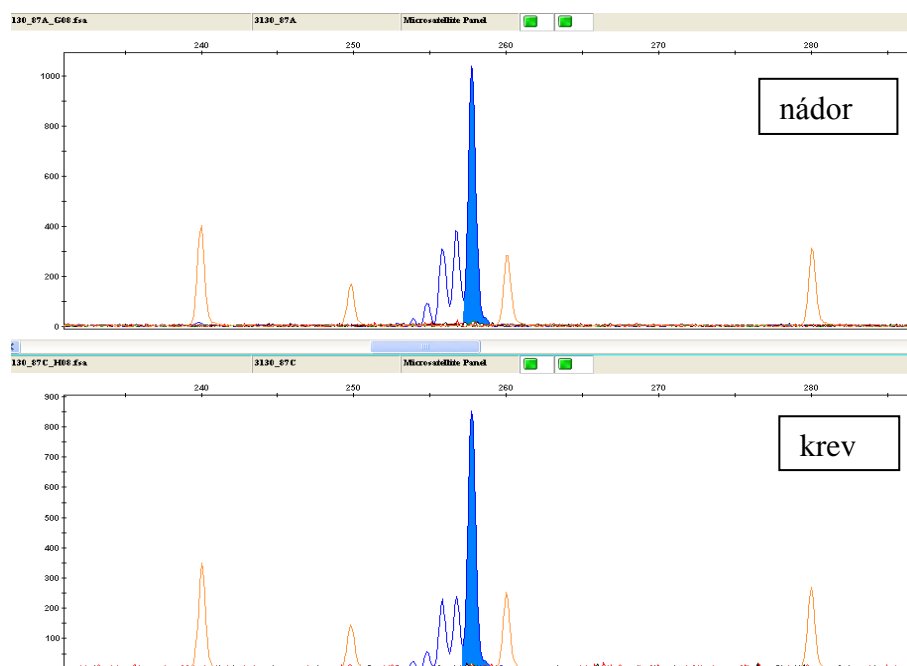
5 VÝSLEDKY

5.1 ANALÝZA VÝPADKŮ ALEL GENU *PALB2*

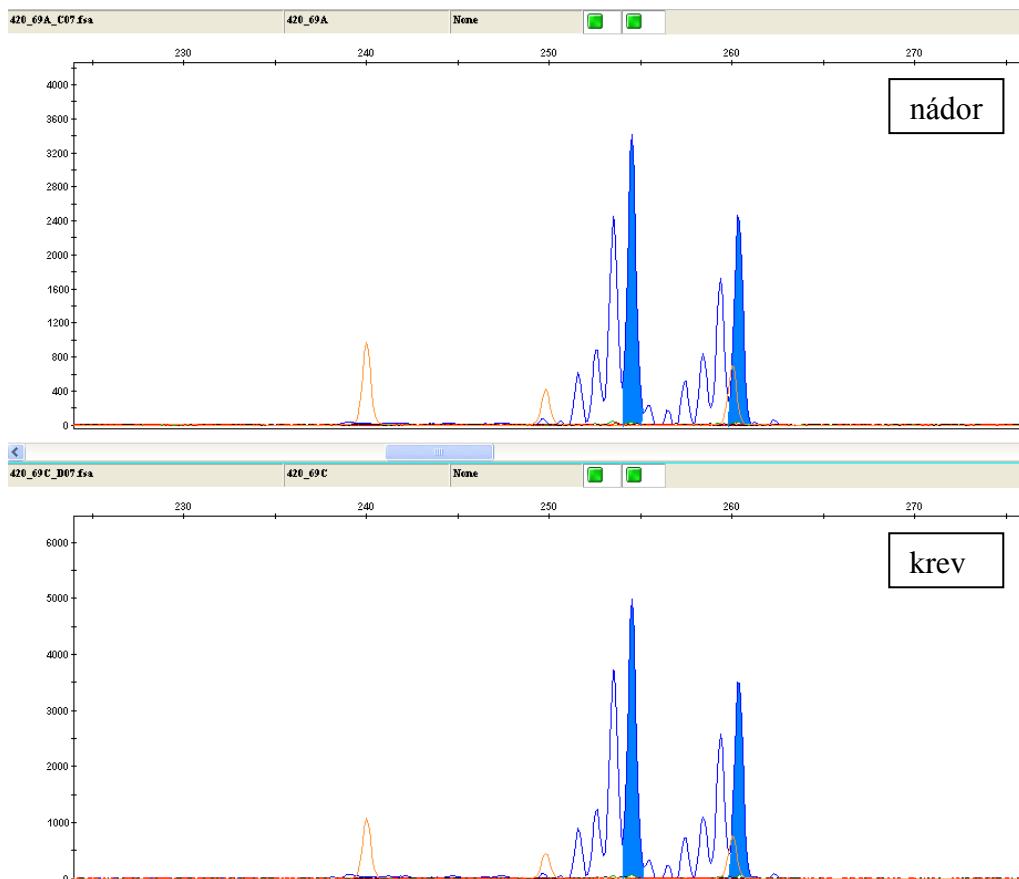
Analýza ztráty heterozygosity mikrosatelitového markeru byla provedena u 51 vzorků DNA z nádorové tkáně od pacientek se sporadickým karcinomem prsu. K potvrzení, zda došlo k výpadku genu *PALB2*, jsme použili 4 mikrosatelitové markery co nejtěsněji přiléhající ke genu. Tyto oblasti byly amplifikovány a délka jednotlivých alel mikrosatelitu byla ověřena fragmentační analýzou na automatickém sekvenátoru.

Výsledkem mohou být tři různé situace. Pokud graf fragmentační analýzy u daného vzorku vykazuje pouze jednu alelu, jedná se o homozygota a tento vzorek je pro nás neinformativní (obrázek č. 10). Pokud jsou přítomny 2 alely se stejným poměrem intenzit signálu jak u nádorové DNA, tak u DNA z periferní krve, jedná se o heterozygota pro daný mikrosatelitový marker (obrázek č. 11).

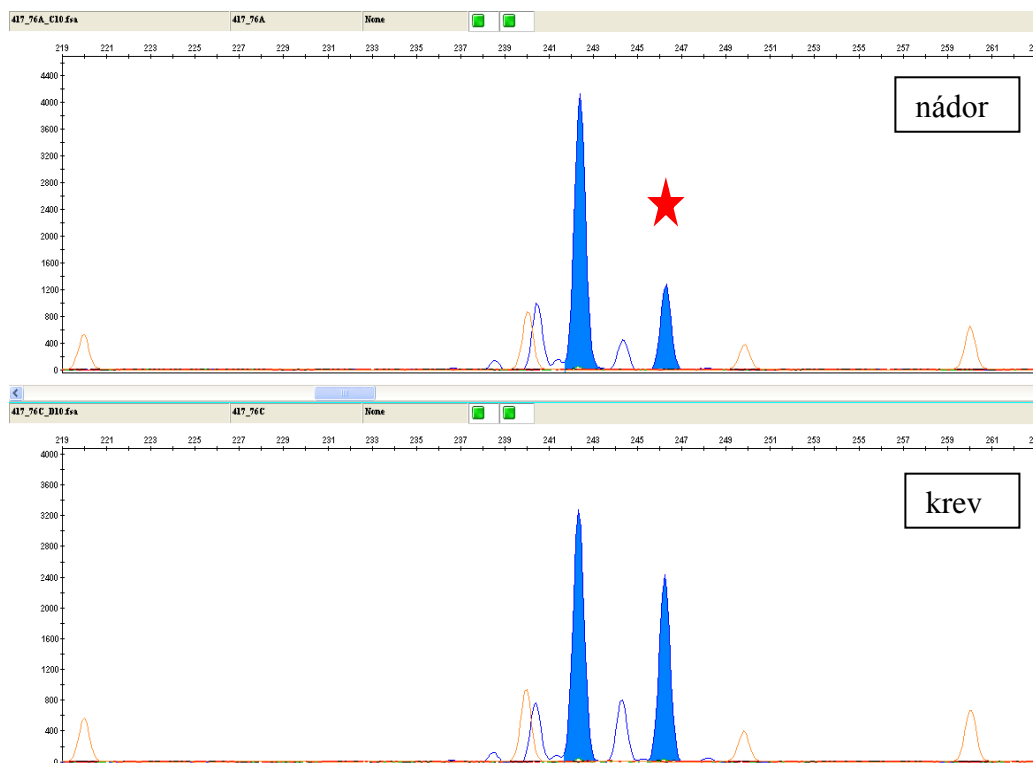
V případě, že byly zachyceny dvě alely ve vzorku DNA z periferní krve a vzorek z nádorové tkáně vykazoval snížení intenzity signálu o více než 50 %, jedná se o ztrátu heterozygosity neboli LOH (obrázek č. 12). U všech pacientek byly analyzovány 4 mikrosatelitové markery pro daný gen. Za vzorek s pozitivním výsledkem čili ztrátou daného genu byl považován vzorek, u kterého došlo k výpadku alely u minimálně 2 mikrosatelitů.



Obrázek č. 10 – Znárodnění homozygotního vzorku pro daný mikrosatelit na grafu fragmentační analýzy.



Obrázek č. 11 – Znázornění heterozygotního vzorku pro daný mikrosatelit na grafu fragmentační analýzy.



Obrázek č. 12 – Znázornění výpadku jedné alely mikrosatelitového markeru (snížení „píku“ o více než 50 %) na grafu fragmentační analýzy. Výpadek označen hvězdičkou.

V našem souboru jsme výpadek minimálně dvou mikrosatelitů přiléhajících ke genu *PALB2* pozorovali u 7,8 % (4/51) vzorků nádorové tkáně od pacientek se sporadickým karcinomem prsu (tabulka č. 5).

	412	417	420	3130
1	Ht	Ho	Ho	Ho
2	LOH	LOH	Ht	LOH
3	Ho	Ht	Ho	Ht
4	Ho	na	LOH	LOH
5	Ht	Ht	Ht	Ht
6	Ho	Ht	Ht	Ho
7	Ht	Ht	Ht	Ht
8	Ho	Ht	Ht	na
9	Ho	Ho	Ho	Ho
10	Ht	Ht	Ht	Ho
11	Ho	Ht	Ht	Ho
12	Ht	Ht	Ht	Ho
13	Ht	Ht	Ht	Ho
14	Ht	Ht	Ht	Ho
15	Ho	Ht	na	LOH
16	Ht	Ht	Ht	Ht
17	Ht	Ht	na	na
18	Ht	Ht	na	Ho
19	Ho	na	Ht	na
20	Ht	Ht	Ht	Ht
21	Ht	Ho	Ht	Ht
22	Ho	Ht	Ht	Ht
23	LOH	Ho	LOH	Ho
24	Ht	Ht	Ho	Ht
25	Ht	Ht	Ht	Ho

	412	417	420	3130
26	Ht	Ht	Ht	Ho
27	Ht	Ht	Ht	Ho
28	Ht	Ht	Ho	Ho
29	na	Ht	Ht	Ho
30	Ht	Ho	Ho	na
31	Ht	LOH	Ht	na
32	Ho	Ht	Ht	Ht
33	Ho	Ht	Ho	Ht
34	Ht	Ho	Ht	Ho
35	Ho	na	Ho	Ho
36	Ht	Ht	Ho	Ho
37	Ht	Ho	Ht	Ho
38	Ht	Ht	Ht	Ht
39	Ho	Ht	Ho	Ht
40	Ho	Ht	Ht	Ht
41	na	Ht	Ht	na
42	Ho	Ht	Ht	na
43	Ht	Ho	Ht	na
44	LOH	LOH	Ht	LOH
45	Ho	Ht	Ht	Ho
46	Ho	Ho	Ho	Ht
47	na	Ht	Ho	Ho
48	Ht	Ho	na	na
49	na	Ho	Ho	Ht
50	na	Ht	na	na
51	Ho	Ht	na	Ho

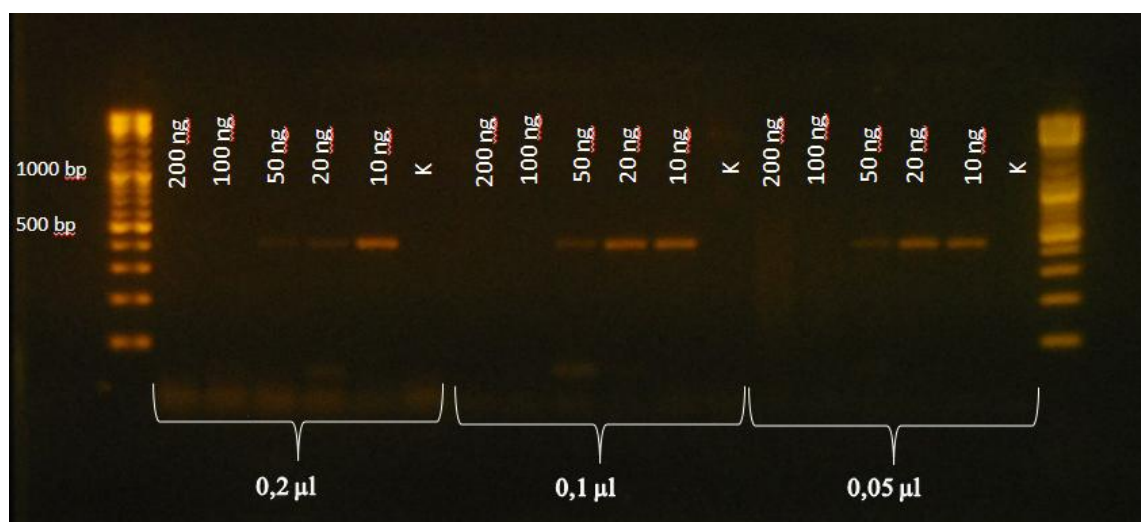
Tabulka č. 5 – Výsledky analýzy jednotlivých mikrosatelitových markerů přiléhajících ke genu *PALB2* v souboru 51 vyšetřovaných nádorů. LOH – ztráta heterozygosity, Ht – heterozygot, Ho – homozygot a na – nezanalyzováno. Vzorek, u kterého jsou všechny markery homozygotní, je neinformativní. 412, 417, 420 a 3130 značí poslední trojčíslí mikrosatelitových markerů. 1 -51 – čísla vzorků.

5.2 HYPERMETYLACE PROMOTOROVÝCH OBLASTÍ

5.2.3 Modifikace DNA bisulfitem sodným

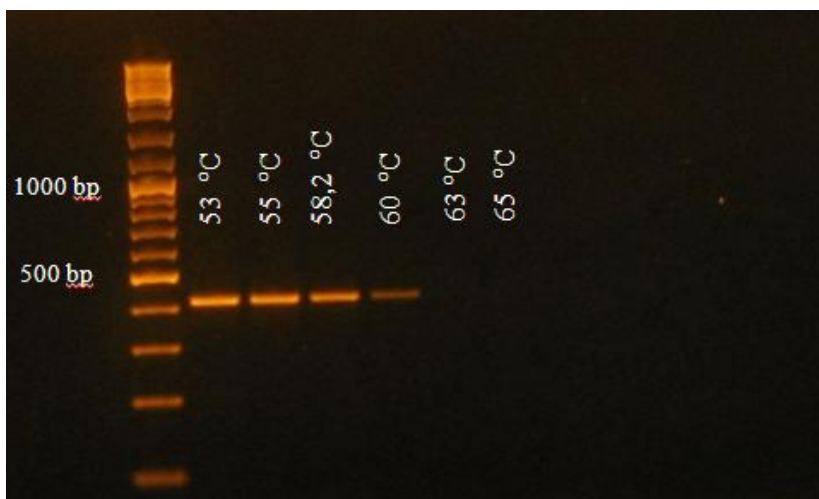
Modifikace vzorků DNA z nádorové tkáně probíhala vždy společně s pozitivní kontrolou metylované DNA pro kontrolu správného průběhu konverze (Universal Methylated Human DNA Standard, Zymo Research). Po modifikaci všechny nemetylované cytosiny byly konvertovány na tyminy a 5-metylcytosiny nebyly pozměněny.

Byla provedena optimalizace amplifikace promotorové oblasti. Optimalizováno bylo nejdříve množství primerů a množství přidané modifikované DNA (obrázek č. 13).



Obrázek č. 13 – Obrázek gelové elektroforézy optimalizace množství primerů a množství DNA. DNA byla ředěna na množství ve výsledné 10 µl směsi v rozmezí 200 ng – 10 ng. Byly použity primery v objemech 0,2 µl, 0,1 µl a 0,05 µl. K je negativní kontrola. Pro amplifikaci byla použita dvojice primerů 2F + 2Cr.

Po zvolení neoptimálnějšího poměru množství modifikované DNA a množství primerů byla optimalizována anelační teplota (obrázek č. 14). Vzorky byly amplifikovány při různých anelačních teplotách a to: 53°C, 55°C, 58,2°C, 60°C, 63°C, 65°C. Při těchto teplotách byly optimalizovány všechny 4 páry primerů pokrývající celou promotorovou oblast.



Obrázek č. 14 – Obrázek gelové elektroforézy. Amplifikace vzorků při různých anelačních teplotách od 53°C – 65°C. Příklad amplifikace s primery 2F + 2Cr.

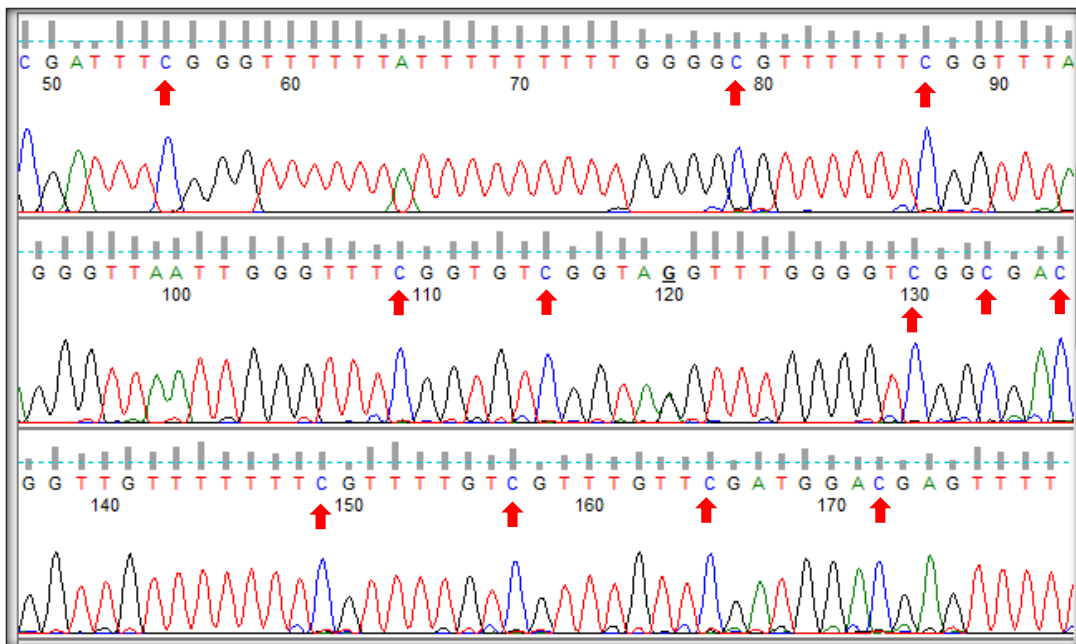
Nejlepšího výsledku PCR amplifikace bylo dosaženo s reakční směsí obsahující 0,05 μ l každého primeru, s 10 ng modifikované DNA a při teplotě anelace primerů 53°C. Tyto podmínky byly použity pro všechny následující amplifikace promotorové oblasti genu *PALB2* z modifikované DNA z nádorových tkání.

5.2.4 Sekvenování promotorové oblasti

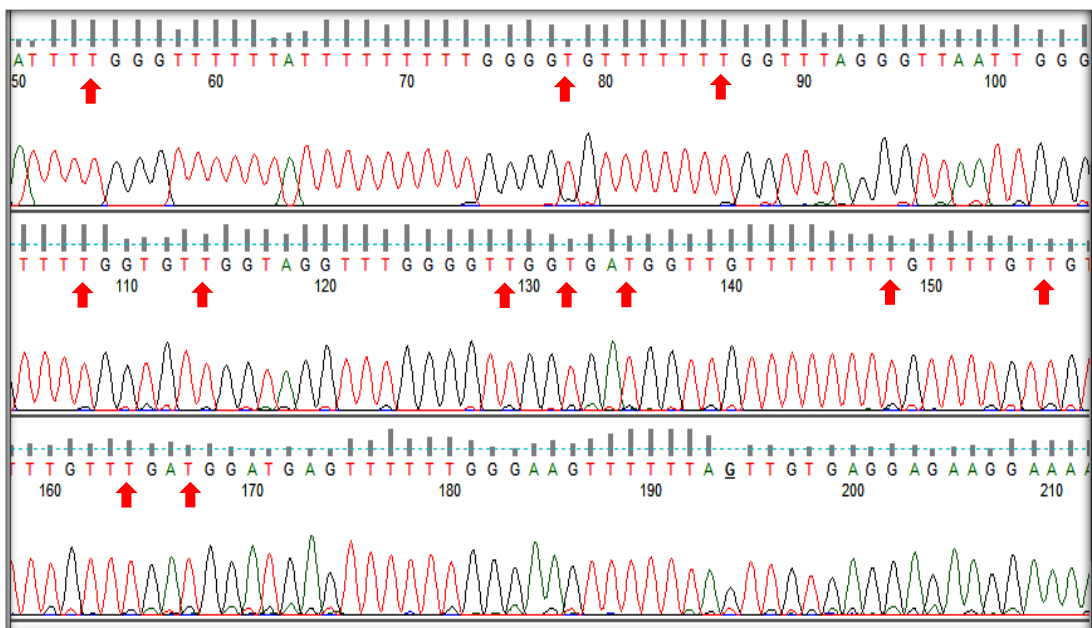
Krátké fragmenty promotoru byly osekvenovány spolu s pozitivní kontrolou a to plně metylovanou DNA. Každý vzorek byl sekvenován pomocí a forward i reverse primeru a to ve všech čtyřech fragmentech (viz kapitola 4.2.3.3). Prvním výsledkem bylo prokázání účinnosti bisulfitové modifikace pomocí komerční plně metylované DNA (Universal Methylated Human DNA Standart, Zymo Research) (obrázek č. 15). Čitelnější sekvence byly vybrány ze čtení s forward primerem.

V našich vzorcích nebyly nalezeny žádné metylované CpG dinukleotidy v promotorové oblasti genu *PALB2*.

A) METYLOVANÁ DNA



B) NÁDOROVÁ DNA



Obrázek č. 15 – Obrázek osekvenované části promotoru genu *PALB2* po bisulfitové modifikaci. A) komerčně zakoupená plně metylovaná DNA. Po modifikaci bisulfitem sodným jsou přítomny cytosiny (5-metylcytosiny) v CpG dinukleotidech a zbylé cytosiny konvertované modifikací na tyminy. B) DNA z nádorové tkáně, ve které jsou přítomny pouze tyminy – CpG dinukleotidy nevykazují metylaci cytosinů. Pozice CpG dinukleotidů naznačeny šipkami. Vzorky sekvenovány s primerem PB_PR_2F.

6 DISKUZE

Gen *PALB2* dle předchozích studií prokazatelně zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu v rodinách s vícečetnými nádory prsu. Jeho role ve sporadických formách není zatím zcela zřejmá.

Pro naši studii bylo vybráno 51 neselektovaných pacientek s karcinomem prsu. Každý vzorek byl poskytnut s písemným souhlasem pacientky a odebrán na Gynekologicko-porodnické klinice a I. Chirurgické klinice 1. LF UK a VFN. Od každé pacientky byla použita DNA izolovaná ze vzorku nádorové tkáně a z periferních T-lymfocytů krve.

Během tumorogeneze se děje řada změn na molekulární úrovni, které vedou k inaktivaci tumor supresorového genu. Tato inaktivace se řídí Knudsonovou teorií dvojího zásahu, při níž první událostí je náhodná somatická mutace jedné z alel genu a druhým zásahem bývá často ztráta heterozygosity (LOH) nebo (hyper)metylace promotorové oblasti. Díky vysoké frekvenci těchto událostí během tumorogeneze u všech tumor supresových genů, byly tyto způsoby inaktivace vybrány ke studiu i pro naše účely.

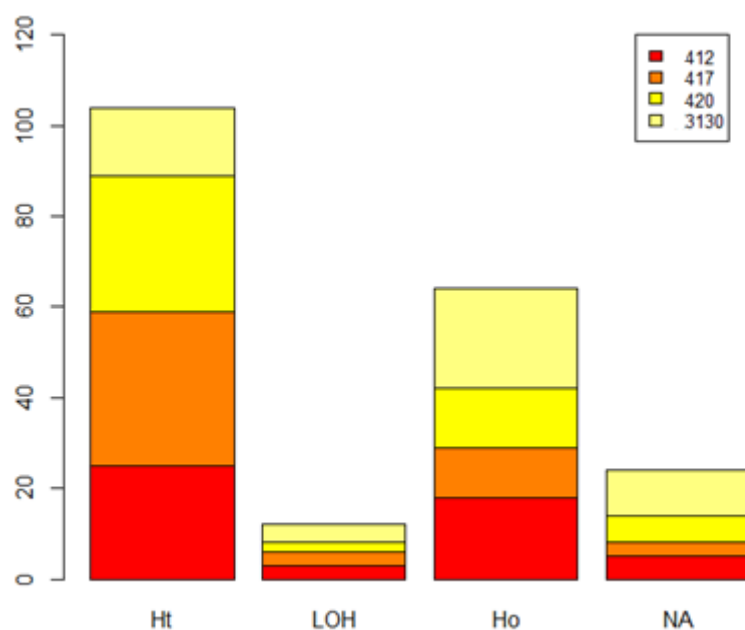
6.1 ZTRÁTA HETEROZYGOSITY

Ztráta heterozygosity se udává jako nejčastější způsob inaktivace alely tumor supresorového genu. K detekci výpadku lokusu s genem zájmu se využívají mikrosatelitové markery. Mikrosatelity jsou krátké repetice, které jsou v populaci velmi polymorfni. Díky tomu můžeme naamplifikovat a ve výsledku na fragmentační analýze detekovat dvě alely o různé velikosti a snadno poznat výpadek jedné alely.

Gen *PALB2* neobsahuje mikrosatelitové repetice uvnitř genu, proto byly vybrány nejbližší lokalizované a to jak z telomerické tak z centromerické strany. U každého vzorku byly analyzovány všechny čtyři mikrosatelity a přítomnost jednotlivých alel mikrosatelitového markeru byla vždy porovnávána mezi DNA z nádorové tkáně a DNA z periferní krve od jedné pacientky.

V našem souboru 51 vzorků byly nalezeny všechny tři možné situace: heterozygotní vzorky (přítomnost dvou alel o různé délce), homozygotní vzorky (obě alely o stejné délce zobrazující se jako jeden „pík“) a ztráta heterozygosity. Ztráta

heterozygosity (LOH) byla detekována srovnáním DNA z periferní krve, která vykazovala dva „píky“ (dvě alely o různých velikostech) a DNA z nádoru, kde jedna alela („pík“) byla snížena o více než 50 %. Hranice 50 % byla určena na základě odběru nádorové tkáně patologem, protože maximální míra kontaminace zdravými buňkami byla 50 %. Pro mikrosatelit D16S412 bylo nalezeno 25 vzorků heterozygotních, 18 homozygotních, 3 LOHy a 5 vzorků nebylo možno pro tento mikrosatelit zanalyzovat. Pro mikrosatelit značený D16S417 bylo nalezeno 34 heterozygotů, 11 homozygotů, 3 LOHy a 3 vzorky nebylo možno zanalyzovat. U mikrosatelitu D16S420 bylo nalezeno 30 heterozygotů, 14 homozygotů, 2 LOHy a 5 vzorků nebylo možno zanalyzovat a mikrosatelit D16S3130 – 15 heterozygotů, 23 homozygotů, 4 LOHy a 9 vzorků nebylo možno zanalyzovat (obrázek č. 16).



Obrázek č. 16 – Grafické znázornění počtu Heterozygotů (Ht), Homozygotů (ho), LOH a nezanalyzovaných vzorků (NA) pro jednotlivé mikrosatelity označené v legendě jako 412, 417, 420 a 3130 (poslední trojčíslí mikrosatelitu) v souboru 51 analyzovaných vzorků.

V našem souboru bylo objeveno šest vzorků vykazující ztrátu heterozygosity minimálně u jednoho mikrosatelitového markeru. U čtyř vzorků (2,4,23,44) můžeme s velkou pravděpodobností konstatovat, že k výpadku genu *PALB2* skutečně došlo, protože vypadl vždy alespoň jeden mikrosatelit z každé strany (tj. telomerické i centromerické). U zbylých dvou vzorků (15,31) nemůžeme interpretovat výsledek a to ze dvou pravděpodobných důvodů. Za prvé se může jednat o výpadek oblasti, jejíž

hranice se nachází mezi genem a mikrosatelitem (oblast mezi genem a mikrosatelitem je až 421,671 bp dlouhá). Za druhé se zde mohly projevit limity metody. Tímto limitem je myšlena heterogenita vzorku, tedy skutečnost že ve vzorku nádorové tkáně, ze kterého se izolovala DNA, bylo patologem zaručeno, že minimálně 50 % buněk je nádorových. V případě vzorků s hraniční hodnotou tak mohlo dojít ke špatné interpretaci výsledků fragmentační analýzy. Pro přesnější interpretaci výsledku by bylo účinnější použít vzorek obsahující pouze nádorové buňky.

V našem souboru 51 vzorků sporadických karcinomů prsu jsme u 4 vzorků potvrdili výpadek jedné alely genu *PALB2* (7,8 %). Tato frekvence není vysoká, což souvisí s faktem, že mutace ve středně penetrantních genech jako je gen *PALB2* se i u hereditárních forem karcinomu prsu vyskytují s nižší frekvencí. Podobná situace pravděpodobně bude i v případě somatických alterací u sporadických karcinomů. Můžeme tedy předpokládat, že role tohoto genu v rozvoji tumorogeneze u sporadických forem nebude tak významná jako u hlavních predispozičních genů.

U genů *BRCA1* a *BRCA2* byly u sporadických forem karcinomu prsu a ovária nalezeny ztráty heterozygosity ve vyšší frekvenci. U genu *BRCA1* byla ztráta alely nalezena v 50 % případů a u genu *BRCA2* ve 30 % (Cleton-Jansen, Collins et al. 1995). Tyto hodnoty poukazují na jasnou roli těchto genů v rozvoji tumorogeneze u sporadických forem karcinomu prsu a ovária i přesto, že ve zdravé alele nebyla nalezena žádná bodová somatická mutace (Welsh a King 2001). Je tedy možné, že na vzniku nádorového onemocnění se podílí haploinsuficience obou genů. Nelze tedy vyloučit, že i v našem případě, kdy jsme nenašli žádné somatické mutace ve vzorcích s pozitivním nálezem LOH v genu *PALB2*, hraje tento nález alespoň částečně roli v rozvoji tumorogenezi sporadických karcinomů prsu.

U genu *PALB2* doposud nebyly publikovány žádné práce zabývající se ztrátou heterozygosity u sporadických nádorů prsu. Dosavadní práce analyzovaly ztrátu heterozygosity jako doprovodného procesu inaktivující druhou alelu genu *PALB2* v nádorové tkáni od pacientek, u nichž byla nalezena dědičná patogenní mutace. Všechny tyto práce byly prováděny na vzorcích hereditárních karcinomů prsu či ovária (Dansonka-Mieszkowska, Kluska et al. 2010).

Celkově bylo provedeno šest studií zabývající se tímto tématem. Ve třech studiích byla popsána přítomnost LOH v nádorové tkáni, jakožto mechanismus vedoucí k úplné inaktivaci genu (García, Fernández et al. 2009, Dansonka-

Mieszkowska, Kluska et al. 2010, Casadei, Norquist et al. 2011). Dansonka-Mieszkowska a kolektiv k detekci LOH jako jediní z těchto publikací používali mikrosatelitové markery. Garcia a kolektiv a Casadei a kolektiv využívali techniky makrodisekce a mikrodisekce k selekci pouze nádorových buněk k izolaci DNA z nádorové tkáně. LOH detekovali pomocí sekvenování oblasti s dědičnou mutací v DNA z nádorových buněk.

Zbylé tři studie (Erkko, Xia et al. 2007, Tischkowitz, Xia et al. 2007, Balia, Sensi et al. 2010) u studovaných pacientů s hereditární formou karcinomu prsu a patogenními mutacemi v genu *PALB2* žádný LOH nenašli. Všichni autoři se shodují, že gen *PALB2* může být genem haploinsuficientního účinku. Tuto teorii by podporoval fakt, že protein PALB2 oligomerizuje přes svůj N-koncový coiled-coil motiv a v případě zkráceného proteinu (jakožto produktu jedné alely s patogenní mutací) by mohly vznikat špatně funkční homodimery. Druhým názorem, na kterém se autoři také shodují, je že se může jednat o dominantně negativní efekt v případě, že jedna alela genu je mutovaná. Dominantně negativní efekt je stav, kdy přítomnost i jedné mutované alely genu se projeví nesprávnou funkcí výsledného proteinového produktu.

Jelikož pro úplnou inaktivaci tumor supresorového genu je zapotřebí inaktivace obou alel, byly vzorky (2,4,23,44) s nalezenou ztrátou heterozygosity podrobeny analýze mutací. U žádného ze vzorků nebyla nalezena mutace v kódující oblasti genu *PALB2*. Tento výsledek nemůžeme porovnat s jakoukoliv studií, jelikož u sporadických nádorů nebyly žádné studie provedeny. Pouze v jedné nedávno publikované práci byla objevena díky NGS (next-generation sequencing) somatická mutace genu *PALB2* v nádorové tkáni pacienta s hereditární mutací tohoto genu (Stadler, Schrader et al. 2014). Tento nález naznačuje mechanismus inaktivace genu v nádorové tkáni díky somatickým mutacím (jako druhého „hítu“), ale určení frekvence těchto dějů je námětem k dalším studiím.

6.2 HYPERMETYLACE PROMOTOROVÉ OBLASTI

Druhý častý způsob inaktivace alely genu v počátcích tumorogeneze je hypermetylace promotorové oblasti. V normální zdravé buňce je promotorová oblast hypometylována a tak připravena k transkripci a dále translaci. U nádorových buněk je sledován trend hypermetylace promotorové oblasti a hypometylace těla genu.

Pro analýzu metylace promotoru byla vybrána metoda „bisulfite sequencing“. Tato metoda spočívá v modifikaci DNA z nádorové tkáně pomocí bisulfitu sodného. Výsledkem modifikace je konverze nemetylovaných cytosinů na tyminy a metylované 5-metylcytosiny v CpG dinukleotidech zůstávají nezměněny. Takto modifikovaná DNA je posléze osekvenována na genetickém analyzátoru. Prvním krokem pro úspěšnou amplifikaci, bylo navrzení primeru a optimalizování anelační teploty PCR reakce. Výsledný PCR produkt byl osekvenován na automatickém sekvenátoru. Modifikovaná nádorová DNA byla sekvenována spolu s negativní kontrolní DNA a zakoupenou plně metylovanou DNA.

V souvislosti s hypermetylací promotorové oblasti genu *PALB2* bylo doposud provedeno několik studií.

Potapová a kolektiv vyšetřovali míru hypermetylace promotoru a exonu 1 u genu *PALB2* s celkovou velikostí 1512 bp u 130 *BRCA1/2*-negativních pacientek s hereditárním a sporadickým karcinomem prsu a ovária. Hypermetylace těchto oblastí byly nalezeny u 4 vzorků se sporadickým karcinomem prsu. V této studii byla zároveň provedena analýza druhé alely sledující ztrátu heterozygosity nebo přítomnost somatické mutace, ovšem žádná taková změna nebyla zjištěna.

Další práce zabývající se hypermetylací *PALB2* promotoru vycházely ze studie Potapové a spol. Mikeska a spol. provedli studii na vzorcích s karcinomem ovária (Potapová našla shodně s karcinomem prsu i u ovária 4 pozitivní vzorky). Zkoumaná oblast promotoru byla značně menší (132 bp), přičemž se tato oblast částečně překrývala s oblastí Potapové a kolektivu. V této studii v 92 vzorcích nebyly nalezeny žádné hypermetylace. Ve třetí studii (Watanabe, Maeda et al. 2013) bylo zahrnuto 48 vzorků DNA z nádorové tkáně karcinomu prsu a v 8 byla nalezena hypermetylace promotorové oblasti. Všechny tyto studie se lišily metodou používanou k detekci hypermetylace. Potapová a kolektiv využívali bisulfitové sekvenování a quantitative

real-time methylation-specific PCR (MSP), Mikeska a kolektiv metylačně specifickou high-resolution melting analýzu (metylačně specifická HRMA) a Watanabe a kolektiv bisulfite pyrosekvenování. Další odlišnosti byly ve velikosti amplifikovaných částí promotorů, které byly u Mikesky a Watanabeho podstatně menší. Rozdíly ve výsledcích odůvodňují také různým původem nádorových buněk a místem jejich odebrání. Nemůžeme tedy z těchto výsledků posoudit, zda metylace promotorové oblasti genu *PALB2* může být procesem spouštějícím rozvoj tumorogeneze, ovšem je jasnou značkou tumorogeneze proběhlé. V jaké fázi však k hypermetylaci dochází, stále není jasné. V naší práci nebyl nalezen žádný vzorek s hypermetylovaným promotorem.

Přestože jsme nenašli žádnou somatickou mutaci a metylaci promotorové oblasti genu *PALB2*, 7,8 % nálezů LOH naznačuje jeho roli při vzniku sporadického karcinomu prsu alespoň v některých případech.

Zmapování sledu událostí vedoucích až ke vzniku nádorového onemocnění je velmi důležité nejen pro samotné pochopení procesu tumorogeneze, ale i pro co nejčasnější diagnostiku nástupu onemocnění. Sled těchto událostí u sporadického karcinomu prsu zatím není znám na rozdíl od kolorektálního karcinomu. U kolorektálního karcinomu byl sled událostí přesně popsán. První změnou je mutace či ztráta onkogenu (*Kras*) vedoucí k hyperproliferaci buněk následovaná hypometylací DNA a mutacemi v hlavních tumor supresorových genech jako je *p53* vedoucími k jejich inaktivaci (Fearon a Vogelstein 1990). Ve sporadické formě kolorektálního karcinomu je iniciační událostí ztráta alely *APC* genu jakožto tumor supresorového genu následovaný druhým hitem (Shih, Wang et al. 2001).

V souvislosti s rakovinným onemocněním prsu se stále hledají další kandidáti zodpovědní za vznik tohoto onemocnění. Gen *PALB2* je vhodným kandidátem pro další zkoumání, jelikož se podílí na stejné opravné dráze jako geny *BRCA1* a *BRCA2*. Pochopení jeho role ve sporadické formě karcinomu prsu může přinést nové přístupy v léčbě tohoto onemocnění. U více prozkoumaných mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* se přistupuje k cílené léčbě pomocí inhibice PARP (poly adenosine-diphosphate [ADP]-ribose polymerase). Tento protein je zodpovědný za opravu jednořetězcových zlomů na vláknech DNA. Buňky s mutovanými či metylovanými geny, které se podílejí na opravné dráze dvouřetězcových zlomů, jako *BRCA1* nebo *BRCA2*, nemohou opravovat zlomy pomocí homologní rekombinace, a při zablokování funkce PARP ani

excizí bazí a takovéto buňky – nádorové – jsou po poškození DNA vedeny k apoptóze. Toho se využívá při specifické léčbě karcinomů prsu a ovária vzniklých na základě hereditární či somatické mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* (Weil a Chen 2011). Tento princip je známý jako princip syntetické letality.

Další možnou terapeutickou strategií je využití inhibitorů histon deacetyláz. Jak bylo v této práci zmíněno, přednostně buňky využívají metylace a zároveň samotný proces deacetylace nemůže vést k umlčení genu, tudíž aplikace samotného inhibitoru deacetyláz by byla samoúčelná. Zároveň se v terapii uvažuje i o využití inhibitorů DNMTs pomocí RNA interference (Cameron, Bachman et al. 1999, Suzuki, Gabrielson et al. 2002).

7 ZÁVĚR

Účelem této práce bylo zmapovat roli tumor supresorového genu *PALB2* při vzniku sporadické formy karcinomu prsu. Frekvence mutací v tomto genu, který se podílí na procesu oprav dvouřetězcových zlomů DNA, u hereditární formy karcinomu prsu je v České republice v rodinách s vícečetnými karcinomy ve srovnání s jinými populacemi poměrně vysoká (5,5 %) (Janatova, Kleibl et al. 2013). Jeho role v patogenezi sporadických nádorových onemocnění nebyla dosud zcela zřejmá.

K objasnění způsobu inaktivace genu *PALB2* jsme detekovali výpadky jedné alely pomocí ztráty heterozygosity (LOH) přílehlých mikrosatelitových markerů a hypermetylaci jeho promotové oblasti ve vzorcích DNA izolované z nádorové tkáně. V případě nálezu LOH byly vzorky DNA z nádorové tkáně osekvenovány v celé kodující oblasti genu *PALB2* za účelem nalezení somatické mutace jako způsobu inaktivace druhé alely.

V 51 analyzovaných vzorcích byly nalezeny 4 prokazatelné výpadky jedné alely genu *PALB2*. Tyto vzorky byly osekvenovány a nebyla nalezena žádná mutace. V žádném ze všech vzorků nebyla nalezena ani hypermetylace promotorové oblasti.

Tato studie byla první zabývající se způsobem inaktivace tumor supresorového genu *PALB2* mechanismem ztráty heterozygosity u sporadických nádorových onemocnění prsu. Náš výsledek podporuje teorii získanou na základě výzkumu na hereditárních formách karcinomu prsu, že se může jednat o haploinsuficientní gen a jeho inaktivace může hrát částečnou roli v rozvoji tumorogeneze i u sporadické formy tohoto onemocnění.

Pro přesnější určení úlohy genu *PALB2* v tumorogenezi sporadického nádorového onemocnění prsu bude třeba provést analýzu možných způsobů jeho inaktivace na rozšířeném souboru vzorků. Pochopení všech procesů podílejících se na rozvoji tumorogeneze může vést k efektivnější léčbě nádorových onemocnění a jejich časnější diagnostice.

8 SEZNAM ZKRATEK

ARE	Antioxidant-response elements Antioxidační částice
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated Gen ataxie telangiectasie mutated
ATP	Adenosine Triphosphate Adenosin trifosfát
bp	Base Pair Párů bází
BRCA1	Breast Cancer 1 Gen karcinomu prsu 1
BRCA 2	Breast Cancer 2 Gen karcinomu prsu 2
ChAM	Chromatin-association motif motiv asociující s chromatinem
CHEK 2	Checkpoint Kinase 2 Kináza kontrolního bodu 2
CpG	Cytosine – phosphate – guanine Cytosin – fosfát – guanin
DNMT	DNA Methyltransferase DNA Metyltransferáza
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid Kyselina Etylendiamintetraoctová
FAM	Fluorescein Amidite Fluorescein amidit
HAT	Histone Acetyltransferases Histon Acetyltransferáza
Ho	Homozygous Homozygot
HRMA	High resolution melting analysis Vysoko rozlišovací analýza
Ht	Heterozygous Heterozygot
ICLs	Interstrand Crosslinks zesíťování řetězců DNA

<i>KEAPI</i>	Kelch-like ECH-associated protein 1 Kelch-like ECH-asociovaný protein 1
<i>LOH</i>	Loss Of Heterozygosity Ztráta heterozygosity
<i>MRN komplex</i>	Mre11-Rad50-Nbs1 komplex
<i>MSP</i>	Methylation specific PCR Metylačně specifická PCR
<i>NaAC</i>	Sodium Acetate Acetát sodný (octan sodný, CH ₃ COONa)
<i>NGS</i>	Next Generation Sequencing Sekvenování nové generace
<i>NRF2</i>	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 Gen jaderného faktoru 2
<i>PALB 2</i>	Partner and Localizer of BRCA2 Gen Partnera a lokalitátora genu BRCA2
<i>PARP</i>	Poly (ADP-ribose) polymerase Inhibitory polymerázy polyADP ribózy
<i>PCNA</i>	Proliferating cell nuclear antigen Svorkový protein
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction Polymerázová řetězová reakce
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog Homolog fosfatázy a tensinu
<i>RPA</i>	Replication protein A Replikační protein A
<i>SSR</i>	Single Sequence Repeats Krátká tandemová repetice
<i>VFN</i>	Všeobecná Fakultní Nemocnice
<i>VNTR</i>	Variable Number Tandem Repeat Variabilní množství tandemových repetice
<i>1. LF UK</i>	1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
<i>Bisulfít sodný</i>	Hydrogensířičitan sodný, NaHSO

9 CITACE

(2000). "Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group." Br J Cancer **83**(10): 1301-1308.

Antequera, F. and A. Bird (1993). "CpG islands." EXS **64**: 169-185.

Balia, C., E. Sensi, G. Lombardi, M. Roncella, G. Bevilacqua and M. A. Caligo (2010). "PALB2: a novel inactivating mutation in a Italian breast cancer family." Fam Cancer **9**(4): 531-536.

Berger, A. H. and P. P. Pandolfi (2011). "Haplo-insufficiency: a driving force in cancer." J Pathol **223**(2): 137-146.

Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.

Bird, A. P. and A. P. Wolffe (1999). "Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin." Cell **99**(5): 451-454.

Bleuyard, J. Y., R. Buisson, J. Y. Masson and F. Esashi (2012). "ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair." EMBO Rep **13**(2): 135-141.

Buisson, R. and J. Y. Masson (2012). "PALB2 self-interaction controls homologous recombination." Nucleic Acids Res **40**(20): 10312-10323.

Buisson, R., J. Niraj, J. Pauty, R. Maity, W. Zhao, Y. Coulombe, P. Sung and J. Y. Masson (2014). "Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase η in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks." Cell Rep **6**(3): 553-564.

Cameron, E. E., K. E. Bachman, S. Myöhänen, J. G. Herman and S. B. Baylin (1999). "Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer." Nat Genet **21**(1): 103-107.

Casadei, S., B. M. Norquist, T. Walsh, S. Stray, J. B. Mandell, M. K. Lee, J. A. Stamatoyannopoulos and M. C. King (2011). "Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer." Cancer Res **71**(6): 2222-2229.

Chen, J., D. P. Silver, D. Walpita, S. B. Cantor, A. F. Gazdar, G. Tomlinson, F. J. Couch, B. L. Weber, T. Ashley, D. M. Livingston and R. Scully (1998). "Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells." Mol Cell **2**(3): 317-328.

Chen, Z., L. C. Trotman, D. Shaffer, H. K. Lin, Z. A. Dotan, M. Niki, J. A. Koutcher, H. I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi (2005).

"Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis." *Nature* **436**(7051): 725-730.

Cleton-Jansen, A. M., N. Collins, S. R. Lakhani, J. Weissenbach, P. Devilee, C. J. Cornelisse and M. R. Stratton (1995). "Loss of heterozygosity in sporadic breast tumours at the BRCA2 locus on chromosome 13q12-q13." *Br J Cancer* **72**(5): 1241-1244.

Count, S. S. (2011) "The Pathologist's Slide Reveals More Than Meets The Eye: Loss of Heterozygosity and Cancer Biology." *Veterinary Pathology Online* **48**, 236-244.

Dansonka-Mieszkowska, A., A. Kluska, J. Moes, M. Dabrowska, D. Nowakowska, A. Niwinska, P. Derlatka, K. Cendrowski and J. Kupryjanczyk (2010). "A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients." *BMC Med Genet* **11**: 20.

Daskalakis, M., T. T. Nguyen, C. Nguyen, P. Guldborg, G. Köhler, P. Wijermans, P. A. Jones and M. Lübbert (2002). "Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment." *Blood* **100**(8): 2957-2964.

Davies, A. A., J. Y. Masson, M. J. McIlwraith, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, A. R. Venkitaraman and S. C. West (2001). "Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein." *Mol Cell* **7**(2): 273-282.

Di Croce, L., V. A. Raker, M. Corsaro, F. Fazi, M. Fanelli, M. Faretta, F. Fuks, F. Lo Coco, T. Kouzarides, C. Nervi, S. Minucci and P. G. Pelicci (2002). "Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor." *Science* **295**(5557): 1079-1082.

Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, L. H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune and C. Gehrke (1982). "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells." *Nucleic Acids Res* **10**(8): 2709-2721.

Erkko, H., J. G. Dowty, J. Nikkilä, K. Syrjäkoski, A. Mannermaa, K. Pylkäs, M. C. Southey, K. Holli, A. Kallioniemi, A. Jukkola-Vuorinen, V. Kataja, V. M. Kosma, B. Xia, D. M. Livingston, R. Winqvist and J. L. Hopper (2008). "Penetrance analysis of the PALB2 c.1592delT founder mutation." *Clin Cancer Res* **14**(14): 4667-4671.

Erkko, H., B. Xia, J. Nikkilä, J. Schleutker, K. Syrjäkoski, A. Mannermaa, A. Kallioniemi, K. Pylkäs, S. M. Karppinen, K. Rapakko, A. Miron, Q. Sheng, G. Li, H. Mattila, D. W. Bell, D. A. Haber, M. Grip, M. Reiman, A. Jukkola-Vuorinen, A. Mustonen, J. Kere, L. A. Aaltonen, V. M. Kosma, V. Kataja, Y. Soini, R. I. Drapkin, D. M. Livingston and R. Winqvist (2007). "A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families." *Nature* **446**(7133): 316-319.

Esteller, M., P. G. Corn, S. B. Baylin and J. G. Herman (2001). "A gene hypermethylation profile of human cancer." *Cancer Res* **61**(8): 3225-3229.

- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- García, M. J., V. Fernández, A. Osorio, A. Barroso, G. Llort, C. Lázaro, I. Blanco, T. Caldés, M. de la Hoya, T. Ramón Y Cajal, C. Alonso, M. I. Tejada, C. San Román, L. Robles-Díaz, M. Urioste and J. Benítez (2009). "Analysis of FANCB and FANCN/PALB2 fanconi anemia genes in BRCA1/2-negative Spanish breast cancer families." Breast Cancer Res Treat **113**(3): 545-551.
- Harris, H., O. J. Miller, G. Klein, P. Worst and T. Tachibana (1969). "Suppression of malignancy by cell fusion." Nature **223**(5204): 363-368.
- Hartwell, Hood, Goldberg, Reynolds, Silver and Veres (2000). Genetics: from genes to genomes (1st edition). USA, McGraw-Hill Science.
- Hayakawa, T., Y. Ohtani, N. Hayakawa, K. Shinmyozu, M. Saito, F. Ishikawa and J. Nakayama (2007). "RBP2 is an MRG15 complex component and down-regulates intragenic histone H3 lysine 4 methylation." Genes Cells **12**(6): 811-826.
- Hayakawa, T., F. Zhang, N. Hayakawa, Y. Ohtani, K. Shinmyozu, J. Nakayama and P. R. Andreassen (2010). "MRG15 binds directly to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks." J Cell Sci **123**(Pt 7): 1124-1130.
- Hellebrand, H., C. Sutter, E. Honisch, E. Gross, B. Wappenschmidt, C. Schem, H. Deissler, N. Ditsch, V. Gress, M. Kiechle, C. R. Bartram, R. K. Schmutzler, D. Niederacher, N. Arnold and A. Meindl (2011). "Germline mutations in the PALB2 gene are population specific and occur with low frequencies in familial breast cancer." Hum Mutat **32**(6): E2176-2188.
- Herman, J. G. and S. B. Baylin (2003). "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." N Engl J Med **349**(21): 2042-2054.
- Jair, K. W., K. E. Bachman, H. Suzuki, A. H. Ting, I. Rhee, R. W. Yen, S. B. Baylin and K. E. Schuebel (2006). "De novo CpG island methylation in human cancer cells." Cancer Res **66**(2): 682-692.
- Janatova, M., Z. Kleibl, J. Stribrna, A. Panczak, K. Vesela, M. Zimovjanova, P. Kleiblova, P. Dundr, J. Soukupova and P. Pohlreich (2013). "The PALB2 gene is a strong candidate for clinical testing in BRCA1- and BRCA2-negative hereditary breast cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **22**(12): 2323-2332.
- Janatova, M. and P. Pohlreich (2004). "Microsatellite markers in breast cancer studies." Prague Med Rep **105**(2): 111-118.
- Jensen, R. B., A. Carreira and S. C. Kowalczykowski (2010). "Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination." Nature **467**(7316): 678-683.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-428.
- Jones, S., R. H. Hruban, M. Kamiyama, M. Borges, X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, E. Palmisano, K. Brune, E. M. Jaffee, C. A. Iacobuzio-Donahue, A. Maitra, G.

- Parmigiani, S. E. Kern, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, J. R. Eshleman, M. Goggins and A. P. Klein (2009). "Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene." *Science* **324**(5924): 217.
- Kass, S. U., D. Pruss and A. P. Wolffe (1997). "How does DNA methylation repress transcription?" *Trends Genet* **13**(11): 444-449.
- Kee, Y. and A. D. D'Andrea (2010). "Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability." *Genes Dev* **24**(16): 1680-1694.
- Kutler, D. I., B. Singh, J. Satagopan, S. D. Batish, M. Berwick, P. F. Giampietro, H. Hanenberg and A. D. Auerbach (2003). "A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)." *Blood* **101**(4): 1249-1256.
- Liu, J., T. Doty, B. Gibson and W. D. Heyer (2010). "Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA." *Nat Struct Mol Biol* **17**(10): 1260-1262.
- Lodygin, D. and H. Hermeking (2005). "The role of epigenetic inactivation of 14-3-3sigma in human cancer." *Cell Res* **15**(4): 237-246.
- Ma, J., H. Cai, T. Wu, B. Sobhian, Y. Huo, A. Alcivar, M. Mehta, K. L. Cheung, S. Ganesan, A. N. Kong, D. D. Zhang and B. Xia (2012). "PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function." *Mol Cell Biol* **32**(8): 1506-1517.
- Miki, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P. A. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L. M. Bennett and W. Ding (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." *Science* **266**(5182): 66-71.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber and E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* **99**(3): 247-257.
- Okano, M., S. Xie and E. Li (1998). "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." *Nat Genet* **19**(3): 219-220.
- Pakkanen, S., T. Wahlfors, S. Siltanen, M. Patrikainen, M. P. Matikainen, T. L. Tammela and J. Schleutker (2009). "PALB2 variants in hereditary and unselected Finnish prostate cancer cases." *J Negat Results Biomed* **8**: 12.
- Palmisano, W. A., K. K. Divine, G. Saccomanno, F. D. Gilliland, S. B. Baylin, J. G. Herman and S. A. Belinsky (2000). "Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum." *Cancer Res* **60**(21): 5954-5958.
- Pauty, J., A. Rodrigue, A. Couturier, R. Buisson and J. Y. Masson (2014). "Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer." *Biochem J* **460**(3): 331-342.
- Pohlreich, P., Z. Kleibl, P. Kleiblová, M. Janatová, J. Soukupová, E. Macháčková, J. Házová, P. Vašíčková, E. Sťahlová Hrabincová, M. Navrátilová, M. Svoboda and L. Foretová (2012). "[The clinical importance of a genetic analysis of moderate-risk

- cancer susceptibility genes in breast and other cancer patients from the Czech Republic]." Klin Onkol **25 Suppl**: S59-66.
- Radman, M. and A. R. Kinsella (1980). "Chromosomal events in carcinogenic initiation and promotion: implications for carcinogenicity testing and cancer prevention strategies." IARC Sci Publ(27): 75-90.
- Reid, S., D. Schindler, H. Hanenberg, K. Barker, S. Hanks, R. Kalb, K. Neveling, P. Kelly, S. Seal, M. Freund, M. Wurm, S. D. Batish, F. P. Lach, S. Yetgin, H. Neitzel, H. Ariffin, M. Tischkowitz, C. G. Mathew, A. D. Auerbach and N. Rahman (2007). "Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer." Nat Genet **39**(2): 162-164.
- Rhee, I., K. E. Bachman, B. H. Park, K. W. Jair, R. W. Yen, K. E. Schuebel, H. Cui, A. P. Feinberg, C. Lengauer, K. W. Kinzler, S. B. Baylin and B. Vogelstein (2002). "DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells." Nature **416**(6880): 552-556.
- Rideout, W. M., G. A. Coetzee, A. F. Olumi and P. A. Jones (1990). "5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes." Science **249**(4974): 1288-1290.
- Robertson, K. D., E. Uzvolgyi, G. Liang, C. Talmadge, J. Sumegi, F. A. Gonzales and P. A. Jones (1999). "The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors." Nucleic Acids Res **27**(11): 2291-2298.
- Russo, Martienssen and Riggs (1996). Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scully, R., J. Chen, R. L. Ochs, K. Keegan, M. Hoekstra, J. Feunteun and D. M. Livingston (1997). "Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage." Cell **90**(3): 425-435.
- Sharan, S. K., M. Morimatsu, U. Albrecht, D. S. Lim, E. Regel, C. Dinh, A. Sands, G. Eichele, P. Hasty and A. Bradley (1997). "Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2." Nature **386**(6627): 804-810.
- Shih, I. M., T. L. Wang, G. Traverso, K. Romans, S. R. Hamilton, S. Ben-Sasson, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (2001). "Top-down morphogenesis of colorectal tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2640-2645.
- Southey, M. C., Z. L. Teo, J. G. Dowty, F. A. Odefrey, D. J. Park, M. Tischkowitz, N. Sabbaghian, C. Apicella, G. B. Byrnes, I. Winship, L. Baglietto, G. G. Giles, D. E. Goldgar, W. D. Foulkes, J. L. Hopper and k. f. t. B. C. F. Registry (2010). "A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer." Breast Cancer Res **12**(6): R109.
- Stadler, Z. K., K. A. Schrader, J. Vijai, M. E. Robson and K. Offit (2014). "Cancer genomics and inherited risk." J Clin Oncol **32**(7): 687-698.

- Suzuki, H., E. Gabrielson, W. Chen, R. Anbazhagan, M. van Engeland, M. P. Weijnen, J. G. Herman and S. B. Baylin (2002). "A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer." Nat Genet **31**(2): 141-149.
- Sy, S. M., M. S. Huen and J. Chen (2009). "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(17): 7155-7160.
- Thorslund, T., M. J. McIlwraith, S. A. Compton, S. Lekomtsev, M. Petronczki, J. D. Griffith and S. C. West (2010). "The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA." Nat Struct Mol Biol **17**(10): 1263-1265.
- Tischkowitz, M., N. Sabbaghian, A. M. Ray, E. M. Lange, W. D. Foulkes and K. A. Cooney (2008). "Analysis of the gene coding for the BRCA2-interacting protein PALB2 in hereditary prostate cancer." Prostate **68**(6): 675-678.
- Tischkowitz, M. and B. Xia (2010). "PALB2/FANCN: recombining cancer and Fanconi anemia." Cancer Res **70**(19): 7353-7359.
- Tischkowitz, M., B. Xia, N. Sabbaghian, J. S. Reis-Filho, N. Hamel, G. Li, E. H. van Beers, L. Li, T. Khalil, L. A. Quenneville, A. Omeroglu, A. Poll, P. Lepage, N. Wong, P. M. Nederlof, A. Ashworth, P. N. Tonin, S. A. Narod, D. M. Livingston and W. D. Foulkes (2007). "Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(16): 6788-6793.
- Varley, J. M., D. G. Evans and J. M. Birch (1997). "Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review." Br J Cancer **76**(1): 1-14.
- Vietri, M. T., G. Caliendo, A. Casamassimi, M. Cioffi, M. L. De Paola, C. Napoli and A. M. Molinari (2015). "A novel PALB2 truncating mutation in an Italian family with male breast cancer." Oncol Rep **33**(3): 1243-1247.
- Walsh, T. and M. C. King (2007). "Ten genes for inherited breast cancer." Cancer Cell **11**(2): 103-105.
- Watanabe, Y., I. Maeda, R. Oikawa, W. Wu, K. Tsuchiya, Y. Miyoshi, F. Itoh, K. Tsugawa and T. Ohta (2013). "Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy." Genes Cells **18**(12): 1120-1130.
- Weil, M. K. and A. P. Chen (2011). "PARP inhibitor treatment in ovarian and breast cancer." Curr Probl Cancer **35**(1): 7-50.
- Welsh, P. L. and M. C. King (2001). "BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer." Hum Mol Genet **10**(7): 705-713.
- Xia, B., Q. Sheng, K. Nakanishi, A. Ohashi, J. Wu, N. Christ, X. Liu, M. Jasin, F. J. Couch and D. M. Livingston (2006). "Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2." Mol Cell **22**(6): 719-729.

Zhang, F., Q. Fan, K. Ren and P. R. Andreassen (2009). "PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2." Mol Cancer Res **7**(7): 1110-1118.

Zhang, F., J. Ma, J. Wu, L. Ye, H. Cai, B. Xia and X. Yu (2009). "PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response." Curr Biol **19**(6): 524-529.