

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Celogenomové sekvenování při diagnostice rakoviny
Bakalářská práce

Eva Nasvetrová

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Eva Nasvetrová**
Osobní číslo: **C19275**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Celogenomové sekvenování při diagnostice rakoviny**
Téma práce anglicky: **Whole-genome Sequencing in Cancer Diagnosis**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma Celogenomové sekvenování při diagnostice rakoviny
 - a) Rakovina z pohledu molekulární biologie
 - b) Přehled diagnostických metod celogenomového sekvenování
 - c) Využití konkrétních metod pro diagnostiku

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lucie Michalcová**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30.6. 2023

Eva Nasvetrová v.r.

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. a Ing. Lucii Michalcové za vedení mé bakalářské práce, za všechny rady a ochotu při jejím psaní.

Anotace

Bakalářská práce se zaměřuje na sekvenování a molekulární analýzu DNA v diagnostice rakoviny. V práci jsou uvedeny a popsány jednotlivé metody sekvenování se zaměřením převážně na sekvenování nové generace. Práce charakterizuje rakovinu z pohledu molekulární biologie a uvádí některé příčiny jejího vzniku. Následující část práce pojednává o využití celogenomového sekvenování v diagnostice rakoviny s příklady analýz konkrétních genů. V práci je také zmíněna úloha miRNA a způsob, kterým tyto molekuly mohou ovlivňovat vznik rakoviny.

Klíčová slova

Analýza, celogenomové sekvenování, DNA, miRNA, rakovina, sekvenování

Annotation

Title: Whole-genome sequencing in cancer diagnosis

This bachelor's thesis focuses on DNA sequencing and molecular analysis in cancer diagnosis. Individual sequencing methods are presented and described in the work, focusing mainly on next-generation sequencing. The thesis characterizes cancer from the point of view of molecular biology and specifies some of the causes of its occurrence. The following part of the thesis discusses the use of whole-genome sequencing in cancer diagnosis with examples of analyses of specific genes. The work also mentions the role of miRNAs and the way in which these molecules can influence the development of cancer.

Keywords

Analysis, cancer, DNA, miRNA, sequencing, whole-genome sequencing

Obsah

SEZNAM ILUSTRACÍ	8
SEZNAM ZKRATEK	9
ÚVOD	11
1 SEKVENOVÁNÍ A MOLEKULÁRNÍ ANALÝZA DNA	12
1.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	12
1.2 SANGEROVO SEKVENOVÁNÍ	14
1.3 MAXAM-GILBERTOVO SEKVENOVÁNÍ.....	15
2 SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE	17
2.1 SEKVENOVÁNÍ DRUHÉ GENERACE	17
2.1.1 Technologie 454 sekvenování	17
2.1.2 Technologie firmy Illumina.....	20
2.1.3 Technologie Ion Torrent.....	22
2.2 SEKVENOVÁNÍ TŘETÍ A VYŠŠÍ GENERACE	23
2.2.1 True Single Molecule Sequencing (tSMS).....	23
2.2.2 Single Molecule Real Time Sequencing (SMRT).....	25
2.2.3 Technologie nanopórů	26
3 RAKOVINA	28
3.1 DEFINICE RAKOVINY	28
3.2 ETIOLOGIE RAKOVINY – MUTACE	29
3.3 NÁDOROVÉ GENY, MI RNA.....	32
4 CELOGENOMOVÉ SEKVENOVÁNÍ V DIAGNOSTICE RAKOVINY	34
4.1 METODY WGS, WES A TARGETED GENE PANELS	34
4.2 VYUŽITÍ METOD V DIAGNOSTICE RAKOVINY	35
4.2.1 Targeted gene sequencing	35
4.2.2 Whole genome sequencing (WGS)	36
4.2.3 Diagnostika miRNA	38
4.2.4 Shrnutí a porovnání metod	39
5 ANALÝZA KONKRÉTNÍCH GENU	41
6 ZÁVĚR	43
SEZNAM ODBORNÉ LITERATURY	44
SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ	50

Seznam ilustrací

Obrázek 1 – Průběh PCR.....	14
Obrázek 2 – Sangerovo sekvenování.....	15
Obrázek 3 – Maxam-Gilbertovo sekvenování.....	16
Obrázek 4 – Pyrosekvenování.....	18
Obrázek 5 – Jednotlivé kroky u emulzní PCR.....	19
Obrázek 6 – Pikrotitrační destička.....	19
Obrázek 7 – Sekvenování firmy Illumina.....	21
Obrázek 8 – Technologie Ion Torrent.....	23
Obrázek 9 – Proces tSMS na povrchu průtokové cely.....	24
Obrázek 10 – Sekvenování SMRT.....	26
Obrázek 11 – Sekvenování SMRT.....	26
Obrázek 12 – Technologie nanopórů.....	27
Obrázek 13 – Proces metastáze.....	29
Obrázek 14 – Příklad chemického mutagenu.....	30
Obrázek 15 – Působení UV záření na DNA.....	31
Obrázek 16 – Methylace DNA.....	33
Obrázek 17 – Whole exome sequencing (WES).....	34
Obrázek 18 – Rozdíl sekvenování u metod Targeted gene panels, WES a WGS.....	36

Seznam zkratek

APS – Adenosinfosfosulfát

BAM – Binary alignment map

BWA – Burrows-Wheeler aligner

dATP – Deoxyadenosintrifosfát

dATP α S – Deoxyadenosin-alfa-thiofosfát

ddNTP – Dideoxynukleotid

Dnmt – DNA methyltransferáza

dNTP – Deoxyribonukleosidfosfát

dTTP – Deoxythymidintrifosfát

FISH – Fluorescenční hybridizace *in situ*

GATK – Genome analysis toolkit

GTP – Guanosintrifosfát

Mb – Megabáze

miRNA – microRNA

NGS – Next generation sequencing

PCR – Polymerázová řetězová reakce

PGM – Personal genome machine

PTP – Pico titer plate

qRT-PCR – Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

SAM – Sequence alignment map

SMRT – Single molecule real time sequencing

SMS – Single molecule sequencing

SNP – Single nukleotide polymorphism

TMB – Tumorová mutační zátěž

tSMS – True single molecule sequencing

VEP – Ensembl variant effect predictor

WES – Whole exome sequencing

WGS – Whole genome sequencing

ZMW – Zero-mode waveguide

Úvod

V mé bakalářské práci se budu zaměřovat na sekvenování a molekulární analýzu DNA. V první části mé práce uvedu a popíšu princip jednotlivých metod sekvenování, které se využívaly k analýze DNA dříve až po metody sekvenování nové generace. Sekvenování DNA je velice přínosná oblast analýzy DNA, která nám může pomoci v diagnóze různých onemocnění. Vybrala jsem si využití těchto metod v diagnostice rakoviny, které je věnována druhá část mé práce. Rakovinu jako takovou stručně definuji hlavně z hlediska genetiky a objasním některé příčiny jejího vzniku.

Metody, které se v poslední době nejvíce uplatnily při diagnostice rakoviny, jsou právě metody celogenomového sekvenování, popř. celoexomového sekvenování či vybraných genů DNA. O těchto metodách a jejich využití bude poslední část mé bakalářské práce, kde popíšu, jak tyto metody fungují, v čem se odlišují a co je jejich předností nebo naopak nedostatkem. V této části zmíním také diagnostiku molekul miRNA, které mohou mít rovněž vliv na vznik rakoviny. Nakonec se zaměřím na analýzu konkrétních genů s využitím právě celogenomového sekvenování, které může být významným nástrojem k identifikaci mutací rakovinných genů a následně k léčbě rakoviny.

1 Sekvenování a molekulární analýza DNA

Sekvenování DNA je proces využívající biochemických metod ke stanovení správného pořadí nukleotidů v molekule DNA. V minulosti se používalo rozštěpení izolované DNA na fragmenty pomocí restrikčních enzymů (endonukleáz), to poté umožnilo sestavení nukleotidů z daných fragmentů do správného pořadí (Vrba, 1994). Mezi první techniky sekvenování DNA můžeme zařadit metody pojmenované po svých objevitelích – Sangerovo sekvenování a Maxam-Gilbertovo sekvenování. Metody následně vznikající po těchto se označují jako metody nové generace (*next generation sequencing*) (Kchouk et al., 2017). Tyto metody se od původních liší především kapacitou a objemem získaných dat. Mezi nejvýznamnější metody molekulární analýzy DNA patří Polymerázová řetězová reakce (PCR), kterou poprvé popsal Kary Mullis se svými kolegy již v roce 1987 (Sršeň et al., 2000) a v roce 1993 za ni obdržel Nobelovu cenu (Hoffman, 2022). Tato metoda se uplatňuje v řadě modifikací a variantách a je i součástí Sangerova sekvenování a některých metod sekvenování nové generace.

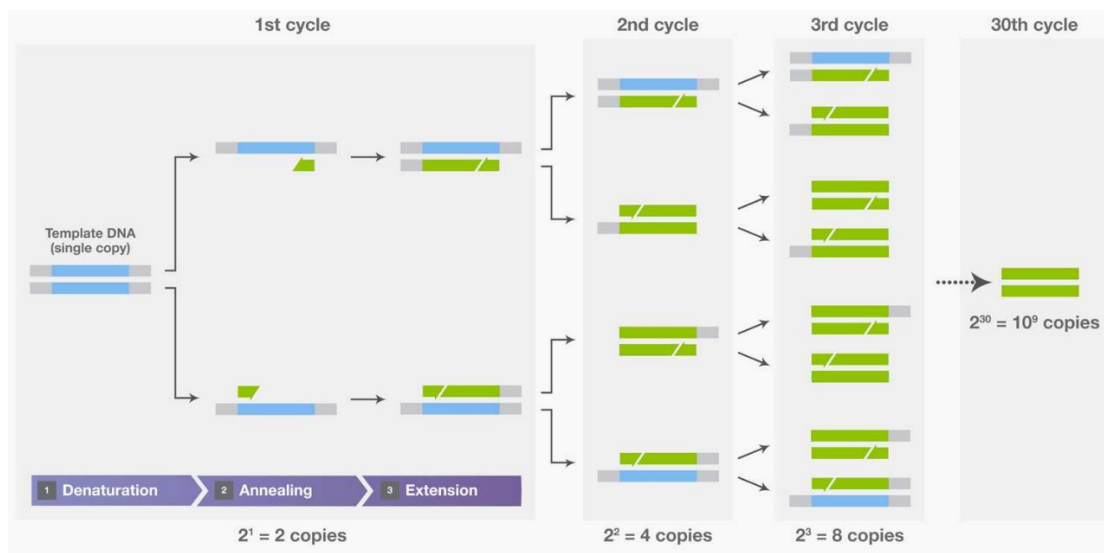
1.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR neboli „polymerase chain reaction“ (polymerázová řetězová reakce), je metoda molekulární biologie, při které dochází k amplifikaci (zmnožení) specifického úseku DNA. Principem této metody je opakovaná replikace nukleových kyselin, která je doprovázená termostabilní DNA polymerázou (Staněk, 2013). Tato metoda se provádí *in vitro* v laboratoři a reakční směs obsahuje templátovou DNA, která byla izolována ze vzorku, již zmíněnou DNA polymerázu Taq, DNA primery a směs dNTP (deoxyribonukleosidfosfát). Pro aktivitu DNA polymerázy je také nezbytné slabě zásadité prostředí, které zprostředkuje pufr a hořčičnaté ionty (Sršeň et al., 2000; Beránek, 2016).

Průběh samotné reakce se skládá ze tří fází. Nejprve se reakční směs napipetuje do zkumavek, které se vloží do termocykleru, zde probíhají teplotní cykly, které se liší pro každou fázi reakce. První fází je denaturace DNA, kdy se zkumavka zahřeje na vysokou teplotu okolo 94-95 °C – takto vysoká teplota způsobí separaci (rozvolnění) dvouřetězcové DNA, jednořetězcová vlákna následně slouží jako templát pro DNA polymerázu. Druhou fází je tzv. annealing, principem tohoto procesu je nasedání primerů na DNA vlákno. Primery jsou krátké oligonukleotidy, které jsou chemicky syntetizované a nasedají ke komplementárním úsekům templátové DNA. Jejich 3'-OH-konce slouží jako počátek replikace pro DNA polymerázu. Primery tedy takto vymezí úsek DNA, který bude následně amplifikován.

Druhá fáze probíhá za teploty 50-60 °C a trvá přibližně 30 až 90 sekund (Bártová, 2011). Výsledkem druhé fáze je sekvence ohraničená primery a takto jsou obě vlákna templátové DNA připravena na třetí fázi – prodloužení (elongaci) (Roche, 2021). Třetí fáze probíhá na principu polymerační reakce, kdy dochází k syntéze nového řetězce DNA, který je komplementární k původnímu vlákně. DNA polymeráza nasedne na primery, které vymezily daný úsek DNA a dochází k připojování volných nukleotidů k vlákně DNA na základě komplementarity bází. Třetí fáze vyžaduje zvýšení teploty na 72 °C a trvá 45-90 sekund (Bártová, 2011). Celý cyklus složený z výše popsaných fází se může opakovat několikrát za sebou, kdy se využívá vždy vytvořená kopie DNA, z daného duplikátu poté vznikají další dvě nové kopie (Roche, 2021). Přibližně po 30 cyklech lze takto získat až 10^5 kopií daného úseku DNA.

Produkt PCR můžeme analyzovat pomocí gelové elektroforézy, kde vizualizace probíhá barvením (Sršeň et al., 2000). K detekci produktu se často používá ethidium bromid (Pereira et al., 2017) či např. barvy SYBR, které se vyznačují vysokou citlivostí a nízkou mutagenitou. Tato metoda může být využita k diagnóze mnoha nemocí, jako jsou infekční onemocnění HIV, syfilis, hepatitida. Dále slouží k průkazu leukémie či testu otcovství (Rahman et al., 2013). Výhodou této metody je, že k reakci je zapotřebí velmi malé množství DNA a můžeme získat miliardy kopií původní DNA pouze z jedné molekuly (Bártová, 2011). Nevýhodou může být finanční aspekt této metody, kdy jsou vyžadovány drahé přístroje a vybavení. Nicméně v dnešní době jsou již cykléry cenově dostupné. Je zapotřebí i kvalifikovaný personál a může docházet i k falešně pozitivním či negativním výsledkům, které mohou snižovat přesnost a citlivost reakce. Je tedy potřeba dbát na správnou práci a čistotu (Rahman et al., 2013).



Obrázek 1 – Průběh PCR: nejprve dochází k rozvolnění dvouřetězcové DNA vlivem zahřívání (tzv. denaturace), ve druhém kroku dochází k nasedání primerů na jednořetězcová vlákna (tzv. annealing), primery slouží jako počátek pro replikaci DNA. V poslední fázi dochází k syntéze nového řetězce DNA, který je komplementární k původnímu – tento krok se nazývá prodloužení (extension) – takto je uzavřen první cyklus PCR, cyklů může být až 30 a vždy se při nich exponenciálně zvyšuje počet vzniklých kopií (Thermo Fisher).

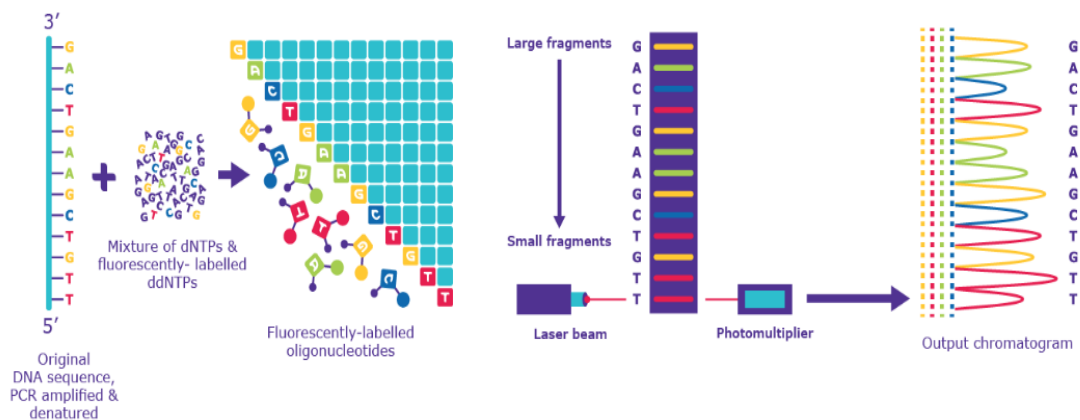
1.2 Sangerovo sekvenování

Většina technik sekvenování DNA se zaměřuje na zjišťování pořadí nukleotidových bází, které se postupně přiřazují při syntéze nového řetězce DNA, který vzniká podle předlohy DNA, tzv. templátu.

Sangerovo sekvenování je pojmenováno podle jeho objevitele Fredericka Sangera. Tato metoda v roce 1977 umožnila čtení velmi dlouhých řetězců, konkrétně až 1000 bází na jednu sekvenační reakci. Při této metodě dochází k opakované syntéze nového řetězce DNA. Při každém opakování je ale syntéza přerušena, protože se do řetězce náhodně začlení značený dideoxynukleotid (ddNTP), což je modifikovaná nukleotidová báze a ta způsobí, že DNA polymeráza není schopná pokračovat v syntéze nového řetězce. Nezbytnou součástí jsou specifické fluorescenční barvy, kterými se dané modifikované báze značí. Každý ze čtyř nukleotidů je označený odlišnou fluorescenční barvou, díky tomu poté při sekvenaci poznáme, o který nukleotid se jedná a můžeme určit jeho pořadí. Vlivem náhodného přerušování při syntéze nového komplementárního řetězce DNA vznikají různě dlouhé molekuly. Výsledkem je směs molekul, které mohou obsahovat od 10 až do 1000 bází (Kolísko, 2017). Molekuly DNA se poté seřadí od nejkratších po nejdelší a následně se přečte jejich pořadí bází (výsledná sekvence), vyhodnocení probíhá pomocí gelové elektroforézy (Staňková et al., 2010). V současnosti se Sangerovo sekvenování provádí v uspořádání kapilární elektroforézy s fluorescenčním detektorem.

Tyto analyzátoři umožňují paralelní analýzu desítek vzorků. Kapilární elektroforéza má oproti klasické elektroforéze vyšší separační účinnost a je rychlejší (Beránek, 2016).

Výhody této metody spočívají hlavně v délce vznikajících úseků DNA, které se dají sekvenovat jedinou reakcí a také v přesnosti čtení, při kterém vzniká minimum chyb. Naopak mezi nevýhody patří, že dochází k sekvenování pouze jednoho úseku DNA v rámci celého procesu, dále je nevýhodou relativně vysoká cena a nízká rychlost (to se může poté negativně projevit např. při sekvenování celého genomu) (Kolísko, 2017).



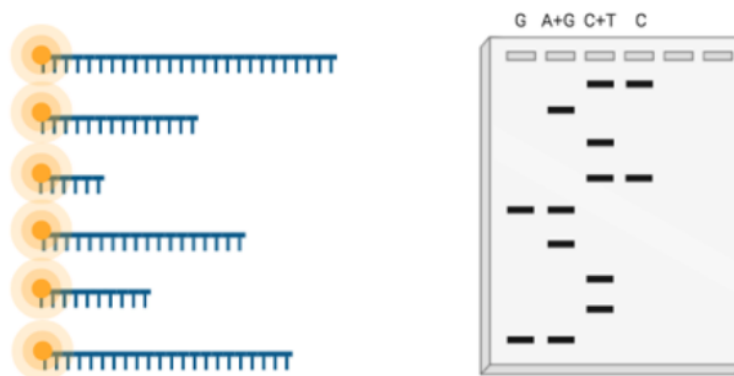
Obrázek 2 – Sangerovo sekvenování: v první části obrázku je původní sekvence DNA, dochází zde k tzv. řetězové terminační PCR, která je charakteristická přidáním modifikovaných ddNTP, které jsou fluorescenčně značené. Principem je přidávání nukleotidů k rostoucímu řetězci DNA, přičemž vzniká fosfodiesterová vazba mezi 3'-OH skupinou posledního nukleotidu a 5'-fosfátém následujícího nukleotidu. Právě díky začlenění ddNTP dochází k přerušení syntézy nového řetězce DNA, protože ddNTP neobsahují 3'-OH skupinu nutnou ke vzniku fosfodiesterové vazby. Výsledkem jsou různě dlouhé oligonukleotidové kopie. V druhé části obrázku je znázorněna kapilární elektroforéza s fluorescenčním detektorem, která oddělí dané oligonukleotidy na základě velikosti – kratší fragmenty se budou v gelu pohybovat rychleji. Z výsledného záznamu můžeme určit pořadí nukleotidů původní sekvence DNA – gel čteme zezdola nahoru (Merck, 2023).

1.3 Maxam-Gilbertovo sekvenování

Maxam-Gilbertovo sekvenování je chemická metoda, jejíž podstatou je specifické štěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech báze daného typu (Staňková et al., 2010). Úseky DNA se rozštěpí na fragmenty o velikosti několika stovek párů bází. Pomocí polynukleotidové kinázy a terminální transferázy se konce fragmentů označí radioaktivně. Vlivem hydroxidu sodného dochází k denaturaci řetězců a poté proběhne elektroforéza v gelu obsahujícím močovinu. U obou separovaných řetězců DNA se zaznamená radioaktivní záření na fotografický papír a podle jejich polohy radioaktivních fragmentů se následně řetězce vyříznou z gelu. Poté je jednořetězcová DNA rozdělena do čtyř zkumavek (Beránek, 2016).

Každá zkumavka obsahuje chemická činidla pro konkrétní typ báze. Proběhne opět elektroforéza, kde se jednotlivé úseky seřadí podle jejich rychlosti v gelu – v elektrickém poli se kratší úseky pohybují rychleji, delší pomaleji (Staňková et al., 2010). Následně se vyhodnotí pořadí nukleotidů na základě radioaktivně značených fragmentů DNA (Beránek, 2016).

Nevýhodou je časová náročnost metody, potenciální ztráta DNA pelety během centrifugace a precipitace ethanolem či koprecipitace hydrazinu s DNA (Jagadeeswaran et al., 1986). Pro toxicitu reagensů (jako je právě hydrazin) a vysokou teplotu při degradaci nukleových kyselin se tato metoda již nepoužívá (Beránek, 2016).



Obrázek 3 – Maxam-Gilbertovo sekvenování: na prvním obrázku jsou znázorněny radioaktivně značené fragmenty DNA. U fragmentů s radioaktivním značením na jejich 5' konci proběhne elektroforéza, při které se krátké fragmenty v gelu pohybují rychleji než ty dlouhé, gel se poté čte zezdola nahoru. Pokud je zvýrazněný proužek G i A+G jedná se o nukleotid guanin, při zvýraznění pouze A+G proužku se jedná o adenin, stejně tomu tak je i u proužků C+T a C. Výsledná sekvence z obrázku by tedy měla být přečtena jako „GTTAGCTAC“ (Goon Suet Min, 2021).

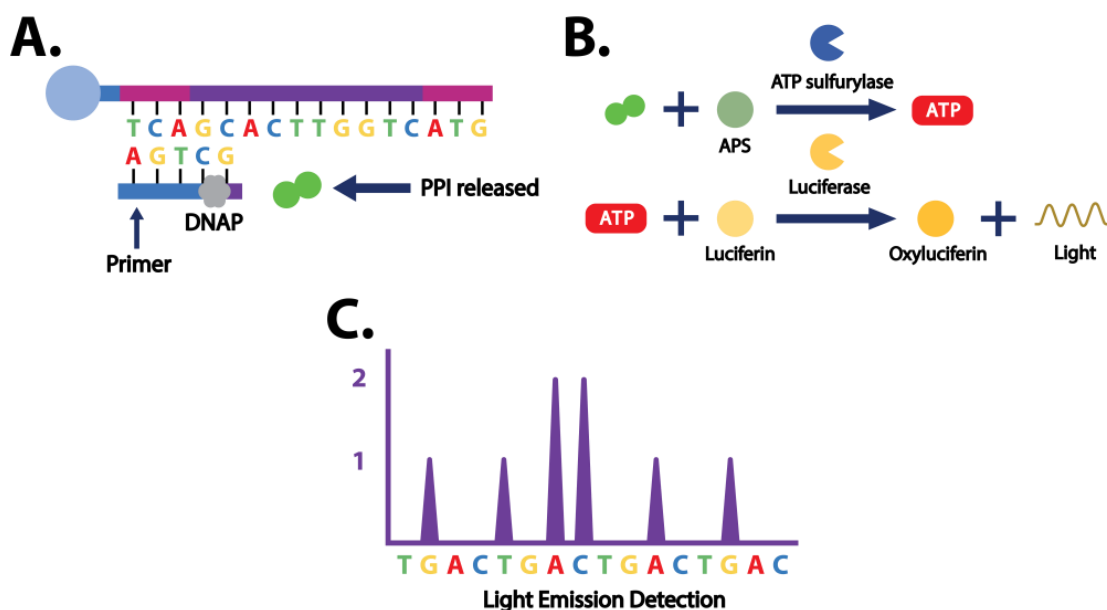
2 Sekvenování nové generace

2.1 Sekvenování druhé generace

První zprávy o sekvenování druhé generace se začaly šířit v roce 2005, je známé také pod zkratkou NGS, což znamená *next generation sequencing*. V dnešní době existuje již minimálně pět výrobců technologií NGS, které jsou určeny pro celogenomové sekvenování s využitím v klinické praxi. Tyto technologie se sice liší principem sekvenování i amplifikací fragmentů DNA, avšak řada kroků při přípravě vzorků DNA či při následném hodnocení výsledků je podobná (Beránek, 2016). V této kapitole zmíním ty nejpoužívanější metody NGS.

2.1.1 Technologie 454 sekvenování

První sekvenátor využívající tuto technologii se nazývá 454 Genome FLX System, je komerčně dostupný od roku 2005 a jeho principem je metoda tzv. pyrosekvenování. Jedná se o proces, při kterém se během syntézy komplementárního řetězce DNA uvolňuje pyrofosfát vlivem začleňování nukleotidů DNA polymerázou (Phoebe Chen et al., 2010). Tato technika je založena na enzymatických reakcích, během kterých dochází k produkci světla (emisi fotonů) – tu iniciuje právě uvolněný pyrofosfát. Intenzita záblesku světla odpovídá počtu začleněných nukleotidů do nového řetězce DNA a zaznamenává se prostřednictvím detektoru. Pyrosekvenování je katalyzováno čtyřmi enzymy: ATP sulfurylázou, apyrázou, luciferázou a již zmíněnou DNA polymerázou (Agah et al., 2004). Čím více je začleněných nukleotidů, tím větší je množství uvolněných fotonů, které jsou poté zaznamenány pomocí sekvenátoru. Mezi výhody metody pyrosekvenování patří její rychlost, přesnost a plná automatizace, proto je v současnosti její princip využíván při sekvenování nové generace (Beránek, 2016).



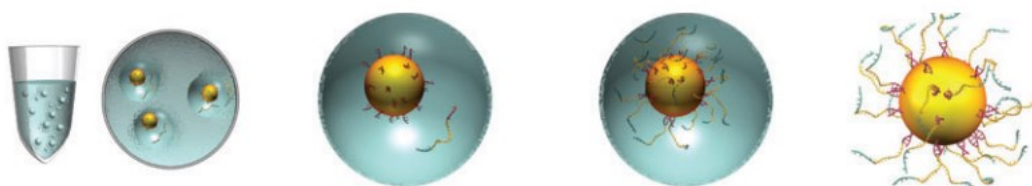
Obrázek 4 – Pyrosekvenování: na obrázku A dochází k navázání primeru, který je komplementární k adaptéru sekvence DNA a k následnému přiřazování komplementárních nukleotidů prostřednictvím DNA polymerázy (DNAP), přičemž se uvolní pyrofosfát (PPI). Je důležité zmínit, že místo deoxyadenosintrifosfátu (dATP) se využívá deoxyadenosin-alfa-thiotrifosfát (dATP α S), který nemůže být rozpoznán luciferázou a nevede tedy k nežádoucí produkci světla. PPI reaguje s adenosinofosfosulfátem (APS), který je přítomen v roztoku za vzniku ATP, reakce je katalyzována ATP sulfurylázou. ATP následně za katalýzy luciferinázou způsobí přeměnu luciferinu na oxyluciferin a dojde zde k produkci světla (obrázek B). V poslední fázi (obrázek C) dochází k detekci emise světla pomocí softwaru, kdy množství produkovaného světla je přímo úměrné množství ATP v roztoku, což poukazuje na to, kolik nukleotidů bylo přidáno do prodlužujícího řetězce DNA (Nguyen, 2021).

Technologie 454 sekvenování využívá principu klonální amplifikace metody emulzní PCR. Při této metodě dochází k hybridizaci jednořetězcových fragmentů DNA ke speciálním kuličkám, které obsahují sekvenci DNA komplementární k daným fragmentům a slouží tak jako primer pro amplifikační reakci. Emulzní PCR má název podle olejové emulze s vodou, která obklopuje každou kuličku a probíhá zde následná amplifikace. Důležité je, že během tohoto procesu se váže pouze jeden fragment DNA na jednu kuličku. Po skončení této reakce nese každá kulička přibližně 10 milionů kopií, které jsou identické k původnímu navázanému fragmentu DNA.

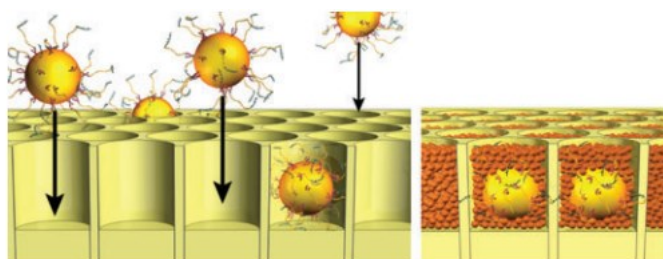
Dalším krokem reakce je tzv. enrichment neboli obohacení kuliček, kdy na kuličkách zůstane pouze amplifikovaná DNA (jednořetězcové fragmenty DNA) a zbytek se odmyje. Na takto upravené kuličky se připojí primer a směs se nanese do speciální pikrotitrační destičky (PTP = *pico titer plate*), která je uzpůsobena tak, že do jedné jamky zapadne pouze jedna kulička. Do destičky se poté přidávají další kuličky, které jsou nezbytné pro průběh pyrosekvenační reakce, obsahují enzymy sulfurylázu, DNA polymerázu, luciferázu a apyrázu. Jsou přítomny také kuličky se substráty luciferinem a adenosin 5'-fosfosulfátem (APS), každý jmenovaný enzym či substrát má danou roli během reakce.

DNA polymeráza umožňuje na základě komplementarity začlenění nukleotidu do nového řetězce DNA, tento proces je charakteristický uvolněním pyrofosfátu. Za přítomnosti APS a enzymu sulfurylázy se pyrofosfát přeměňuje na ATP, což způsobí za přítomnosti luciferázy konverzi luciferinu na oxyluciferin. Právě tuto reakci doprovází již zmíněná emise fotonů, kterou zaznamenává CCD detektor (Koubková et al., 2014). Apyráza slouží k degradaci nespotřebovaných nukleotidů.

Samotné vyhodnocení záznamu sekvenování probíhá tak, že CCD kamera převede světelné impulsy na příslušné sekvence nukleotidů, u kterých se poté určí jejich pořadí v daných jamkách pikrotitrační destičky (Beránek, 2016).



Obrázek 5 – Jednotlivé kroky u emulzní PCR: první obrázek – navázání fragmentů DNA na povrch kuliček, druhý a třetí obrázek demonstruje uzavření a následnou amplifikaci v olejové emulzi, čtvrtý obrázek – uvolnění kuličky z tzv. mikroreaktoru olejové emulze (Mardis, 2008).



Obrázek 6 – Pikrotitrační destička: kuličky uvolněné z olejové emulze s navázanými fragmenty DNA se napipetují do pikrotitrační destičky, která obsahuje 96 jamek – na každou jamku připadá jedna kulička s amplifikovaným fragmentem DNA. Do destičky se také přidají všechny nezbytné enzymy pro průběh pyrosekvenční reakce (viz Obrázek 4 – Pyrosekvenování: na obrázku A dochází k navázání primeru, který je komplementární k adaptéru sekvence DNA a k následnému přiřazování komplementárních nukleotidů prostřednictvím DNA polymerázy (DNAP), přičemž se uvolní pyrofosfát (PPI). Je důležité zmínit, že místo deoxyadenosintrifosfátu (dATP) se využívá deoxyadenosin-alfa-thiotrifosfát (dATPαS), který nemůže být rozpoznán luciferázou a nevede tedy k nežádoucí produkci světla. PPI reaguje s adenosinfosulfátem (APS), který je přítomen v roztoku za vzniku ATP, reakce je katalyzována ATP sulfurylázou. ATP následně za katalýzy luciferázou způsobí přeměnu luciferinu na oxyluciferin a dojde zde k produkci světla (obrázek B). V poslední fázi (obrázek C) dochází k detekci emise světla pomocí softwaru, kdy množství produkovaného světla je přímo úměrné množství ATP v roztoku, což poukazuje na to, kolik nukleotidů bylo přidáno do prodlužujícího řetězce DNA (Nguyen, 2021).), díky které následně dochází k detekci sekvence nukleotidů (Mardis, 2008).

2.1.2 Technologie firmy Illumina

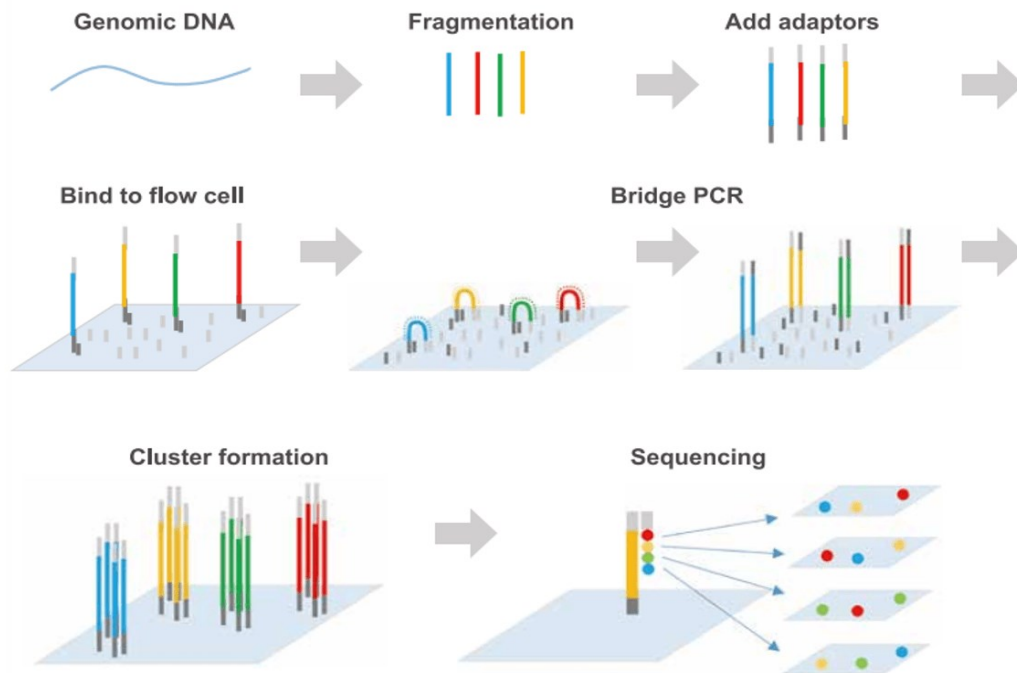
Firma Illumina odkoupila patent této technologie od firmy Solexa v roce 2007. Illumina využívá sekvenátory HiSeq, MiSeq či NextSeq. Sekvenování probíhá v průtokové cele (skleněná destička) a musí mu předcházet opět klonální amplifikace, ale tentokrát pomocí metody *bridge* PCR (Beránek, 2016).

Součástí *bridge* PCR je průtoková cela obsahující 8 kanálů, na jejíž povrchu probíhá „můstková“ amplifikace fragmentů DNA pomocí DNA polymerázy. Prostřednictvím DNA polymerázy dochází ke vzniku mnohonásobného množství kopií DNA, tyto kopie můžeme označit jako tzv. *cluster*, kdy každý *cluster* obsahuje přibližně jeden milion kopií původního fragmentu DNA (Mardis, 2008).

DNA fragmenty jsou nejprve upraveny na velikost, která nepřesahuje více jak 800 bází a k jejich koncům jsou připojeny adaptory. Fragmenty jsou následně denaturovány a naváží se na povrch cely, která obsahuje adaptory komplementární k upraveným fragmentům. Adaptory na povrchu cely mají funkci jako primery a jsou tak nezbytné pro syntézu dvouřetězcové DNA. Vzniklá dvouřetězcová DNA je následně denaturována. Původní řetězec je z průtokové cely odmyt, naopak nově syntetizovaný řetězec je kovalentně navázaný k povrchu cely a hybridizuje k primerům. Vlivem hybridizace dochází k přemostění (ohnutí) vlákn, tím se uzavírá jeden cyklus PCR. V dalším cyklu je primer znovu prodloužen DNA polymerázou, což vede následně ke vzniku dvouřetězcového mostu. Tyto mosty jsou opět denaturovány a jako templáty pro reakci budou sloužit již zmíněné *cluster* DNA (Koubková et al., 2014).

Cluster obsahují pouze *forward* vlákna neboli vlákna přímá. Tyto vlákna vznikají odštěpením reverzních vláken pomocí restričního enzymu v oblasti primeru. Během tohoto sekvenování se využívají reverzibilně terminační nukleotidy A, C, T, G, kde každý nukleotid je značený jiným fluoroforem. Nukleotidy obsahují deoxyribosu, u které je hydroxylová skupina, umístěná na C3 uhlíku, reverzibilně modifikována funkční allylovou či azidomethyllovou skupinou. Následně se tyto deoxynukleotidy přidávají najednou do každého cyklu reakce. Během sekvenování poté dochází k emisi fotonů, kdy se pomocí detektoru zaznamenávají vlnové délky, které odpovídají danému typu nukleotidu. Součástí systému tohoto sekvenování je digitální fotografické zařízení, které zaznamenává fluorescenční signály uvolněné během emise. Po záznamu fluorescence dochází k uvolnění hydroxylové skupiny, odštěpí se fluorofor z daného nukleotidu, následuje jeho odmytí a řetězec se prodlouží o takový nukleotid, který odpovídá vlnové délce emitovaných fotonů.

Technologická zařízení firmy Illumina obsahují software, který analyzuje data z daného sekvenování. Software dosahuje přesnosti čtení až 99,9 %, což je umožněno přítomností většího množství kamer v systému. V HiSeq sekvenátoru lze v současnosti získat za méně než hodinu záznam sekvence DNA o velikosti lidského genomu (Beránek, 2016).



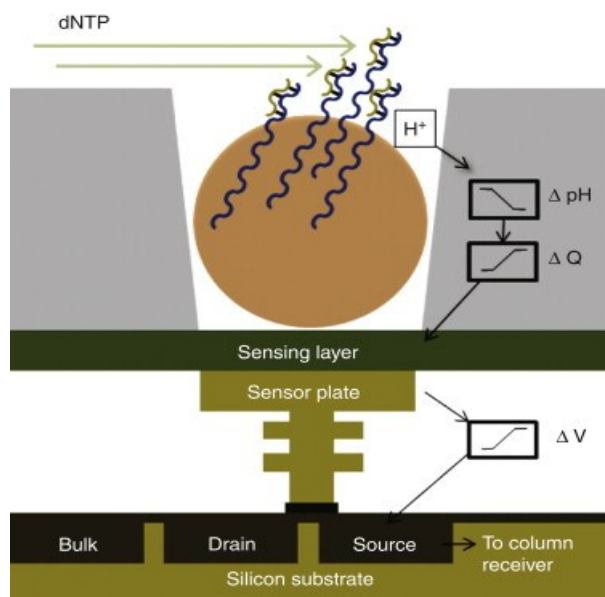
Obrázek 7 – Sekvenování firmy Illumina: Nejprve dochází k fragmentaci DNA, k jejich koncům se připojí adaptory. Následně se fragmenty s adaptory naváží na povrch průtokové cely – dojde k přemostění (bridge PCR). Výsledkem bridge PCR jsou clustery, které budou sloužit jako templáty pro reakci, během sekvenování je každý nukleotid značený fluoroforem. Uvolňují se emitované fotony a pomocí detektoru se zaznamenávají fluorescenční signály charakteristické pro daný nukleotid (GenScript).

2.1.3 Technologie Ion Torrent

Ion Torrent je technologie založená na sekvenování s využitím polovodičů neboli ion semikonduktorů. Jedná se o sekvenování DNA, jejíž hlavním principem je detekce vodíkových iontů, které se uvolňují během elongace nového řetězce DNA vlivem inkorporace (začleňování) nových nukleotidů (Goswami, 2022).

Této metodě také předchází emulzní PCR jako u technologie 454 (Beránek, 2016), liší se ale naopak tím, že nevyužívá žádných skenerů, kamer ani detekce světla (Gupta, 2014). V současnosti pro tuto metodu existují celkem čtyři zařízení: Ion Proton, Ion S5, Ion S5 XL systém a Ion Personal Genome Machine (PGM).

PGM sekvenátor využívá polovodičových čipů, na jejichž povrchu jsou mikrojamky. Každá mikrojamka obsahuje jednořetězcový templát DNA (produkt emulzní PCR), dno jamek je pokryto ion-senzitivní vrstvou a pod mikrojamkami je přítomen iontový senzor, který zaznamenává uvolněné ionty s následnou změnou pH (Goswami, 2022). Jednotlivé pulsy vznikající při uvolnění vodíkových iontů se měří velmi citlivým milivoltmetrem, který zaznamenává změny o 0,02 jednotek pH. Pulsy jsou poté vyhodnoceny počítačem (Beránek, 2016). Pokud při syntéze nového DNA řetězce dojde k začlenění dvou stejných nukleotidů, detektor vyhodnotí signál jako dvojnásobný. Naopak když nukleotid není komplementární, signál je nulový. V současnosti je pokročilejší sekvenátor Ion Proton, který využívá čipy s větší kapacitou umožňující sekvenaci i celého genomu. Metoda je jednoduchá, rychlá, levná a má uplatnění např. ve výzkumech dědičných onemocnění, infekčních onemocnění, onkologie či typizace lidského leukocytárního antigenu (HLA) (Gupta, 2014; Koubková, 2014; Thermo Fisher).



Obrázek 8 – Technologie Ion Torrent: Principem je detekce změny pH, při které dochází po začlenění nukleotidu DNA polymerázou. Na obrázku je znázorněna mikrojamka čipu, která obsahuje nově syntetizující řetězec DNA, na dně mikrojamky je ion-senzitivní vrstva a prostřednictvím iontového senzoru se zaznamenávají uvolněné vodíkové ionty. Dané napětí se měří citlivým voltmetrem. Data jsou poté vyhodnocena počítačem (Chang et al., 2015).

2.2 Sekvenování třetí a vyšší generace

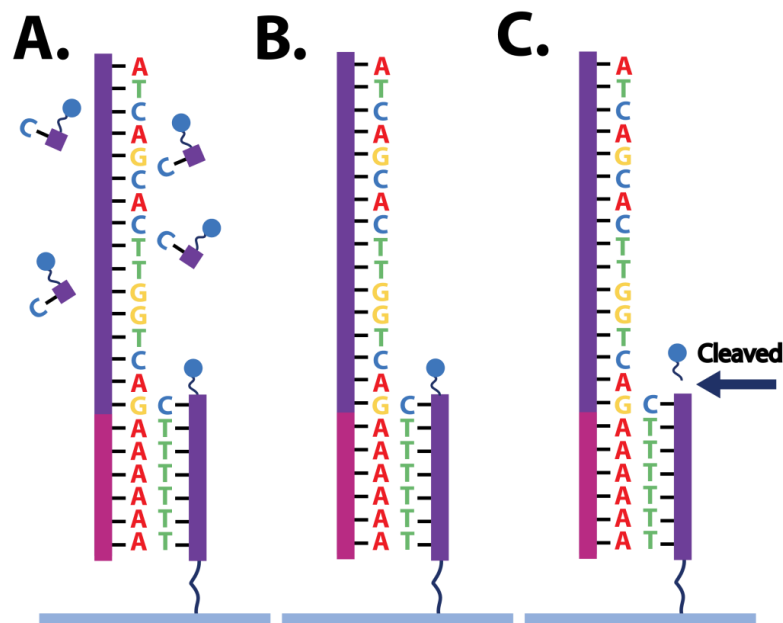
Sekvenování třetí, popř. vyšší generace je momentálně nejmodernější metoda ke zjištění pořadí nukleotidů v DNA. Od sekvenování druhé generace se primárně liší tím, že zde není potřeba před samotným sekvenováním provést amplifikaci DNA. Dochází tedy rovnou k sekvenování původní molekuly DNA neboli *single molecule sequencing* (SMS).

2.2.1 True Single Molecule Sequencing (tSMS)

Jedná se o první SMS technologii vyvinutou společností Helicos BioSciences. Funguje na stejném principu jako technologie Illumina s rozdílem, že zde není zapotřebí krok klonální amplifikace pomocí bridge PCR (Heather et al., 2015).

Při této metodě nejprve dochází k denaturaci genomové DNA a k její fragmentaci na velikost okolo 100-200 párů bází. Ke 3' koncům DNA fragmentů se připojí polyadenylační adaptory, které obsahují fluorescenční nukleotid. Proces probíhá na povrchu průtokové cely, kde jsou přítomny oligo-dT50 primery, které jsou komplementární k polyadenylačním koncům DNA fragmentů (Thompson, 2011). U připravené DNA knihovny, což jsou již zmíněné DNA fragmenty se značenými polyA konci, dojde k hybridizaci na povrch průtokové cely a následně se detekují fluorescenčně značené polyadenylační adaptory, díky tomu zjistíme lokaci každého DNA fragmentu. Fluorescenční nukleotidy adaptorů jsou poté odmyty a může dojít k sekvenaci (Nguyen, 2021). Prvním krokem je přidání DNA polymerázy a deoxynukleotidů do každého kanálu průtokové cely.

Nejprve dochází k prodloužení zmíněného primeru na základě komplementarity s DNA fragmentem, o tuto úlohu se postará právě jeden ze čtyř nukleotidů – deoxythymidintrifosfát (dTTP), který je komplementární k polyadenylačním koncům fragmentu (Beránek, 2016). Zbývající deoxynukleotidy ve směsi jsou tzv. reverzibilně terminační nukleotidy, jsou nezbytné pro reakci, protože umožňují DNA polymeráze přidat pouze jeden nukleotid čili po začlenění jednoho nukleotidu se polymerace zastaví. Po inkorporaci jednoho nukleotidu dochází k detekci fluorescenčního signálu v daném místě cely. Jelikož jsou všechny terminační nukleotidy značené stejným fluoroforem, před začleněním dalšího nukleotidu musí být fluorofor odstraněn. Nespotřebované nukleotidy se vždy ze směsi odmyjí a cyklus sekvenování se následně opakuje, dokud není celý DNA fragment plně sekvenován. Výsledná data jsou analyzována počítačovým softwarem, pomocí kterého se poté vyhodnotí sekvence původní molekuly DNA. Ačkoliv se tato metoda obejde bez amplifikačního kroku, její nevýhodou je poměrně vysoká cena a je pomalejší než ostatní metody, které ji proto později nahradily (Nguyen, 2021; Beránek, 2016).



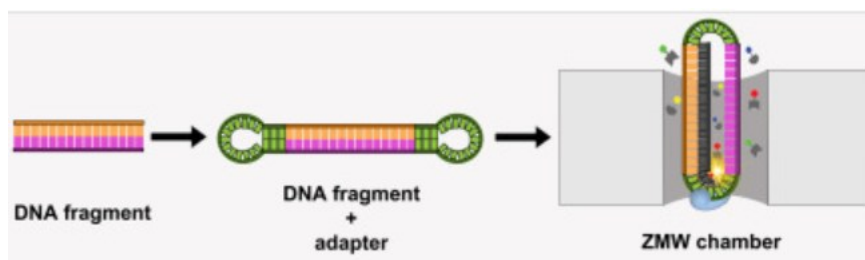
Obrázek 9 – Proces tSMS na povrchu průtokové cely: obrázek A znázorňuje přidání vždy jednoho ze čtyř reverzibilně terminačních nukleotidů s fluorescenční značkou a jeho připojení k prodlužujícímu řetězci. Obrázek B – dochází k odmytí nenavázaných nukleotidů a k detekci fluorescenčního značení pomocí laseru, aby se určilo, u kterých DNA fragmentů došlo k začlenění nukleotidu k prodlužujícímu řetězci. obrázek C – před přidáním dalšího nukleotidu musí dojít k odstranění fluorescenční značky, následně se proces opakuje s přidáním dalšího nukleotidu, data jsou poté analyzována počítačovým softwarem, který vyhodnotí sekvenci původní molekuly DNA (Nguyen, 2021).

2.2.2 Single Molecule Real Time Sequencing (SMRT)

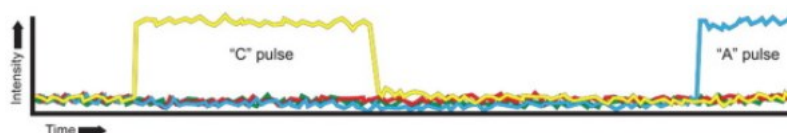
Jedná se o další metodu sekvenování třetí generace, která umožňuje detekci inkorporace nukleotidů během procesu elongace v reálném čase, a to bez použití klonální amplifikace DNA. V současnosti se tato metoda zařazuje pod firmu Pacific BioSciences, vyznačuje se vysokou citlivostí (DNA Technologies Core, 2022; Kolísko, 2017) a umožňuje identifikaci DNA molekul o velikosti více než 50 kilobází (kb).

U ostatních NGS metod docházelo k inkorporaci nukleotidů prostřednictvím DNA polymerázy, která se pohybovala podél DNA templátu. U této metody je rozdíl v tom, že DNA polymeráza je uzavřena (ukotvena) v jamce křemenného čipu, tzv. SMRTcell a tím je zajištěna její imobilizace (Athanasopoulou et al., 2022). Křemenný čip obsahuje miliony jamek, které se označují jako zero-mode waveguide (ZMW) a poskytují nejmenší možný objem pro detekci světla (Rhoads et al., 2015). ZMW mají průměr jen desítky nanometrů a jsou tedy navrženy tak, aby nepropouštěly denní světlo ale pouze úzký laserový paprsek (Beránek, 2016). Kromě DNA polymerázy je nedílnou součástí směsi v jamce templát DNA neboli tzv. SMRTbell. Struktura SMRTbell vznikla připojením adaptorů k oběma koncům dvouřetězcové DNA, tím vznikla uzavřená kruhová jednořetězcová vlákna na obou koncích templátu. Na jednořetězcové vlákno poté nasedá DNA polymeráza ukotvená v jamce čipu a může začít replikace.

Do mikrojamek se následně přidávají fluorescenčně značené nukleotidy, každý nukleotid je značený odlišným fluoroforem a pomocí laseru dochází k emisi světla vlivem začlenění komplementárních nukleotidů do prodlužujícího řetězce DNA (Rhoads et al., 2015; Athanasopoulou et al., 2022). Rozhodujícím faktorem je zde délka záznamu fluorescence – inkorporace nukleotidu trvá řádově milisekundy, naopak pokud k inkorporaci nedojde, protože nukleotid není komplementární a pouze difunduje v jamce, záznam fluorescence trvá jen několik mikrosekund. Právě z tohoto důvodu probíhá hodnocení v reálném čase (Beránek, 2016).



Obrázek 10 – Sekvenování SMRT: připojením adaptorů k oběma koncům DNA fragmentu vzniká kruhová struktura tzv. SMRTbell. Na posledním obrázku je SMRTbell znázorněna v jamce čipu, na jejíž dně je ukotvena DNA polymeráza a s primery přítomnými v adaptorech může začít sekvenování. Při začlenění fluorescenčně značeného nukleotidu DNA polymerázou dochází k produkci světelného pulsu (Pavlovic et al., 2020).

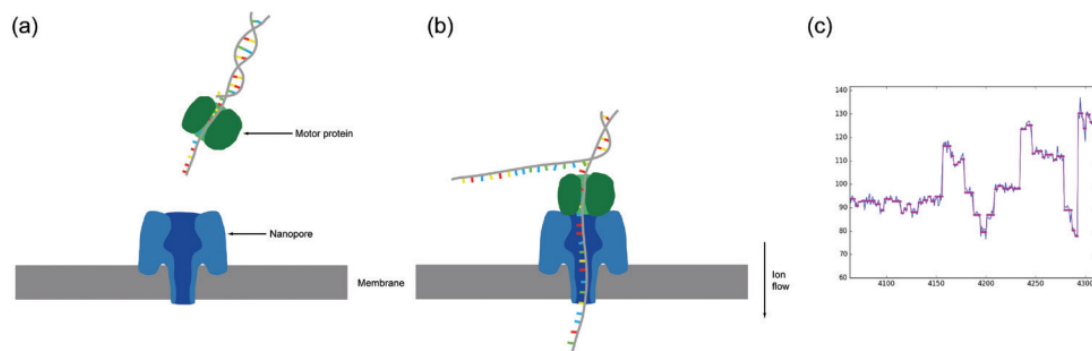


Obrázek 11 – Sekvenování SMRT: na obrázku je znázorněn záznam fluorescence ze sekvenování SMRT, graf popisuje závislost intenzity světelných pulsů v čase, kdy C a A pulsy značí nukleotidy začleněné do prodlužujícího řetězce DNA (Rhoads et al., 2015).

2.2.3 Technologie nanopórů

Tato metoda byla uvedena společností Oxford Nanopore Technologies a vyznačuje se svojí schopností čtení velmi dlouhých sekvencí obsahujících až desítky tisíc bází. Stejně jako předešlé metody třetí generace ani tato nevyžaduje amplifikaci DNA čili sekvenování probíhá z jediné molekuly DNA (Bharagava et al., 2019; Kolísko, 2017).

Základem této techniky je membrána ponořená v elektrolytu, která obsahuje nanopóry (Vilgis et al., 2018). Nanopóry jsou otvory o velikosti okolo 1 nm a mohou být buď syntetické na bázi silikonu či biologické, které jsou tvořené z transmembránových proteinů, např. z alfa-hemolyzinu (Beránek, 2016). Současně používaný sekvenátor pro tuto metodu je MinION, který obsahuje 512 kanálů, v každém kanálu jsou 4 nanopóry. Nezbytným krokem je rozštěpení dvouvláknové DNA na jednovláknovou pomocí motorového proteinu s helikázovou aktivitou. Jednovláknová DNA následně prochází danými póry (Wang, 2021). Každý nukleotid se při průchodu póry vyznačuje specifickou změnou elektrického proudu, a tak poté poznáme o jaký nukleotid se jedná (Gupta, 2014). Výhodami této techniky je její rychlost, cenová dostupnost a již zmíněná schopnost čtení dlouhých sekvencí, což je výhodné při sekvenování celého genomu DNA, avšak stále se u ní vyskytuje poměrně vysoká frekvence chyb (Kolísko, 2017).



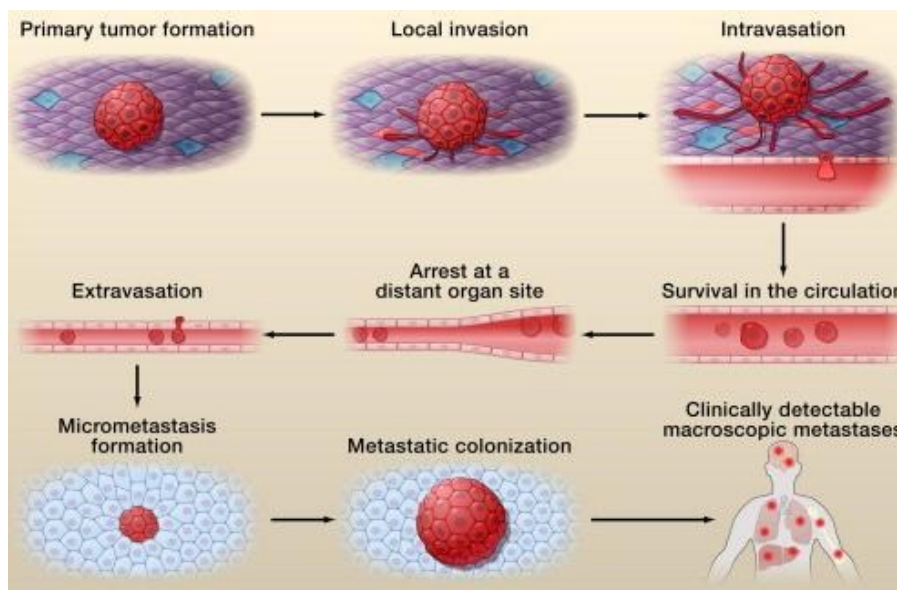
Obrázek 12 – Technologie nanopórů: Obr. (a) – znázornění syntetické membrány obsahující nanopóry a dvouvláknové DNA, kolem které je navázán motorový protein, obr. (b) – díky motorovému proteinu dochází k separaci dvouvláknové DNA, vlákno následně prochází nanopórem v membráně, obr. (c) – záznam měření elektrického proudu, jehož změna je specifická pro každý nukleotid (M.Leggett et al., 2017).

3 Rakovina

3.1 Definice rakoviny

Rakovina je onemocnění, které může postihnout každou část lidského těla a vyznačuje se nekontrolovatelným růstem a dělením buněk – to následně může vést ke vzniku nádorů. Nádory můžeme rozdělit na benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné neboli rakovina), právě maligní nádory jsou velmi invazivní, nádorové buňky se mohou rozšiřovat do okolních tkání, kde se následně vytváří další nádorová ložiska – tento proces se nazývá metastáze. Metastáze má několik fází, nejprve dochází k invazi nádorových buněk do krevních či lymfatických cév (tzv. intravazace), právě díky tomu jsou poté buňky transportovány i do vzdálenějších tkání. Následně buňky prostřednictvím tzv. extravazace uniknou z cévní cirkulace k cílovému orgánu, kde se dokážou adaptovat na dané prostředí a začnou proliferovat. Nádorové buňky se od normálních buněk liší v mnoha ohledech, např. ignorují signály vedoucí k apoptóze – můžeme je považovat za nesmrtelné, protože mají schopnost aktivovat a regulovat tzv. TERT gen, který je nezbytný pro vznik enzymu telomeráza. Telomeráza je zodpovědná za prodlužování koncových částí chromozomů – telomer, nádorové buňky se tak vyhnou procesu senescence (stárnutí). U většiny normálních buněk je aktivita telomerázy velmi nízká, a tak se telomery s každým dalším dělením zkracují, až se buňky přestávají dělit či dojde k apoptóze (Jafri et al, 2016; National Library of Medicine, 2020; Cancer Council Australia, 2014).

Nádorové buňky se také umí skrýt před imunitním systémem hostitele tak, že na ně nezaútočí – některé dokonce dokážou přimět imunitní systém, aby jim pomáhal růst. Tyto buňky se také vyznačují různými genetickými změnami chromozomů (National Cancer Institute, 2021). Z hlediska epidemiologie se jedná o jednu z nejčastějších příčin úmrtí. V roce 2018 bylo zaznamenáno 9,6 miliónů úmrtí právě na rakovinu. Mezi nejvíce zasažené orgány a tkáně patří prsa, plíce, prostata, žaludek, střevo a konečník (WHO, 2022).



Obrázek 13 – Proces metastáze: nejprve dochází ke vzniku tumoru, jeho lokální invazi a následně intravazaci, při které se rakovinné buňky dostávají do lumina lymfatických či krevních cév. Jakmile se rakovinné buňky dostanou do cirkulace mohou se přemístit do vzdálenějších orgánů, do kterých vstoupí prostřednictvím extravasace. Po vstupu do orgánu se buňky musí adaptovat na dané prostředí, dochází nejprve ke vzniku tzv. mikrometastáz, poté k postupné kolonizaci, a nakonec ke vzniku makroskopických metastáz, které jsou klinicky detekovatelné (Valastyan a Weinberg, 2011).

3.2 Etiologie rakoviny – mutace

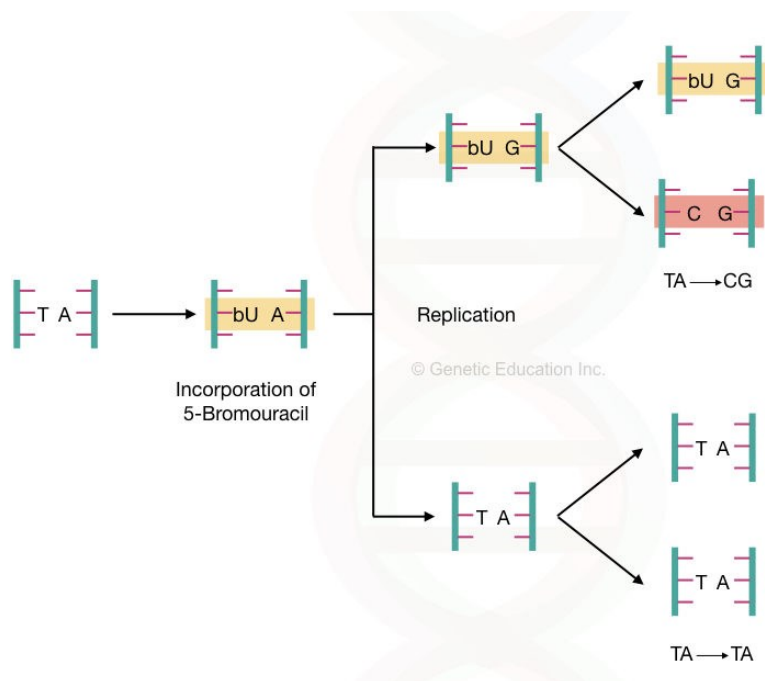
Existuje řada rizikových faktorů, které mohou způsobit vznik rakovinného bujení. Poměrně důležitým faktorem, který může ovlivnit lidské zdraví, je životní styl – ať už se jedná o stravu s vysokým podílem tuků, kouření či požívání alkoholu, riziko vzniku také roste s věkem. Obecně látky, které mohou být příčinou vzniku rakoviny, se nazývají karcinogeny – rozdělují se na fyzikální, chemické a biologické. Karcinogeny mohou poškozovat DNA, což následně vede ke vzniku mutací, které mohou být různého charakteru (National Library of Medicine, 2000; Stanford Medicine, 2022; MedicineNet, 2021).

Chemické mutageny jsou skupina látek, které se mohou vyskytovat buď běžně v přírodě, nebo jsou synteticky vytvořené. Tyto látky mohou pozměnit strukturu DNA a tím způsobují vznik mutací. Můžeme je rozdělit na analogy bází, hydroxylační, deaminační, alkylační látky či na látky s interkalačním účinkem. Genetické změny v molekule DNA mohou být vyvolány různými mechanismy právě na základě daného chemického mutagenu. Analogy bází jsou sloučeniny, které se svojí strukturou podobají konkrétním nukleotidům v DNA řetězci, a tak je následně mohou během replikace DNA nahradit.

Příkladem může být 5-bromouracil – jedná se o bromovaný derivát uracilu, který vykazuje analogii k thyminu (keto forma 5-bromouracilu) či cytosinu (enol forma 5-bromouracilu). Dochází tedy k substituci thyminu či cytosinu za 5-bromouracil, výsledkem je inkorporace špatného nukleotidu, což následně může vést ke vzniku již zmíněné mutace.

Dalším příkladem je 2-aminopurin, který naopak může v řetězci DNA nahradit adenin (amino forma) či guanin (imino forma).

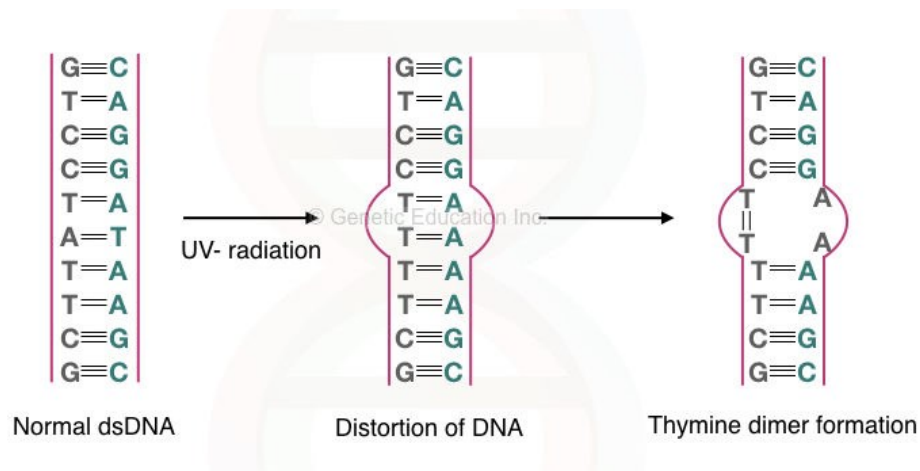
Další skupina chemických mutagenů pozměňuje strukturu samotných bází prostřednictvím chemických reakcí jako je např. oxidativní deaminace, kde dochází k odštěpení funkční aminoskupiny z báze. Vlivem tohoto procesu pak může např. z adeninu vzniknout hypoxantin, který je komplementární k cytosinu (místo k thyminu). U hydroxylačných chemických mutagenů dochází k navázání OH^- skupiny k cytosinu, vzniklý hydroxycytosin netvoří pár s guaninem, ale s adeninem. Poslední skupinou jsou mutageny s interkalačním účinkem, které mají schopnost tzv. vmezeření (interkalace) mezi DNA báze, čímž tedy opět dochází k změně struktury řetězce DNA, jsou to např. akridinové barvy, ethidium bromid či proflavin (Biology Reader, Supriya N; Cancer Council Australia, 2014).



Obrázek 14 – Příklad chemického mutagenu: keto forma 5-bromouracilu vykazuje analogii k thyminu – dochází tedy k jeho inkorporaci místo thyminu a ke vzniku vazby s adeninem, během replikace se vlivem tautomerního přesmyku mění keto forma 5-bromouracilu na enol formu, která vykazuje analogii k cytosinu a váže se tak s guaninem, který je následně komplementární k cytosinu. Takto dochází ke konverzi původního páru nukleotidů adeninu a thyminu za cytosin a guanin (Chauhan, 2019).

Záření, ať už se jedná o ultrafialové (UV), rentgenové či radioaktivní, patří mezi fyzikální karcinogeny. Za zmínění stojí UV záření, které se na první pohled může zdát neškodné, ale při nadměrné expozici může opět vyvolat mutace v DNA řetězci, kde vznikají pyrimidinové dimery. Principem je vytváření kovalentních vazeb nejčastěji mezi sousedními thyminy.

Thyminové dimery jsou potencionálním faktorem, který může způsobit rakovinu kůže. Toto poškození vzniká poměrně často, avšak až 90 % těchto dimerů je opraveno v časovém rozmezí několika minut (Pinak, 2006; Kodym et al., 2003).



Obrázek 15 – Působení UV záření na DNA: UV záření narušuje strukturu DNA, kdy následně mohou vznikat dimery – obrázek napravo ukazuje vznik konkrétně thyminových dimerů, kdy dochází k tvorbě kovalentních vazeb mezi sousedními thyminy. Dimery poté blokuji replikaci a translaci a pokud nejsou opraveny mohou způsobit vážné zdravotní problémy (Chauhan, 2019).

DNA i RNA viry jsou biologickým rizikovým faktorem vzniku rakoviny. Viry mohou u hostitele způsobovat perzistentní infekce a různými mechanismy následně narušují funkce buněk hostitele, dochází např. k expresi proteinů, které neutralizují tumor supresorové proteiny hostitele nebo mohou zpozdít, popř. zablokovat proces apoptózy. Proces karcinogeneze způsobené viry je poměrně složitý a vyžaduje i okolní faktory, aby došlo k její aktivaci. Mezi onkogenní DNA viry patří např. lidský papilloma virus, který může být původcem karcinomu genitálií či virus Epstein-Barrové způsobující Burkittův lymfom či nasofaryngeální karcinom. Zástupci RNA virů způsobující rakovinu jsou např. retroviry, jako je lidský T-lymfotropní virus, který může vyvolat T-buněčnou leukemii (Cancer Council Australia, 2014; Genetika – Biologie).

3.3 Nádorové geny, miRNA

Nádorové geny můžeme rozdělit do dvou skupin – onkogeny a tumor supresorové geny. Součástí každé DNA jsou protoonkogeny, které jsou nezbytné pro růst, dělení buněk a regulaci apoptózy. Právě mutací protoonkogenů vznikají onkogeny, které následně mohou vést ke vzniku rakoviny. Příčinou mutací protoonkogenů mohou být různé genetické změny v DNA, jako jsou bodové mutace, které se projevují změnou jednoho nukleotidu v DNA molekule – těmito změnami mohou být delece (vymazání), inserce (vlození) či substituce (náhrada) nukleotidu. Dalším mechanismem, který může způsobit konverzi protoonkogenu na onkogen, je genová amplifikace, vlivem které vzniká velké množství kopií genu a výsledkem je poté nadměrná produkce růstových faktorů, buňka je „zaplavena“ replikačními signály a zvyšuje se aktivita transkripčních faktorů.

RAS onkogen patří mezi nejvíce mutované onkogeny, kóduje protein Ras vázající guanosinotriposfát (GTP), který ovlivňuje proliferaci buňky. Mutací tohoto proteinu dochází k jeho permanentní aktivaci, která způsobí stálou stimulaci buňky (Cancer Council Australia, 2014; Eldridge, 2022; P. Liu, 2022; Vedantu, 2022).

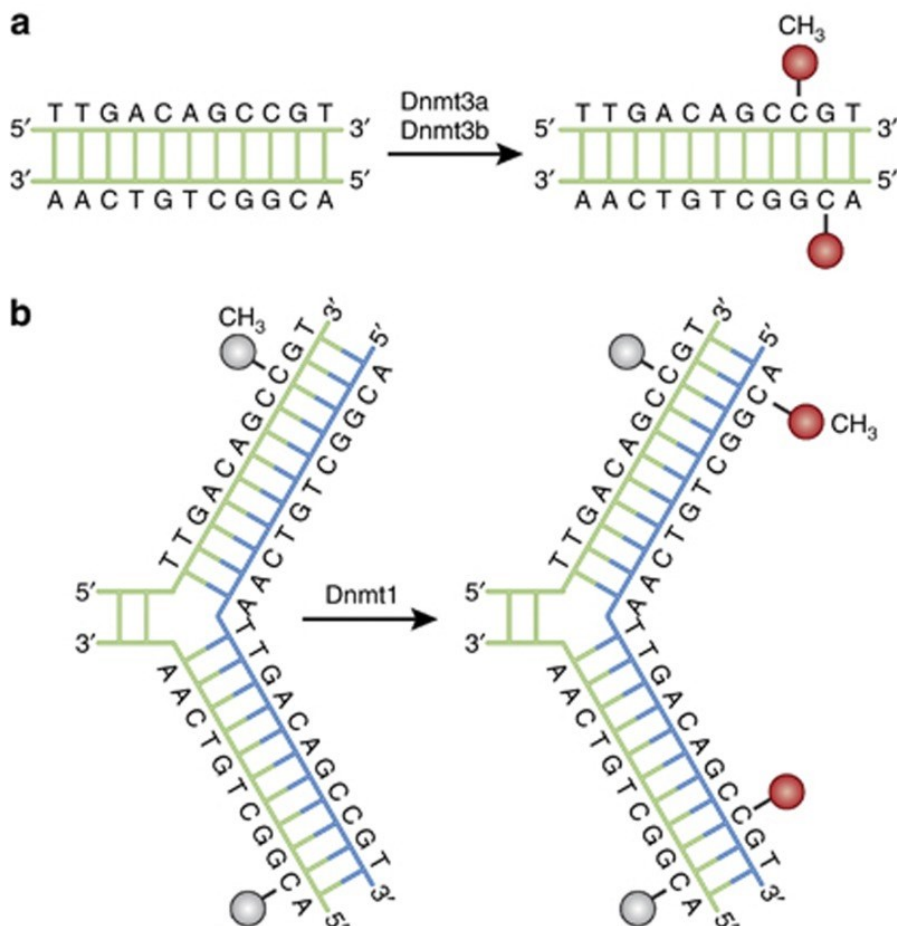
Tumor supresorové geny se fyziologicky podílí na inhibici buněčné proliferace, při poškození DNA zastavují buněčný cyklus, navozují reparační procesy či apoptózu. Vlivem mutací těchto genů dochází ke ztrátě jejich funkce, často musí být mutované obě kopie genu, aby došlo k rozvoji rakoviny.

Mezi důležité tumor supresorové geny patří TP53 gen (tumor protein), který se označuje jako „strážce genomu“, jeho produktem je protein p53, který reguluje buněčný cyklus, dělení a proliferaci buněk a v případě poškození DNA rozhoduje, zda bude DNA opravena či dojde k navození apoptózy. Při poškození DNA dochází k indukci proteinu p53, který aktivuje transkripci proteinu p21 – ten je právě zodpovědný za zastavení buněčného cyklu (MedlinePlus, 2020). Mutací tohoto genu se zvyšuje nestabilita genomu buňky, což poté může vést ke vzniku rakoviny. Důsledkem dědičné mutace TP53 genu je syndrom Li-Fraumeni, který se projevuje právě zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění, jako je např. rakovina prsu (Cooper, 2000; Cancer Council Australia, 2014; MedlinePlus, 2021).

MicroRNA (miRNA) jsou molekuly skládající se pouze z 20-22 nukleotidů a opět jsou součástí regulace buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy. Při narušení exprese miRNA se může objevit řada onemocnění včetně rakoviny, při které byla zaznamenána snížená exprese miRNA. Na abnormální expresi těchto molekul se podílí různé mechanismy. Jedním z nich jsou epigenetické změny v expresi miRNA, jako je tzv. epigenetic silencing, kdy dochází k modifikaci exprese genu, a to následně může vést k jeho inaktivaci.

Mezi příčiny těchto změn patří DNA methylace, která spočívá v navázání methylové skupiny k příslušnému nukleotidu, nejčastěji k cytosinu. Přenos methylové skupiny zajišťují enzymy DNA methyltransferázy. Příkladem může být kolorektální karcinom, který vykazoval inaktivaci genu miR-34b a miR-34c vlivem hypermethylace CpG ostrovů, což jsou části DNA, kde se vyskytuje větší množství po sobě jdoucích nukleotidů cytosinu a guaninu (Reddy, 2015; Filipowicz et al., 2013; TutorialScan, 2022; Moore, 2013).

Dalším faktorem, který může ovlivňovat expresi miRNA je tzv. single nucleotide polymorphism (SNP), jedná se o běžnou genetickou variaci vyskytující se v jednom nukleotidu, kdy může být v určité oblasti DNA vlákna nahrazen např. cytosin za thymin (MedlinePlus, 2022). SNP poté může ovlivňovat regulaci exprese a funkci miRNA, dochází např. ke zvýšení exprese miRNA, což způsobí, že se miRNA bude chovat jako onkogen (Reddy, 2015).

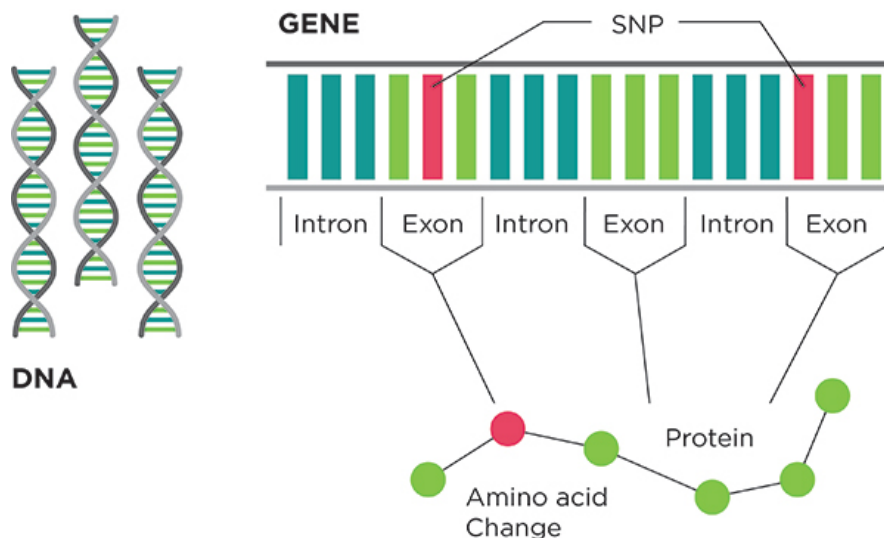


Obrázek 16 – Methylace DNA: a) DNA methyltransferázy (*Dnmt3a*, *Dnmt3b*) zprostředkovávají přenos methylových skupin (CH_3) na cytosin, b) *Dnmt1* je zodpovědná za udržování methylových skupin během replikace DNA, při které dochází k navázání dalších CH_3 skupin v dceřinném vlákne DNA (Moore et al., 2013).

4 Celogenomové sekvenování v diagnostice rakoviny

4.1 Metody WGS, WES a Targeted gene panels

Whole genome sequencing (WGS) a whole exome sequencing (WES) jsou metody, které se velmi rozšířily v oblasti genetiky v diagnostice lidského genomu. Obě metody se opírají o principy sekvenování nové generace, které značně urychlují proces sekvenace lidského genomu, který trvá pouze v řádu dnů, popř. týdnů a není tak cenově nákladný. WES je technologie založená na sekvenování a identifikaci genů v protein kódující oblasti genomu zvané exom. Exom je oblast DNA složená z exonů, které jsou poté součástí konečné mRNA a obsahují informace pro tvorbu proteinů. Exony se považují za části DNA, které mohou tvořit až jedno procento lidského genomu a často se v nich objevují mutace, které mohou být právě prostřednictvím WES identifikovány. Nicméně genetické mutace mohou vznikat i mimo oblasti exonů, proto se poté uplatňuje WGS, které může stanovit pořadí bází v celém genomu, a ne pouze v exomu. Každopádně toto téma je stále objektem studie, protože existují genetické změny a variace v DNA, které nám jsou neznámé. (Dewey et al., 2014; MedlinePlus, 2021; National Human Genome Research Institute, 2022). Targeted gene sequencing panels je další metoda sekvenování nové generace, která slouží k analýze specifických mutací v daném vzorku. Součástí této metody jsou panely, které obsahují vybrané geny či oblasti genů, které mohou mít spojitost s daným onemocněním. Tyto panely mohou být buď koupeny již s vybranou skupinou genů, či vytvořeny se specifickou oblastí genů, kterou chceme zkoumat (Illumina, 2022).



Obrázek 17 – Whole exome sequencing (WES): sekvenování DNA v protein kódující oblasti v tzv. exonech – proteinové struktury jsou vyznačeny zeleně a změny v DNA (SNP) červeně (YU et al., 2018).

4.2 Využití metod v diagnostice rakoviny

4.2.1 Targeted gene sequencing

Tato metoda je velmi často používaná při diagnostice solidních či hematologických nádorů. Solidní nádory vytvářejí v těle pevná ložiska, která tvoří nádorové buňky. U hematologických nádorů naopak ložiska nevznikají – nádorové buňky kolují v krvi či infiltrují kostní dřeň, lymfatické uzliny, popř. další tkáně (Linkos, 2022; Jennings et al., 2021). Panely v této metodě mohou být navrženy např. k detekci delecí, inzercí, bodových mutací či genové fúze – kde se jedná o stav, při kterém se geny spojují do sebe za vzniku jednoho genu (Tripathi et al., 2019; Jennings et al., 2021).

Před samotným sekvenováním genomu je nezbytná příprava vzorku a knihovny. Příprava knihovny je proces, během kterého dochází ke vzniku DNA fragmentů o požadované velikosti. V onkologii se využívají dva postupy přípravy knihovny – tzv. hybrid capture a postup založený na amplifikaci. Hybrid capture je metoda, která využívá speciálních sond, které představují sekvence oligonukleotidů s navázaným biotinem. Tyto sekvence jsou komplementární k specifické oblasti genomu, kterou chceme zkoumat. SONDY hybridizují k cíleným oblastem a následně dochází k jejich izolaci prostřednictvím magnetických korálek s navázaným streptavidinem, který tvoří komplex s biotinem. Poté následuje promytí, amplifikace daných oblastí a následně může proběhnout sekvenování. Jedná se o komplexní metodu, která je vhodná pro větší obsah genů (50 a víc), nicméně trvá delší dobu (Illumina, 2022). Druhý postup je založený na PCR amplifikaci požadované oblasti s využitím primerů. Primery jsou navrženy tak, aby docházelo k překrytí více ampliconů stejné oblasti, což zabrání výpadku alely. K výpadku alely může dojít, pokud u jedné nebo obou alel genu nedojde k amplifikaci (Jennings et al., 2021; Integrated DNA Technologies, 2022; Blais et al., 2015). Tato metoda zahrnuje menší oblast genů (50 a méně) a využívá se hlavně k analýze delecí, inzercí a SNP (Illumina, 2022).

Po přípravě knihovny už může dojít k samotnému sekvenování. Používanými metodami jsou např. technologie Illumina a Ion semiconductor, které poskytují srovnatelné výsledky především v detekci nádorových vzorků využívajících přípravu knihovny metodou amplifikace. Po sekvenování následuje analýza dat prostřednictvím softwaru. Nejprve se využívá program FastQC, který se zaměřuje na kvalitu kontroly sekvencí a podává přehled o tom, které oblasti vykazují nižší kvalitu a zda je potřeba tyto oblasti „vystříhnout“, tento proces se také nazývá base-calling. Dalším krokem je tzv. alignment neboli porovnání.

Sekvence jsou porovnány s tzv. referenčním genomem, který si můžeme představit jako uměle vytvořenou „normální“ genetickou sekvenci, která vzniká sestavením DNA několika jedinců. Pro každý vzorek se následně vygeneruje mapa nejčastěji pomocí softwaru Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Tyto mapy se nazývají sequence alignment map (SAM), popř. binary alignment map (BAM) a jedná se o nástroje, které ukládají nukleotidové sekvence porovnané s referenčním genomem. (Zheng, 2019; Genomic Education Programme, 2019; Jennings et al., 2021; Bewicke-Copley et al., 2019; Kamps et al., 2017). Během tohoto procesu se mohou objevovat sekvence, které nejsou předmětem našeho zkoumání, proto po porovnání s referenčním genomem dochází k procentuálnímu hodnocení cílových oblastí pomocí softwaru bedtools nebo GATK (Genome Analysis Toolkit). Pokud bude poměr nežádoucích oblastí vysoký, znamená to, že proces se nezdařil nebo cílové oblasti obsahují velké množství opakujících sekvencí (Bewicke-Copley et al., 2019; McKenna et al., 2010).

4.2.2 Whole genome sequencing (WGS)

WGS je metoda, která se nezaměřuje jen na určitou oblast genomu jako WES či Targeted gene sequencing, ale slouží k analýze celého genomu. Díky tomu jsme schopni indentifikovat dědičná onemocnění či mutace, které se podílí na vzniku rakoviny. Tato metoda je většinou spojována s lidským organismem, avšak je možné sekvenovat i genom zvířat či rostlin. Podle velikosti genomu můžeme WGS rozdělit na malé (small) nebo velké (large) sekvenování. Small WGS zahrnuje sekvenování genomů, které obsahují pět nebo méně mega bází (Mb), jako např. genom bakterie nebo viru. Large WGS je sekvenování zaměřující se na genomy, které mají tedy více jak 5 Mb – jedná se o člověka, rostliny či zvířata (Illumina, 2022). Hlavní výhodou této metody je, že zde příprava knihovny nevyžaduje žádnou amplifikaci či obohacení (enrichment), takže specifita dosahuje teoreticky 100 % – v praxi 95 až 98 % (Kamps et al., 2017).

Analýza dat získaná z WGS opět podléhá několikastupňovému procesu, jehož součástí je už zmíněné porovnání s referenčním genomem neboli alignment, po kterém následuje tzv. variant calling (Supernat et al., 2018). Mapování na referenční genom můžeme zařadit do procesu sestavení genomu, tzv. genome assembly, kam patří ještě druhý typ tzv. *de novo* assembly – jedná se o sestavení nového genomu bez využití referenčních dat. K tomuto sestavení se využívají právě sekvenační metody jako jsou Illumina, Ion Torrent či PacBio SMRT.

De novo assembly se využívá např. k vyhledávání neznámých genů, nicméně tato metoda je poměrně pomalá a vyžaduje velmi kvalitní data, proto se více používá porovnání s referenčním genomem (CD Genomics). Variant calling je proces, díky kterému jsme schopni identifikovat mutace či obecně jakékoliv změny v genomu, jako jsou inserce, delece či SNP (Khalfan). Rakovina může být způsobena mutacemi v tzv. zárodečném genomu (germline) – tyto mutace se objevují v zárodečných buňkách či v gametách a ovlivňují tak následně všechny buňky v těle a mohou být dědičné. Vedle zárodečných mutací se objevují mutace somatické, které jsou více běžné a nejsou dědičné. Somatické mutace se objevují v jednotlivých somatických (tělních) buňkách a nemají tedy dopad na všechny buňky v těle, protože jsou přítomny pouze v buňkách tumoru pacienta. Během analýzy tedy dochází u pacienta k odběru vzorku krve, u kterého je předmětem analýzy zárodečný genom a k odběru vzorku z nádorového ložiska, kde se jedná o somatický genom (Berner et al., 2019; Samanthi, 2018). Na základě těchto dvou rozdílných vzorků rozlišujeme právě již zmíněný proces variant calling (Supernat et al., 2018). V tomto procesu se využívá speciálních softwarů, do kterých můžeme zařadit již zmíněný GATK či např. SOAPsnp, který detekuje SNP varianty, popř. ALTAS 2 – ten může být použit i pro další NGS metody.

Dalším klíčovým krokem je anotace genomu, kdy dochází k identifikaci funkční a strukturální informace daného genu. Anotace genomu může sloužit i k predikci určitých genů či proteinů. Příkladem může být podobnost mezi dvěma geny, z nichž jeden je neznámý a podobný genu, u kterého známe jeho vlastnosti, funkci a strukturu – poté můžeme tyto informace přiřadit k neznámému genu (Harbola et al., 2022). K anotaci genomu můžeme využít nástroje SnpEff, ANNOVAR či Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) (Liu et al., 2015).

Při sekvenování genomu rozlišujeme dva pojmy – hloubku a šíři pokrytí (čtení). Hloubku pokrytí můžeme definovat jako počet čtení dané oblasti genomu, u WGS to můžeme vyjádřit například jako 30x, což znamená, že genom byl sekvenován třicetkrát. Šíře pokrytí je vyjádřena jako procento bází genomu, které byly sekvenované při dané hloubce (Sims et al., 2014; Brunstein, 2014; Sequencing.com).

4.2.3 Diagnostika miRNA

MicroRNA jsou malé molekuly, které se podílejí na inhibici translace proteinů a také podporují štěpení mRNA, čímž napomáhají k potlačení genové exprese. Tyto molekuly hrají tedy důležitou roli v mezibuněčné komunikaci. MiRNA, které vstupují do tělesných tekutin, se nazývají cirkulující miRNA a mohou buď tvořit komplexy s proteiny, nebo jsou součástí exozomů, což jsou váčky, které fúzí s plazmatickou membránou. V exozomech či v komplexech s proteiny jsou miRNA chráněny před působením RNáz v tělesných tekutinách. Exozom obsahující miRNA poté může proniknout i do sousedních buněk a vzdáleně ovlivnit mRNA v původní buňce.

MiRNA mají spoustu vlastností, díky kterým mohou být v klinické praxi využity jako biomarkery. Vyznačují se např. vysokou stabilitou v biologických tekutinách – je možné je snadno extrahovat z krve či z dalších tekutých biopsií. Tekuté biopsie jsou výhodnější, dostupnější a více komplexní metodou pro monitorování nádorů, popř. odpovědi na léčbu. Další předností miRNA je jejich specifita pro určité tkáně, což poté může zlepšit stanovení progresu daného onemocnění. MiRNA se také vyznačují citlivostí – jejich hladina se mění na základě progresu onemocnění, popř. odpovědi na terapii. S těmito vlastnostmi umožňují tyto molekuly neinvazivní metodu pro diagnózu onemocnění a následné monitorování léčby.

Zjistilo se, že určité sady molekul miRNA mohou včas identifikovat rakovinu a také vzdálené metastázy – příkladem může být zvýšená hladina miR-192 a snížená hladina miR-122 v plazmě pacientů s rakovinou žaludku či zvýšené plazmatické hladiny miR-21 u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Některé studie se také zabývaly analýzou kolorektálního karcinomu – ukázalo se, že 69 molekul miRNA v séru pacientů s tímto karcinomem nebylo přítomno u zdravých jedinců, a kromě toho také došlo k identifikaci 14 sérových miRNA, které nebyly přítomny u pacientů s rakovinou plic, což poukazuje na již zmíněnou specifitu těchto molekul. Předmětem studie byla také souvislost mezi miRNA a genem BRCA 1 – miRNA se podílí na regulaci tohoto genu, v negativním případě může docházet ke ztrátě funkce či mutaci v genu BRCA 1 a následnému riziku vzniku rakoviny prsu. U monitorování chemoterapie lze uvést opět např. zvýšené hladiny miR-21, které indikovaly rezistenci na docetaxel u pacientů s rakovinou prostaty.

Rozlišujeme tři typy molekul miRNA – primární, prekurzorové a zralé. Detekce u prvních dvou typů probíhá podobně jako u mRNA, u zralé miRNA je detekce složitější vzhledem k její malé velikosti, avšak díky novým metodám a technologiím se již stala jednodušší.

K detekci a kvantifikaci miRNA se využívají metody molekulární biologie, jako jsou Northern blot, digitální PCR, miRNA microarray a v neposlední řadě i sekvenování nové generace. Všechny zmíněné metody mají své klady i zápory. NGS technologie mohou poskytnout informace o expresi miRNA, vyžadují malé množství materiálu a dokážou identifikovat i nové molekuly miRNA, další výhodou je také jejich finanční dostupnost. Avšak nevýhodou detekce pomocí NGS je složitá příprava knihovny, což může způsobit následné zkreslení sekvenování, kvůli tomu je právě nutné před samotným sekvenováním dodržet krok PCR amplifikace v minimálních cyklech, aby se zkreslení zabránilo. Mezi metody, které se uplatnily při sekvenování miRNA patří např. technologie 454, kde jsou produkty PCR navázány na povrchu specifických kuliček (viz kapitola 2.1.1), popř. sekvenování firmy Illumina (viz kapitola 2.1.2). Proces analýzy miRNA u NGS metod je poměrně složitý a může v něm docházet k chybám, proto by měly být výsledky sekvenování ověřeny dalšími metodami jako je např. kvantitativní PCR s reverzní transkripcí (qRT-PCR) (Kim et al., 2013; Phuong T.B. Ho et al., 2022; Kubaczková et al., 2017; Chang et al., 2012).

4.2.4 Shrnutí a porovnání metod

WGS

Největší výhodou WGS je již zmíněná analýza celého genomu i včetně nekódujících oblastí. Právě díky možnosti analýzy zárodečného genomu spolu se somatickým (nádorovým) tato metoda poskytuje komplexní pohled na mutace v diagnostice nádorů. Nevýhodou je časová náročnost a finanční nákladnost. Data zpracovaná WGS metodou se také vyznačují poměrně vysokými nároky na jejich interpretaci.

WES

Celoexomové sekvenování umožňuje identifikovat geny pouze v protein kódující oblasti genomu. Neposkytuje tedy analýzu celého genomu, nicméně až 85 % mutací je přítomno v exomu. Interpretace dat z WES je jednodušší v porovnání s WGS metodou a také umožňuje větší hloubku čtení z důvodu nižšího pokrytí genomu.

Targeted gene panels sequencing

Tato metoda je jediná, která umožňuje sekvenaci vybraných genů prostřednictvím speciálních panelů. Analýza konkrétních genů přináší snadnější interpretaci dat než u WES metody, čímž se zvyšuje i senzitivita a hloubka čtení. Příznivá je i cenová dostupnost sekvenačních panelů, jejich optimalizace a následná standardizace.

Tuto metodu lze využít u nádorových vzorků s malým počtem nádorových buněk. Avšak nevýhodou těchto panelů je, že mutace v daných vybraných genech nemusí být přítomny, a proto pro jejich větší záchyt jsou metody WES a WGS více využívány (Slabý, 2018).

U všech tří sekvenačních metod můžeme určit tzv. tumorovou mutační zátěž (TMB), jedná se o počet somatických mutací na jednu mega bázi (Mb) DNA. V případě metody se sekvenačními panely je zapotřebí, aby panel obsahoval 200 a více genů. TMB může hrát klíčovou roli v odpovědi imunitního systému při rakovinném bujení. Imunitní systém identifikuje rakovinné buňky, což vyvolá imunitní odpověď právě na základě detekce mutací. Se vzrůstající hodnotou TMB roste i množství mutací, což zvyšuje šanci k aktivaci imunitního systému. Toto tvrzení může být následně využito v imunoterapii – vyšší počet mutací v nádoru může znamenat i vyšší pravděpodobnost odpovědi na léčbu. Je to z toho důvodu, že imunitní systém dokáže lépe rozeznat rakovinné buňky a následně na ně zaútočit. (Slabý, 2018; Dan Sha et al., 2020; J. Fusco et al., 2021).



Obrázek 18 – Rozdíl sekvenování u metod Targeted gene panels, WES a WGS: Panel = konkrétní SNP, WES = jen exony, WGS = celý genom (Yoon Jung Shin, 2022).

5 Analýza konkrétních genů

První pokus o analýzu celého genomu pro následnou klinickou aplikaci proběhl v roce 2010. V této analýze došlo k sekvenaci adenokarcinomu jazyka a k identifikaci genomové amplifikace a expresi RET onkogenu, který byl považován za potencionálního původce vzniku karcinomu. RET protoonkogen kóduje tyrosinkinázový receptor, v kterém může docházet k přeskupení či mutacím, což následně způsobí aktivaci zmíněného RET onkogenu. Právě toto zjištění vedlo k léčbě pacientů s adenokarcinomem s využitím kinázových inhibitorů zaměřených na RET protein (Zhao et al., 2019; Takahashi et al., 2020; L.Y. Tse et al., 2009).

Další geny, které se analyzují WGS metodou, jsou BRCA 1 a BRCA 2 – mutace v těchto genech představují až 85% riziko rakoviny vaječníků a prsou. Během klinické analýzy těchto genů se zkoumalo, zda je WGS metoda schopna zachytit a potvrdit mutace, které byly diagnostikovány. U 75 pacientů s mutací BRCA 1 bylo identifikováno přes 89 % mutací, podobné výsledky (okolo 88 %) byly detekovány i u pacientů s mutací BRCA 2. Zbývající mutace, které nebyly započítány do celkového množství byly zachyceny také, ale s nižší kvalitou dat. Pro porovnání byli analyzováni i jedinci bez mutací BRCA 1 a 2. U těchto pacientů se ukázalo, že ačkoliv neměli prokázané mutace v genech BRCA 1 a 2, tak byly WGS metodou identifikovány i jiné mutace – např. v genu PALB2, který je také rizikový pro vznik rakoviny prsu či v genu RAD51C a FH. Toto poukazuje na účinnost WGS, kdy je možné detekovat současně vyskytující se mutace genů, které představují rizika vzniku rakoviny (Zhao et al., 2019; Foley et al., 2015).

Nizozemská nadace Hartwig Medical Foundation založila zařízení se specializací na WGS metodu, které analyzovalo od roku 2016 již více jak 5000 nádorových vzorků. Původně mělo toto zařízení sloužit k analýze biomarkerů, nicméně s rostoucími požadavky na analýzu DNA se WGS metoda postupně dostává do rutinního vyšetření. U pacientů v pokročilém stádiu rakoviny se odebírají většinou malé biopsie pomocí jádrové jehly, která se vyznačuje vysokou senzitivitou. Přestože WGS vyžaduje k analýze pouze malé množství vzorku, daný nádor by měl obsahovat více jak 20 % nádorových buněk, aby mohly být identifikovány mutace. Právě v nizozemském zařízení proběhla studie vzorků pacientů s rakovinou. DNA byla extrahována ze zmrazené nádorové tkáně a z krevních vzorků, následně byla fragmentována na velikost 450 párů bází a poté došlo k PCR amplifikaci.

Vzorky musely mít dostatečné množství nádorových buněk, proto muselo dojít k manuálnímu hodnocení vzorků obarvených hematoxylinem a eozinem a následně k určení jejich procentuálního zastoupení. Toto hodnocení bylo prováděno patologi a bylo srovnáno se stanovením čistoty nádoru metodou tzv. mělkého sekvenování, které má svůj název podle hloubky pokrytí – 8x až 15x. Na základě srovnání mohly být identifikovány nádory, jejichž výsledky neodpovídaly manuálnímu hodnocení s metodou mělkého sekvenování. Pouze vzorky s více jak 20 % nádorových buněk byly považovány za vhodné pro diagnostiku. Experimenty se zaměřovaly na různé typy mutací, jako např. inserce a delece (neboli indel mutace), amplifikaci genů či úplnou ztrátu genů. Výsledky, které poskytla WGS metoda, byly následně srovnány s diagnostickými testy z patologických laboratoří (Roepman et al., 2021; Zbären, 2021; Sehn, 2015).

Ověření počtu kopií genů z WGS probíhalo pomocí fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) – jedná se o metodu, která je schopna zachytit a detekovat DNA sekvence prostřednictvím fluorescenčně značeného DNA fragmentu, který se připojí k dané sekvenci na základě komplementarity a poté takto označenou oblast můžeme pozorovat v mikroskopu (Dutra, 2023). Takto byl analyzován gen ERBB2, jedná se o protoonkogen s charakterem tyrosinkinázového receptoru, který reguluje např. růst buňky. Při jeho zvýšené produkci může následně dojít k proliferaci nádorových buněk (Dean et al., 2021). K porovnání WGS dat FISH metodou bylo použito 16 nádorových vzorků, které byly následně analyzovány mikroskopem a softwarem, který zachycoval amplifikace genu prostřednictvím signálů. Jeden vzorek neobsahoval dostatečný počet nádorových buněk, tudíž jeho výsledek z analýzy FISH nebyl použitelný. Vzorky, které měly počet kopií z WGS metody vyšší jak 6x, byly potvrzeny i metodou FISH. Naopak výsledky některých vzorků s nižším počtem kopií byly považovány za nejednoznačné.

Úplná ztráta genů byla porovnána pomocí CDKN2A genu, který kóduje protein p16 – jedná se o tumor supresorový protein, který brání nekontrolovatelnému dělení buněk. Stanovení exprese p16 se provádělo imunohistochemicky u 39 vzorků s využitím monoklonální protilátky. U 22 vzorků byla exprese proteinu p16 negativní, tyto výsledky se shodovaly s daty poskytnutými WGS metodou.

Analýza genů ERBB2 a CDKN2A WGS metodou proběhla s využitím sekvenátorů firmy Illumina (Roepman et al., 2021; MedlinePlus, 2018).

6 Závěr

Cílem této práce bylo popsat využití metod celogenomového sekvenování, především sekvenování nové generace (NGS) v diagnostice rakoviny. Rakovina je velmi komplikované onemocnění, jehož příčinou mohou být mutace v různých genech, které vedou k následné změně struktury DNA, potažmo změně proteinů nebo jejich exprese. Právě kvůli komplikovanosti diagnostiky rakoviny se v dnešní době uplatňují metody sekvenování DNA, které spočívají ve stanovení pořadí nukleotidů v DNA molekule.

NGS metody mají spoustu kladných vlastností vhodných k analýze DNA a k následné diagnostice rakoviny, vyznačují se svojí přesností, rychlostí a ve většině případů jsou plně automatizované a cenově dostupné. Především ale dokáží analyzovat dlouhé úseky DNA a podat komplexní informaci o poškození nukleové kyseliny. Mezi současně nejmodernější metody patří sekvenování třetí a vyšší generace, které na rozdíl od ostatních nevyžadují před samotným sekvenováním amplifikaci DNA, což umožňuje přímou sekvenaci původní molekuly DNA. Právě o principy NGS metod se opírá celogenomové, celoexomové sekvenování a sekvenování s použitím panelů obsahujících specifické geny – tyto metody se v poslední době výrazně rozšířily v oblasti genetiky. Největší předností celogenomového sekvenování (WGS) je analýza celého genomu, jak již vyplývá z názvu a díky tomu nám tato metoda poskytuje komplexní pohled na mutace v diagnostice rakoviny v praxi s přesností až 98 %, avšak zvyšuje se tím náročnost zpracování analyzovaných dat. Celoexomové sekvenování umožňuje větší hloubku čtení v porovnání s WGS, nicméně zachytí případné mutace pouze v protein kódujících oblastech. Obdobně je na tom i metoda využívající panely s geny – vybrané geny nemusí obsahovat hledané mutace, poté tedy nedojde k jejich identifikaci. Nicméně genové panely jsou vybrané na základě zkušenosti jako významné rakovinné markery.

Každá z výše zmíněných metod má tedy i své zápory, ale i přes ně jsou tyto metody při diagnostice rakoviny vysoce používané a efektivní. Díky nim můžeme analyzovat konkrétní geny a identifikovat tak případné mutace, které představují riziko vzniku rakoviny. Mimo jiné se tyto metody mohou využívat i při monitorování odpovědi na léčbu. Konkrétně účinnost WGS metody byla porovnána i s běžnými rutinními metodami prováděnými v laboratořích, např. výsledky stanovení úplné ztráty genů imunohistochemicky s využitím monoklonální protilátky se přesně shodovaly s daty WGS. Proto si myslím, že se jedná v dnešní době o pokrokové a účinné metody, které mohou být velmi užitečné při diagnostice rakoviny, na což právě poukazuje i tato práce.

Seznam odborné literatury

1. AGAH, Ali, Mariam AGHAJAN, Foad MASHAYEKHI et al. A multi-enzyme model for pyrosequencing. *Nucleic Acids Research* [online]. Oxford University Press, 2004, December 2, **32**(21), 1-15 [cit. 2023-05-26]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gnh159>
2. ATHANASOPOULOU, Konstantina, Michaela A. BOTI, Panagiotis G. ADAMOPOULOS et al. Third-Generation Sequencing: The Spearhead towards the Radical Transformation of Modern Genomics. *Life* [online]. 2021, 26 December, **12**(1) [cit. 2023-05-26]. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/life12010030>
3. BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
4. BERNER, Alison May, George J. MORRISSEY a Nirupa MURUGAESU. Clinical Analysis of Whole Genome Sequencing in Cancer Patients. *Current Genetic Medicine Reports* [online]. 2019, 14 June, **7**, 136–143 [cit. 2023-05-26]. ISSN 2167-4876. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1007/s40142-019-00169-4>
5. BEWICKE-COPLEY, Findlay, Emil Arjun KUMAR, Giuseppe PALLADINO et al. Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. Elsevier, 2019, **17**, 1348-1359 [cit. 2023-02-28]. ISSN 2001-0370. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.10.004>
6. BHARAGAVA, Ram N., Diane PURCHASE, Gaurav SAXENA et al. Chapter 26 - Applications of Metagenomics in Microbial Bioremediation of Pollutants: From Genomics to Environmental Cleanup. *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Academic Press, 2019, 459-477. ISSN 9780128148495. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00026-5>
7. BLAIS, Jonatan, Sébastien B. LAVOIE a Sylvie GIROUX et al. Risk of Misdiagnosis Due to Allele Dropout and False-Positive PCR Artifacts in Molecular Diagnostics: Analysis of 30,769 Genotypes. *The Journal of Molecular Diagnostics* [online]. Elsevier, 2015, **17**(5), 505-514 [cit. 2023-02-28]. ISSN 1525-1578. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.004>.
8. COOPER, GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. ISBN 0-87893-106-6. The Development and Causes of Cancer. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
9. DEAN, Laura a Megan KANE. Trastuzumab Therapy and ERBB2 Genotype. *Medical Genetics Summaries* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2015, Aug 5 [cit. 2023-05-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310376/>
10. FILIPOWICZ, W. a J. PASZKOWSKI. Gene Silencing. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Academic Press, 2013, 221-222. ISSN 9780080961569. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00603-3>.

11. FOLEY, Samantha B., Jonathan J. RIOS a Victoria E. MGBEMENA. Use of Whole Genome Sequencing for Diagnosis and Discovery in the Cancer Genetics Clinic. *EBioMedicine*. 2015, **2**(1), 74-81. ISSN 2352-3964. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2014.12.003>
12. FUSCO, Michael J., Howard WEST a Christine M. WALKO. Tumor Mutation Burden and Cancer Treatment. *JAMA Oncology* [online]. 2020, December 17, **7**(2) [cit. 2023-05-26]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.6371>
13. GOMES-PEREIRA, Mário a Darren G. MONCKTON. Ethidium Bromide Modifies The Agarose Electrophoretic Mobility of CAG•CTG Alternative DNA Structures Generated by PCR. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. 2017, **11** [cit. 2022-11-07]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00153>
14. GOSWAMI, Kavita a Neeti SANAN-MISHRA. RNA-seq for revealing the function of the transcriptome. *Bioinformatics, Methods and Applications* [online]. 22.10. 2021, **Chapter 7**, 105-129 [cit. 2022-11-07]. ISBN 9780323897754. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00002-X>
15. GUPTA, Anuj Kumar a U.D. GUPTA. Chapter 19 - Next Generation Sequencing and Its Applications. *Animal Biotechnology*. Academic Press, 2014, 345-367. ISSN 9780124160026. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00019-5>
16. HARBOLA, Aditya a Deepti NEGI. Chapter 27 - Bioinformatics and biological data mining. *Bioinformatics Methods and Applications: Methods and Applications*. Academic Press, 2022, 457-471. ISSN 9780323897754. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00019-5>
17. HEATHER, James M. a Benjamin CHAIN. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. Elsevier, 2016, **107**(1), 1-8. ISSN 0888-7543. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
18. HO, Phuong T.B., Ian M. CLARK a Linh T.T. LE. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, 28 June, **23**(13), 1-18 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23137167>
19. CHANG, Suhwan a Shyam K. SHARAN. BRCA1 and MicroRNAs: Emerging networks and potential therapeutic targets. *Molecules and Cells* [online]. 2012, 24 July, **34**(1), 425-432 [cit. 2023-05-26]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1007/s10059-012-0118-y>
20. CHANG, Fengqi a Geoffrey L. LIU. *Somatic Diseases (Cancer): Amplification-Based Next-Generation Sequencing* [online]. Academic Press, 2015, 297-319 [cit. 2023-05-03]. ISBN 9780124047488. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404748-8.00018-6>
21. JAFRI, Mohammad A., Shakeel A. ANSARI, Mohammed H. ALQAHTANI a Jerry W. SHAY. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine* [online]. 2016, 20 June, **8**(69), 1-18 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1756-994X. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0324-x>

22. JAGADEESWARAN, Pudur a Rajinder K. KAUL. Use of reverse-phase chromatography in the Maxam-Gilbert method of DNA sequencing A step toward automation. *Gene Analysis Technique* [online]. 1986, **3**(5), 79-85 [cit. 2022-11-07]. ISSN 0735-0651. Dostupné z: doi: [https://doi.org/10.1016/0735-0651\(86\)90007-5](https://doi.org/10.1016/0735-0651(86)90007-5)
23. JAIN, Miten, Hugh E. OLSEN, Benedict PATEN a Mark AKESON. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology* [online]. 2016, 25 November, **17**, 1-11 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
24. JENNINGS, Lawrence J., Maria E. Arcila ARCILA, Christopher CORLESS et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels. *The Journal of Molecular Diagnostics* [online]. 2017, March 21, **19**(3), 341-365 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1525-1578. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.01.011>
25. KAMPS, Rick, Rita D. BRANDÃO, Bianca J. van den BOSCH et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, 31 January, **18**(2) [cit. 2023-05-26]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/ijms18020308>
26. KCHOUK, Mehdi, Jean Francois GIBRAT a Mourad ELLOUMI. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine* [online]. 2017, **09**(03) [cit. 2022-11-07]. ISSN 09748369. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000395>
27. KIM, Taiho a Armin REITMAIR. Non-Coding RNAs: Functional Aspects and Diagnostic Utility in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, 1 March, **14**(3), 4934-4968 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/ijms14034934>
28. KODYM, Andrea a Rownak AFZA. Physical and Chemical Mutagenesis. *Plant Functional Genomics* [online]. 2003, **236**, 189-204 [cit. 2023-05-26]. ISSN 978-1-59259-413-9. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1385/1-59259-413-1:189>
29. KOLÍSKO, Martin. Moderní metody sekvenování DNA. *Živa* [online]. Academia, 2017, (3), 73-76 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/2017-3/moderni-metody-sekvenovani-dna.html>
30. KOUBKOVÁ, Lucie, Bořivoj VOJTĚŠEK a Rostislav VYZULA. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klinická onkologie* [online]. Care Comm, 1.4. 2014, **27**(1), 61-68 [cit. 2022-11-07]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.14735/amko20141S61>
31. KUBACZKOVÁ, Veronika, Lenka SEDLAŘÍKOVÁ, Božena BOLLOVÁ et al. Liquid Biopsies – the Clinics and the Molecules: Tekuté biopsie – klinika a molekuly. *Klinická Onkologie* [online]. Care Comm, 2017, 22.6., **30**(S2), 2S13-2S20 [cit. 2023-04-15]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.14735/amko20172S13>
32. LEGGETT, Richard M. a Matthew D. CLARK. Nanopore Sequencing. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2017, 23 August, **68**(20), 5421 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erx289>

33. LIU, Xiaoming, Simon WHITE a Bo PENG. WGS: an annotation pipeline for human genome sequencing studies. *Journal of Medical Genetics* [online]. 2016, **53**(2), 111-112 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1468-6244. Dostupné z: doi: <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103423>
34. MARDIS, Elaine R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. 2008, 22 September, **9**(1), 387-402 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1527-8204. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>
35. MOORE, Lisa D., Thuc LE a Guoping FAN. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* [online]. 2013, 11 July, **38**, 23-38 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1740-634X. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
36. PAVLOVIC, Sonja a Kristel KLAASSEN. Next-Generation Sequencing: The Enabler and the Way Ahead. *Microbiomics* [online]. Academic Press, 2020 [cit. 2023-05-03]. ISBN 9780128166642. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816664-2.00009-8>
37. CHEN, Yi-Ping Phoebe, Elena P. IVANOVA a Feng WANG. 9.15 - Bioinformatics. *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier, 2010, **9**, 569-593. ISSN 9780080453828. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00729-2>
38. PINAK, Miroslav. Enzymatic recognition of radiation-produced oxidative DNA lesion: Molecular dynamics approach. *Modern Methods for Theoretical Physical Chemistry of Biopolymers*. Elsevier Science, 2006, 191-210. ISSN 9780444522207. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-044452220-7/50074-5>
39. RAHMAN, M.T., M.S. UDDIN a Razia SULTANA. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal* [online]. 6.2. 2013, **4**(1), 30-36 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>
40. REDDY, Kaladhar B. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*. Springer Nature, 2015, 1-6. ISSN 1475-2867. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0185-1>
41. RHOADS, Anthony a Kin FAI AU. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. Elsevier, 2015, **13**(5), 278-289. ISSN 1672-0229. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>
42. ROEPMAN, Paul a Ewart DE BRUIJN. Clinical Validation of Whole Genome Sequencing for Cancer Diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics* [online]. Elsevier, 2021, July, **23**(7), 816-833 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1525-1578. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.04.011>
43. SEHN, Jennifer K. Chapter 9 - Insertions and Deletions (Indels). *Clinical Genomics* [online]. Academic Press, 2015, 129-150 [cit. 2023-03-31]. ISSN ISBN 9780124047488. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404748-8.00009-5>
44. SHA, Dan, Zhaohui JIN, Jan BUDCZIES et al. Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker in Solid Tumors. *Cancer Discovery* [online]. 2020, **10**(12), 1808–1825 [cit. 2023-05-26]. ISSN 2159-8290. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0522>

45. SIMS, David, Ian SUDBERY a Nicholas E. ILOTT. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2014, **15**, 121–132 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1471-0064. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1038/nrg3642>
46. SLABÝ, Ondřej. Technologie sekvenování nové generace: celogenomové, celoexomové a cílené – hotspot – sekvenování. In: *ProLékaře.cz* [online]. Brno, 2018, 24. 9. [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: https://www.prolekare.cz/tema/precizni-medicina/detail/technologie-sekvenovani-nove-generace-celogenomove-celoexomove-a-cilene-hotspot-sekvenovani-105628?fbclid=IwAR3iENUG6ayfmu_sf6R4vL7Z2r3BFBnsle1nSzzZGYOBDIrfYlrd8311m-Y
47. SRŠEŇ, Štefan a Klára SRŠŇOVÁ. *Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata*. Tretie, prepracované a rozšírené vydanie. Martin: Osveta, [2000]. ISBN 80-8063-021-6.
48. SUPERNAT, Anna, Oskar Valdimar VIDARSSON, Vidar M. STEEN et al. Comparison of three variant callers for human whole genome sequencing. *Scientific Reports* [online]. 2018, 14 December, **8**, 1-6 [cit. 2023-05-26]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36177-7>
49. TAKAHASHI, Masahide, Kumi KAWAI a Naoya ASAI. Roles of the RET Proto-oncogene in Cancer and Development. *JMA Journal* [online]. 2020, July 15, **3**(3), 175-181 [cit. 2023-05-26]. ISSN 2433-3298. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.31662/jmaj.2020-0021>
50. THOMPSON, John F. a Kathleen E. STEINMANN. Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. 2010, 01 October, 1-16 [cit. 2023-05-26]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0710s92>
51. THOMPSON, John F. a Patrice M. MILOS. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biology* [online]. 2011, 24 February, **12**, 1-10 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-2-217>
52. TSE, Loretta L.Y. a John K.C. CHAN. CHAPTER 44 - Thyroid and Parathyroid. *Modern Surgical Pathology*. Elsevier, 2009, **2**, 1597-1685. ISSN 9781416039662. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3966-2.00044-8>
53. VALASTYAN, Scott a Robert A. WEINBERG. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* [online]. 2011, October 14, **147**(2) [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
54. VILGIS, Stephan a Hans-Peter DEIGNER. Chapter 5 - Sequencing in Precision Medicine. *Precision Medicine*. Academic Press, 2018, 79-101. ISSN 9780128053645. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805364-5.00005-6>
55. VRBA, Milan. *Genetika pro zdravotní laboranty: Pro PSS SZP*. 2. přeprac. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1994. Učební text (Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví). ISBN 80-7013-184-5.

56. WANG, Yunhao, Yue ZHAO, Audrey BOLLAS et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology* [online]. 2021, 08 November, **39**, 1348–1365 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1546-1696. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>
57. ZBÄREN, Peter. 4 - Fine Needle Aspiration Cytology, Core Needle Biopsy, and Frozen Section. *Surgery of the Salivary Glands* [online]. Elsevier, 2021, 33-36 [cit. 2023-03-31]. ISBN 9780323672368. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-67236-8.00004-3>
58. ZHAO, Eric Y., Martin JONES a Steven J.M. JONES. Whole-Genome Sequencing in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2019, March 1, **9**(3), 1-13 [cit. 2023-05-26]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034579>
59. ZHENG, Yun. Chapter 1 - Introduction to Non-coding RNAs and High Throughput Sequencing. *Computational Non-coding RNA Biology* [online]. Academic Press, 2019, 3-31 [cit. 2023-02-28]. ISSN 9780128143650. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814365-0.00010-5>.

Seznam internetových zdrojů

1. An Overview of Genome Assembly. In: *CD Genomics: The Genomics Services Company* [online]. [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://www.cd-genomics.com/an-overview-of-genome-assembly.html>
2. BÁRTOVÁ, Eva. PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie* [online]. 2011 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod_pcr&lang=cz&fbclid=IwAR2f_Py2w4It6OSJ1cZezGoXkHE9bHWsUtjT34NO4Ovdm5c3RqH890i1V-4
3. Basics of NGS Workflow. *GenScript* [online]. [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://www.genscript.com/advancing-genomics-medicine-and-health-together-by-semiconductor-dna-synthesis-technology-summary.html>
4. BRUNSTEIN, John. In-depth coverage: some useful NGS terms. In: *MLO: Medical Laboratory Observer* [online]. 2014, Nov. 20 [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://www.mlo-online.com/home/article/13007639/indepth-coverage-some-useful-ngs-terms>
5. Cancer biology: Molecular and genetic basis. *Cancer Council Australia: Clinical oncology for students* [online]. Sydney, 2014, 23 September [cit. 2022-12-06]. Dostupné z: https://wiki.cancer.org.au/oncologyformedicalstudents/Cancer_biology:_Molecular_and_genetic_basis
6. Cancer. *World Health Organization* [online]. 2022 [cit. 2022-12-06]. Dostupné z: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
7. CDKN2A gene: cyclin dependent kinase inhibitor 2A. *MedlinePlus: Trusted Health Information for You* [online]. Bethesda: National Library of Medicine, 2018, August 1 [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/cdkn2a/>
8. Co je to PCR? *Roche Diagnostics* [online]. Praha: Roche s.r.o., Diagnostics Division, 2021 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: https://diagnostics.roche.com/cz/cs/article-listing/what-is-pcr.html?fbclid=IwAR0eBkPGUlpK3N9aS-AR2lng1cvGjkCPZ2liSWH0MdiskLa9qtpoT2Vf_qS8
9. CpG Island overview: CpG Islands and The Regulation of Transcription. *TutorialScan.com* [online]. 2022 [cit. 2022-12-06]. Dostupné z: <https://www.tutorialscan.com/science/cpg-island-overview/#:~:text=A%20CpG%20island%20is%20a%20stretch%20of%20DNA,BP%20long%20with%20at%20least%2050%25%20GC%20content>
10. CUNHA, John P. Cancer Risk Factors and Causes. *MedicineNet* [online]. 2021, 5/17 [cit. 2022-12-06]. Dostupné z: https://www.medicinenet.com/cancer_causes/article.htm
11. Difference Between Germline Mutation and Somatic Mutation. *DifferenceBetween.com* [online]. 2018, September 28 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://www.differencebetween.com/difference-between-germline-mutation-and-somatic-mutation/>

12. DNA Stains. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2022-11-19].
Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains.html?gclid=EAIaIQobChMIqpX3hbmU-wIVC-J3Ch2sEAXJEAAYASAAEgJy5_D_BwE&ef_id=EAIaIQobChMIqpX3hbmU-wIVC-J3Ch2sEAXJEAAYASAAEgJy5_D_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!572074520637!p!!g!!sybr&cid=bid_mol_pch_r01_co_cp1358_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con
13. DUTRA, Amalia. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *National Human Genome Research Institute* [online]. 2023, March 24 [cit. 2023-03-31].
Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Fluorescence-In-Situ-Hybridization>
14. ELDRIDGE, Lynne. What are Oncogenes and Proto-Oncogenes? *Verywellhealth* [online]. Dotdash Meredith, 2022, June 06 [cit. 2022-12-06]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/oncogenes-types-and-role-in-cancer-4178292>
15. Exon. *National Human Genome Research Institute* [online]. 2023, February 23 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Exon>
16. FastQC. *Babraham Bioinformatics* [online]. [cit. 2023-02-28].
Dostupné z: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
17. Focus on key target genes: Sequence genes of interest to high depth with predesigned or custom panels. *Illumina* [online]. [cit. 2023-02-28].
Dostupné z: <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/targeted-panels.html>
18. GOON SUET MIN, Amanda. *A Deep Dive Into the Traditional Approaches to DNA Sequencing*. *StemSide* [online]. 2021 [cit. 2023-05-03].
Dostupné z: <https://www.stemside.co.uk/post/a-deep-dive-into-the-traditional-approaches-to-dna-sequencing>
19. Hybridization Capture. *Integrated DNA Technologies* [online]. [cit. 2023-02-28].
Dostupné z: <https://eu.idtdna.com/pages/technology/next-generation-sequencing/dna-sequencing/targeted-sequencing/hybridization-capture>
20. CHAUHAN, Tushar. Graphical illustration of the effect of base analog – bromouracil on DNA: The conversion of AT base pair to the CG base pair. In: *Genetic Education* [online]. 2019, 04/11 [cit. 2023-05-03].
Dostupné z: <https://geneticeducation.co.in/mutagen-definition-types-and-effect/>
21. CHAUHAN, Tushar. Graphical illustration of the effect of UV – radiation on DNA. In: *Genetic Education* [online]. 2019, 04/11 [cit. 2023-05-03].
Dostupné z: <https://geneticeducation.co.in/mutagen-definition-types-and-effect/>
22. Chemical Mutagens. *Biology Reader* [online]. 2022 [cit. 2022-12-06].
Dostupné z: <https://biologyreader.com/chemical-mutagens.html>
23. KHALFAN, Mohammed. Variant Calling. *NGS Analysis* [online]. 2018 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://learn.gencore.bio.nyu.edu/variant-calling/>

24. LIU, Paul P. Oncogene. *National Human Genome Research Institute* [online]. 2022, May 24 [cit. 2022-12-06]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Oncogene>
25. Next-Generation Sequencing (NGS). *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing.html?cid=csd_ngs_sbu_r01_co_cp1507_pjt8438_csd00000_0se_gaw_nt_con_ngsextilmPro&ef_id=EAIAIQobChMIzLGk-aOZ-wIVKe_tCh0TKgVoEAAYBCAAEgLZSfD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!520930737250!e!!g!!illumina%20miseq%20sequencing!12742007020!121429837919
26. NGUYEN, Julie. Pyrosequencing. In: *Apollo Institute* [online]. 2021, November 22 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://apollo-institute.org/pyrosequencing/>
27. NGUYEN, Julie. True Single Molecule Sequencing. *Apollo Institute* [online]. 2021, November 24 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: <https://apollo-institute.org/true-single-molecule-sequencing/>
28. Pacbio Sequencing: Pacific Biosciences: Realtime Single Molecule Sequencing. *DNA Technologies & Expression Analysis Core Laboratory* [online]. 2022 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: <https://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu/pacbio-sequencing/>
29. *PCR Basics*. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>
30. Point Mutation. *Vedantu* [online]. 2022 [cit. 2022-12-06]. Dostupné z: <https://www.vedantu.com/biology/point-mutation>
31. Reference genome. *Genomics Education Programme* [online]. 2019, 31st May [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/glossary/reference-genome/>
32. *Sanger Sequencing Steps & Method*. *Merck* [online]. 2023 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>
33. Sequencing depth / Coverage. In: *Single cell core: An Onco Institute Facility* [online]. [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://www.singlecellcore.eu/sequencing-depth/>
34. SHIN, Yoon Jung. WES WGS Panels: Which is the best NGS approach? In: *3billion* [online]. 2022, 12.01 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://3billion.io/blog/wes-wgs-panels/>
35. STAŇKOVÁ, Hana a René KIZEK. Jak se čte genom? *Český rozhlas* [online]. 2010, 23.9. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: <https://plus.rozhlas.cz/jak-se-cte-genom-6650898>
36. ŠÍPEK, Antonín. Onkogenní viry. *Genetika – Biologie* [online]. 2014 [cit. 2022-12-06]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/onkogenni-viry>

37. TERT gene: Telomerase reverse transcriptase. *MedlinePlus* [online]. Bethesda, MD, 2020, July 1 [cit. 2022-12-06].
Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/tert/#references>
38. TP53 gene: Tumor protein p53. *MedlinePlus* [online]. National Library of Medicine, 2020, February 1 [cit. 2022-12-06].
Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/tp53/>
39. TP53 Genetic Test: What is a TP53 genetic test? *MedlinePlus* [online]. National Library of Medicine, 2021, June 24 [cit. 2022-12-06]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/lab-tests/tp53-genetic-test/>
40. What are single nucleotide polymorphisms (SNPs)? *MedlinePlus* [online]. National Library of Medicine, 2022, March 22 [cit. 2022-12-06].
Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/genomicresearch/snp/>
41. What are whole exome sequencing and whole genome sequencing? *MedlinePlus* [online]. National Library of Medicine, 2021, July 28 [cit. 2023-02-28].
Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/testing/sequencing/>
42. What Causes Cancer? *Stanford Medicine Health Care* [online]. 2022 [cit. 2022-12-06].
Dostupné z: <https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/cancer/cancer/cancer-causes.html>
43. What Is Cancer? *National Cancer Institute* [online]. 2021, May 5 [cit. 2022-12-06].
Dostupné z: https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer?fbclid=IwAR2U5LcwoflL2D_Txs6Q9QxWEaRlCpCklyItU9gF8S7lOXvRw9NsVy8Og8U
44. What is Whole Genome Sequencing? What is WGS? In: *Sequencing: Outsmart your genes* [online]. [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://sequencing.com/blog/post/what-is-whole-genome-sequencing-wgs#:~:text=You%20may%20have%20seen%20WGS%20appear%20with%20a,genome%20was%20sequenced%20to%20a%20depth%20of%2030>
45. YU, Joon-Ho a Maria DELANEY. A Doctor's dilemma. In: *Think Write Publish* [online]. 2018 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://thinkwritepublish.org/the-narratives/a-doctors-dilemma/>