



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Detekce mutací spojovaných se zvýšeným výskytem nádorů prsu a vaječníků pomocí moderních metod molekulární biologie

Vypracoval: Kristýna Rájová
Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2015

Abstrakt

Karcinom prsu a vaječníků je jedno z nejčastějších maligních onemocnění žen v České republice a incidence nových diagnóz má tendence stoupat. Odhaduje se, že v 5 – 10 % případů těchto nádorů je příčinou patogenní mutace ve vysoce penetrantních tumorsupresorových genech BRCA1 nebo BRCA2. Hlavní funkcí těchto genů jsou opravy zlomů dvouvláknové DNA, kontrola buněčného dělení a spolupodílejí se i na regulaci transkripce a remodelaci chromatinu.

Cílem této práce bylo shrnutí současných poznatků na dané téma, genové mutace, funkce genů BRCA1 a BRCA 2 a jejich souvislost s hereditárním karcinomem prsu a vaječníků, přehled možných metod detekce těchto mutací a zvláště také shrnutí českých studií o zabývajících se výskytem mutací BRCA1 a BRCA2 na území České republiky od počátku jejich testování v rámci preventivní i diagnostické péče. To poukázalo na silný efekt zakladatelských mutací. Mezi nejčastěji nalézanými mutacemi v České republice byly mutace c.5266dupC, c.181T>G a c.3700_3704del5 v genu BRCA1 a c.7913_7917del5 a c.8537_8538del2 v genu BRCA2.

V experimentální části práce jsem se pokusila optimalizovat metodu PCR ARMS pro detekci bodové mutace c.5266dupC v genu BRCA1. Tato mutace patří mezi nejčastěji se vyskytující mutace nejen v České republice, ale i v Evropě. Cílem bylo optimalizovat metodu PCR ARMS v podmínkách laboratoře GENLABS s.r.o. V rámci optimalizace šlo především o výběr vhodného PCR mixu a úpravu teplotního profilu PCR, při kterém bude kvalita i kvantita výtěžku vizualizovaná pomocí gelové elektroforézy dostatečná pro prokázání přítomnosti či nepřítomnosti mutace u pacienta. V této části práce bylo cílem i praktické zvládnutí izolace DNA z periferní krve a bukalního stěru, příprava a provedení PCR reakce a detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy.

Nakonec se nám podařilo metodu optimalizovat pro dvě různé matrice, pro izolát DNA a periferní krev. Pro bukalní stěr se metodu podařilo optimalizovat pouze částečně. Při postupném zvyšování teploty annealingu začínající na teplotě 55 °C, jsme nejlepších výsledků dosáhli při teplotě 65,5 ° za použití kitu gb Basic PCR Master Mix od firmy Generi

Biotech. Tato optimalizace může v budoucnu umožnit použití metody pro cílenou detekci mutace c.5266dupC v genu BRCA1 v rámci rutinní praxe v laboratoři.

Klíčová slova: BRCA1 – BRCA2 – mutace – PCR ARMS

Abstract

Breast cancer and ovarian cancer is one of the most common malignancies what women have in the Czech Republic and the incidence of new diagnoses has a tendency to increase. It is estimated that 5-10 per cent of these tumours is cause by pathogenic mutations in highly penetrance tumour suppressor genes BRCA1 or BRCA2. The main function of these genes are repair of double strand DNA breaks and another function is control of cell division and participate on regulation of transcription and chromatin remodeling.

The aim of this bachelors thesis is to summarize current knowledge of the "Gene mutations" topic, the function of the genes BRCA1 and BRCA 2 and their link with hereditary breast and ovarian cancer, an overview of possible detection methods and particularly also the summary of the Czech studies of detection mutations in the Czech Republic. It pointed out to the strong effect of the founder mutation. Among the most frequently found mutations are mutations as c.5266dupC, c.181T> G and c.3700_3704del5 in the gene BRCA1 and c.7913_7917del5 and c.8537_8538del2 in the BRCA2 gene.

In the experimental part of the work I have tried to optimize ARMS PCR method for point mutation c.5266dupC. This mutation has proved to be one of the most common mutations not only in the Czech Republic but also in Europe. The objective was to optimize the PCR ARMS in the conditions of the GENLABS Ltd. laboratory. The main goal of the optimization was the selection of appropriate PCR mix and optimal temperature of PCR profile at which the quality and quantity of the yield was visualized on gel electrophoresis as specific and highest as it is possible. The aim of this part is also practically to do the DNA isolation from peripheral blood and buccal swab, preparation and execution of the PCR reaction and detection of PCR products by gel electrophoresis.

Eventually, we managed to optimize a method for the two different matrices for the DNA isolates, and peripheral blood. Unfortunately the method for the buccal swab was not successful. During gradually temperature increasing, we started the process of annealing at 55°C, the best results were achieved at a temperature of 65.5 ° C using gb Basic PCR Master Mix from the Generi Biotech firm. In the future this optimization might allow the

using of method for mutation in the gene BRCA1 c.5266dupC for the routine practise in the laboratory.

Keywords: BRCA1 - BRCA2 - mutation - PCR ARMS

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2015

.....

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své vedoucí práce Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady, vstřícnost a trpělivost, které mi věnovala a za možnost uskutečnění experimentálních pokusů v laboratoři GENLABS. Poděkování patří také MUDr. Eduardu Hájkovi za poskytnutí užitečných informací a dat pro zpracování v mé práci.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i svým rodičům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Obsah

Obsah	8
Seznam použitých zkratk	10
Úvod.....	11
1 Teoretická část.....	12
1.1 Mutace jako příčina nádorového onemocnění	12
1.2 Mutace na úrovni DNA.....	13
1.2.1 Delece, inzerce.....	13
1.2.2 Velké přestavby genů.....	14
1.2.3 Substitute.....	14
1.2.4 Mutace předčasně ukončující řetězec aminokyselin.....	15
1.2.5 Mutace měnící místo sestřihu	15
1.3 Hereditární a sporadická maligní onemocnění.....	16
1.4 Charakteristika a funkce genů BRCA1 a BRCA2	17
1.5 Další geny s potenciálním rizikem pro karcinom prsu a vaječnicků	18
1.6 Syndrom hereditárního karcinomu prsu a vaječnicků	20
1.7 Incidence a mortalita	21
1.8 Indikace k vyšetření DNA.....	22
1.8.1 Familiární formy	22
1.8.2 Sporadické formy.....	22
1.9 Možnosti prevence a profylaxe	23
1.10 Laboratorní praxe a používané metody detekce.....	23
1.10.1 PCR.....	24
1.10.2 Přímé sekvenování	25
1.10.3 Sekvenování nové generace.....	25
1.10.4 DHPLC	26
1.10.5 Další metody využívající rozdílné pohyblivosti fragmentů.....	27
1.10.6 HRM analýza	27
1.10.7 MLPA	28
1.10.8 PTT	28
1.10.9 Další metody pro testování konkrétní mutace	29
1.11 Výskyt mutací BRCA1 a BRCA2 v České republice	29
2 Cíle práce.....	34
3 Metodika.....	35
3.1 Izolace DNA.....	35
3.1.1 Bukální stěr	35
3.1.2 Plná krev	36
3.2 Měření koncentrace a čistoty DNA (NanoDrop Implen).....	38
3.3 Optimalizace metody PCR ARMS pro mutaci c.5266dupC v BRCA1 genu ..	38
3.4 Princip PCR ARMS	39
3.4.1 Mutace c.5266dupC	40
3.4.2 PCR Mixy a příprava reakčních směsí	40
3.4.3 Sekvence použitých primerů.....	41

3.4.4	Výchozí teplotní profil reakce	42
3.4.5	Příprava a provedení gelové elektroforézy	42
4	Výsledky.....	45
	Diskuze	50
5	Závěr.....	51
6	Literatura	52
	Přílohy.....	59

Seznam použitých zkratek

BRCA	Breast Cancer
ca	karcinom
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
GT	guanin, tymin
AG	adenin, guanin
mRNA	messenger RNA
EMQN	The European Molecular Genetics Quality Network
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
DHPLC	denaturing high performance liquid chromatography
HRM	high resolution melting
RFLP	restriction fragment length polymorphism
MLPA	multiplex ligation dependent probe amplification
NGS	next generation sequencing
HGVS	human genome variation society
BIC	breast cancer information core database
RAD51	DNA repair protein
TP53	tumor protein 53
PTEN	phosphatase and tensin homolog
STK11	serine/threonine kinase
CDH1	cadherin 1
ATM	ataxia telangiectasia mutated
CHEK2	checkpoint kinase 2
BRIP1	BRCA1 – interacting protein 1
PALB2	partner and localizer of BRCA
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
TOX3	TOX high mobility group box family member 3
MRPS30	mitochondrial ribosomal protein s30
MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
FAM84B	family with sequence similarity 84, member B
LSP1	lymphocyte specific protein 1
CA125	estrogen receptor alpha
ESR1	cancer antigen 125

Úvod

S rostoucím povědomím o problematice karcinomu prsu a vaječníků a jejich možné dědičnosti, roste v současné době i důležitost molekulárně genetického testování mutací v genech. Geny BRCA1 a BRCA2 související se syndromem hereditárního karcinomu prsu a vaječníků a jejich význam v souvislosti s těmito nádory se stále více dostává do povědomí širší veřejnosti, což vede k efektivní cílené prevenci. Současným trendem je také vývoj stále citlivějších a efektivnějších metod detekce pro rutinní diagnostiku v laboratořích.

Mutace v genech BRCA1 a BRCA2 jsou příčinou asi 5 – 10% karcinomů prsu a vaječníků. Genetické testování mutací v těchto genech je doporučováno především na základě konkrétních kritérií navržených odbornou společností lékařské genetiky rodinám s vysokým rizikem dědičných predispozic k rakovině, což opět posiluje prevenci.

V práci shrnuji poznatky o daném tématu, popisují možné typy genových mutací vyskytujících se v genu BRCA1 a BRCA2, blíže charakterizují funkce těchto genů v souvislosti se syndromem hereditárního karcinomu prsu a vaječníků. Práce obsahuje i přehled nejužívanějších metod detekce daných mutací a celkové shrnutí výstupů ze studií zabývajících se výhradně výskytem mutací v genech BRCA1 a 2 v České republice.

Cílem experimentální části práce byla optimalizace metody PCR ARMS pro detekci mutace c.5266dupC v genu BRCA1, která byla realizována v laboratoři GENLABS s.r.o.

1 Teoretická část

1.1 Mutace jako příčina nádorového onemocnění

Každé nádorové onemocnění může mít původ ve zděděné mutaci jednoho nebo více genů, která způsobuje vyšší sklony ke vzniku karcinomu. To, zda onkologické onemocnění skutečně během života vypukne, záleží na mnoha dalších genetických i negenetických faktorech.(12) Změny v genotypu tzv. mutace nazýváme a rozlišujeme dle různých kritérií např. dle charakteru zasažené buňky na zárodečné a somatické nebo dle vlivu na změnu v počtu kopií genomu na balancované a nebalancované nebo dle úrovně, na které ovlivňují genetickou informaci na genomové (numerické), chromozomální (strukturní a tedy balancované či nebalancované) genové (ty pak na bodové či dynamické) nebo dle způsobu jejich vzniku na spontánní a indukované.

Mutace je možné dělit podle zasažené buňky na gametické (zárodečné), které se vyskytují ve všech buňkách jedince včetně gamet. Jde o mutace zděděné nebo nově vzniklé v gametách a přenášejí se na potomstvo. Zárodečné mutace mohou vést ke vzniku dědičných chorob. Jedinec tyto mutace většinou zdědil a můžeme je prokázat u rodiče, ale v některých případech vznikly „de novo“ přímo až v pohlavní buňce, která se účastnila oplodnění, ty pak u rodičů neprokazujeme. Nebo na mutace somatické, které zasahují buňky tkání a orgánů a nepřenášejí se na potomstvo. Vznik somatických mutací ovlivňuje např. výživa a faktory prostředí (chemické, fyzikální nebo biologické). Somatické mutace mohou být příčinou rozvoje nádorového bujení v dané tkáni a jejich testování je důležité především z hlediska možné terapie a celkové prognózy.(1)

Pokud mluvíme o nádorových onemocněních, bereme v úvahu mutace dvou typů genů a to tumor-supresorových genů a méně často onkogenů. Protoonkogen se ve své mutované formě nazývá onkogen. Změna jeho funkce nebo exprese vlivem mutace vede k abnormální stimulaci buněčného dělení a proliferaci. Onkogeny jsou dominantně děděné geny, to znamená, že pro transformaci fenotypu buňky z normální na maligní, stačí jedna zmutovaná

alela. Tumor supresorové geny jsou velice různorodé. Zatímco některé z nich jsou prakticky skutečné nádorové supresory, protože jsou schopné přímého zapojení do regulace buněčného cyklu nebo kontaktní inhibice růstu buněk (označovány jsou jako „gatekeepers“), jiné (označované jako „caretakers“) opravují chyby v DNA a udržují integritu genomu. Ale až ztráta obou alel genu je nepřímo zodpovědná za zhoubné bujení tím, že umožní hromadění sekundárních mutací.(28)

Podle Knudsonovy dvojzásahové teorie je tumorsupresorový gen vyřazen až mutací obou jeho alel. Pokud tak člověk již mutaci jedné alely příslušného genu zdědil (první zásah), stačí pak jakýkoli další zásah ke kompletnímu vyřazení funkce příslušného genu (druhý zásah), to pak spouští mnohastupňový proces tumorigeneze. Výskyt určitého typu nádoru v několika generacích je způsoben přenášením predisponující alely a nádorové predispozice zárodečnými buňkami do dalších generací, tím vznikají tzv. rizikové rodiny („high risk families). Jejich charakteristickým znakem je nejen hromadění malignit, ale často i diagnóza nádorového onemocnění v mladém věku.(39)

Četnost mutací se liší v závislosti na prostředí, lze tak říci, že četnost mutací roste s rostoucím vlivem mutagenů a zhoršujícími se životními podmínkami a zdravotním stavem organismu.(1)

Pokud se jedná o testování podezřelých hereditárních forem nádorů, provádí se nejčastěji testování zárodečných mutací z DNA izolované z krve pacientů.(12)

1.2 Mutace na úrovni DNA

1.2.1 Delece, inserce

Delece (ztráta) nebo inserce (zařazení) jedné a více bází způsobuje narušení čtecího rámce („frameshift“ mutace), je-li zařazen takový počet nukleotidů, který není celočíselným násobkem čísla 3. To pak způsobuje vytváření rozdílné bílkoviny nebo i předčasné ukončení proteosyntézy. Pokud ale je počet bází, jichž se zařazení nebo delece týká, násobkem čísla 3,

mohou tyto mutace vlivem ztráty nebo zisku kodónů způsobovat deleci nebo inzerci aminokyselin ve výsledných proteinech.(28) Ne všechny delece a inserce vedoucí k posunu čtecího rámce musí být patogenní.(12)

1.2.2 Velké přestavby genů

Velké intragenové přestavby (delece nebo duplikace či amplifikace oblastí zahrnující celé exony) jsou většinou změny, které výrazně mění stavbu a funkci proteinu a je proto možné je jednoznačně označit za škodlivé. (12)

1.2.3 Substituce

Substituce (náhrada či záměna) nukleotidové báze patří mezi tzv. bodové mutace. Jedná se o nejčastější genetickou změnu, která reprezentuje až 90 % všech detekovaných variant v DNA.(25) Převažující většina z nich nemá viditelné projevy. Průměrná frekvence běžných nukleotidových substitucí v lidském genomu se pohybuje kolem jedné na 1000 bází.(35)

Změny v nukleotidech zahrnující substituci purinu purinem (adenin, guanin) či pyrimidinu pirimidinem (tymin, cytosin) se nazývají tranzice. Záměna purinu s pirimidinem a naopak se nazývá transverze.(28)

Substituce purinové nebo pyrimidinové báze je škodlivá pouze tehdy, je-li v důsledku záměny poškozena struktura nebo přímo funkce proteinu. Pokud se upraví aminokyselina na aminokyselinu o jiných fyzikálních vlastnostech, je zde taky větší možnost vlivu na strukturu a poté i stabilitu a funkci bílkoviny.(12)

Substituce jednoho nukleotidu v sekvenci DNA, které mohou způsobit začlenění jiné než původně kódované aminokyseliny do aminokyselinového řetězce, se nazývají „missence mutaciaon“ (mutace měnící smysl kodónu).(28)

U většiny záměn, které vedou ke změně jedné aminokyseliny kódované daným tripletem, však není zcela jasný klinický účinek a jsou považovány za neškodné polymorfni varianty bez fenotypového projevu. Tyto varianty jsou hodnoceny jako „Unknown Variants“.(12)

1.2.4 Mutace předčasně ukončující řetězec aminokyselin

Obvykle končí translace (proces tvorby bílkovin) po dosažení terminačního kodónu. Mutace, které vytvoří terminační kodón, způsobí předčasné ukončení translace. Zatímco mutace, která terminační kodón zničí, dovolí, aby translace pokračovala do té doby, než dosáhne následujícího terminačního kodónu.(28) Tzv. „nonsense“ (nesmyslné) mutace zapříčiňují vznik mRNA s předčasným terminačním kodonem a jsou patogenní, jelikož vzniká nestabilní a nefunkční protein. (12)

1.2.5 Mutace měnící místo sestřihu

Zvláštní skupinou jsou mutace měnící místo sestřihu – tzv. „splice site“ mutace. Nejsnadněji rozpoznatelné se vyskytují v konzervativních místech sestřihu dinukleotidu GT lokalizovaného na 5' počátku intronu (donorové místo sestřihu) a dinukleotidu AG lokalizovaného na 3' konci intronu (akceptorové místo sestřihu).(12)

Byly popsány dva základní typy mutací, které postihují místa sestřihu. Jsou jimi mutace bází v donorovém či akceptorovém místě ovlivňující správný sestřih RNA v tomto místě a mutace tvořící nukleotidovými substitucemi alternativní donorová a akceptorová místa, která s normálními místy při sestřihu soutěží.(28)

K odhalení těchto mutací mohou pomoci počítačové programy vyhledávající v zadané DNA sekvenci lokalizaci předpokládaného místa sestřihu. Pomocí predikčního programu lze zjistit, s jakou pravděpodobností by mohla studovaná varianta ovlivnit správný sestřih mRNA.(12)

1.3 Hereditární a sporadická maligní onemocnění

Většina zhoubných rakovinných onemocnění je sporadická, nedědičná. Nádorové klony mohou vznikat ve chvíli, kdy v jakékoli ze somatických buněk nastane primární genetická událost (mutace, obvykle tumor supresorového genu nebo protoonkogenu).

Mutace dává těmto nádorovým buňkám pouze výhodu ve formě zrychleného růstu a dělení. K dosažení plně rozvinutého maligního fenotypu (v důsledku nezávislosti na externích růstových signálech, necitlivosti k externím protirůstovým signálům, unikání apoptóze, schopnosti neomezené replikace, podpory neoangiogeneze - prorůstání nádoru novými cévami, invazivity a metastatické schopnosti) je třeba, aby se v buňkách klonu nahromadilo několik dalších mutací „za nádor odpovědných genů“ (onkogenů, tumor supresorových genů včetně reparačních genů) a dalších tzv. epigenetických událostí (např. metylace promotorových oblastí genů snižujících nebo eliminujících jejich expresi). Samotná mutace, která je schopna vyhnout se protinádorovým mechanismům jako je reparace mutací, apoptóza a imunologické mechanismy, však nedokáže přeměnit normální buňku za nádorovou.

Je tedy jasné, že pro nahromadění takového množství změn v klonu nádorové buňky je potřeba uplynutí určitého času. Proto vykazuje incidence sporadických nedědičných malignit závislost na věku, jsou to onemocnění postreprodukčního období, kdy také postupně klesá efektivita protinádorových mechanismů.(15)

Nejméně 10 % nádorových onemocnění je dědičných, jsou způsobené mutacemi vysoce (i méně) penetrantních genů (pravděpodobnost projevu fenotypu určité varianty genu).

Původ takového onemocnění lze tedy hledat ve zděděné zárodečné (germinální) mutaci jedné alely nádorového genu, se kterou se jedinec již rodí. To znamená, že predispozice k určitému malignímu onemocnění je u nositele mutace přítomna ve všech jeho somatických buňkách. Tato mutace s predispozicí k určitým malignitám se může dědit autosomálně dominantním, recesivním ale i na X – vázaným recesivním způsobem a může tak být přenášena do dalších generací. (5,13)

1.4 Charakteristika a funkce genů BRCA1 a BRCA2

Geny BRCA1 a BRCA2 kódují sekvenčně nepříbuzné proteiny, které jsou součástí multiproteinových komplexů významných především pro udržení stability genomu.(URL4) Gen BRCA1 byl lokalizován v roce 1990 (47) na chromozomu 17q12-21 a jeho sekvence složená z exonů 2-24 kódující 7,8 kb dlouhý transkript byla identifikována v roce 1995.(48) BRCA1 gen kóduje protein o velikosti 1863 aminokyselin a 220 kDa s E3 ubiquitin ligázovou aktivitou a fosfopeptidovou vazebnou aktivitou je exprimován ve všech buňkách lidského těla se zvýšenou hladinou exprese pozorované zejména v ováriích, varlatech a brzlíku.(URL5) Gen BRCA2 byl lokalizován v roce 1994 na chromozomu 13q12-13 (49), jeho kódující sekvence složená z exonů 2-27 byla identifikována v roce 1995.(50) Výsledkem translace mRNA o velikosti 11-12 Kb je protein o velikosti 3418 aminokyselin a 384 kDa.(6) Jeho přepis odpovídá potřebám buněčné proliferace. Oblast o velikosti 3.3 kb v rámci exonu 11 genu BRCA2 se nazývá „ovarian cancer cluster region“ (OCCR). V této oblasti je zvýšen nález mutací podmiňujících rakovinu vaječníků.(14).

Obecně jsou tedy jejich proteiny přítomné ve všech tkáních a jejich exprese a stupeň fosforylace závisí na fázi buněčného cyklu. Nejvyšší exprese mRNA genů BRCA1,2 je při přechodu z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu, kde hrají roli v procesu oprav DNA (tzv. „check point control“) a během M fáze je mRNA obou genů degradována. Zvýšená exprese byla pozorována v proliferaujících buňkách a po působení estrogenů.(20,23)

Hlavní úloha proteinu BRCA2 spočívá v regulaci funkce rekombinázy RAD51 při opravách zlomů dvouvláknové DNA (double-strand breaks,DSB) během tzv. homologní rekombinace. BRCA2 protein je nezbytný pro transport RAD51 do jádra buňky a lokalizuje místo poškození DNA.

BRCA1 má odlišnou, obecnější funkci jako zprostředkovatel mezi detekcí/signalizací a výkonnými složkami odpovědi na poškození dvouvláknové DNA. BRCA1 má také vliv na řízení apoptózy prostřednictvím proteinů p53 a c-Abl.(23,45)

Oba geny jsou součástí mechanismu oprav zlomů dvouvláknové DNA, kontroly buněčného dělení a spolupodílejí se na regulaci transkripce a remodelaci chromatinu. Onemocnění se dědí autozomálně dominantním způsobem. Pravděpodobnost, že vlohu zdědí,

tedy mají obě pohlaví stejnou. Fenotypové projevy jsou však rozdílné, neboť funkce BRCA genů je pravděpodobně nejstěžejnější v tkáních podléhajících regulaci pohlavními hormony. Je jednoznačně prokázáno, že zárodečné mutace v BRCA genech jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu a ovarií u žen.(31)

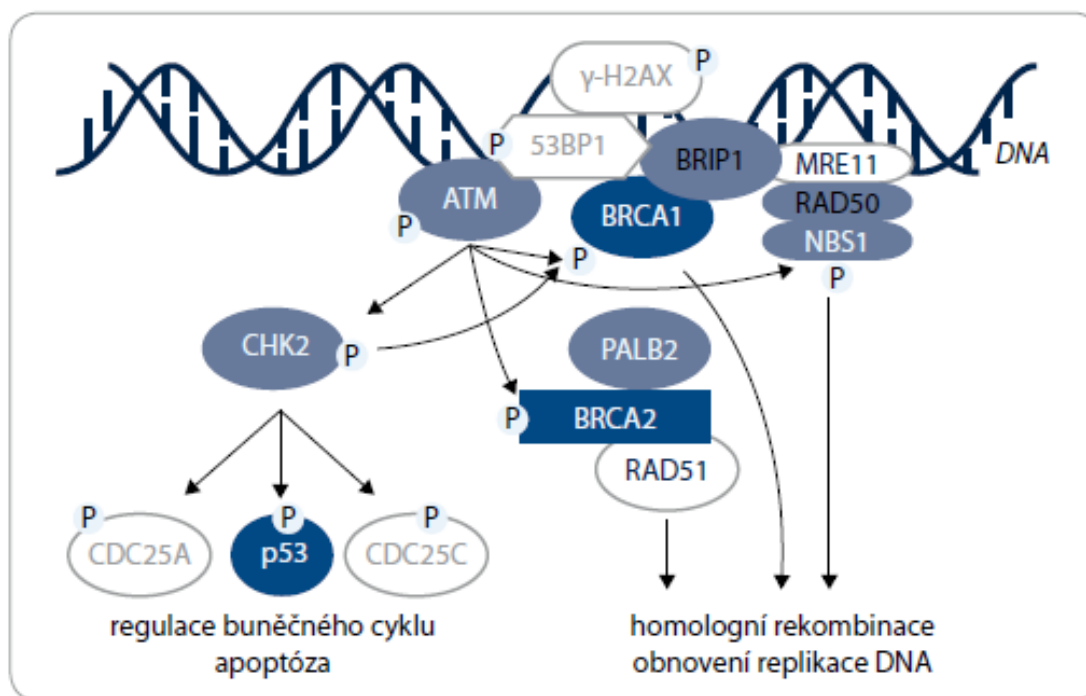
Způsob, jakým mutace v genech BRCA1 a 2 ovlivňují vznik nádorového bujení právě v prsu a vaječnicích, zatím není zcela objasněn.(45)

Obrázek 1 znázorňuje vliv hlavních proteinů, které se podílejí na reparaci dvouřetězcových zlomů v DNA pomocí homologní rekombinace.

1.5 Další geny s potenciálním rizikem pro karcinom prsu a vaječníků

V dědičnosti rakoviny prsu a vaječníků nehrají roli pouze geny BRCA1 a 2, ale řada dalších genů, které jsou prvotně spojovány s jinými malignitami, ale vzhledem k funkci jejich proteinů, mohou způsobovat více typů karcinomů. Mezi takové geny patří TP53, jehož mutace zapříčiňuje Li-Fraumeniho syndrom způsobující karcinomy u dětí a velmi časný nástup rakoviny prsu (30 % žen nositelek této mutace bylo diagnostikováno kolem 30. roku života). Další geny s potenciálním vysokým rizikem jsou PTEN, STK11, CDH1, středně penetrantní geny ATM, CHEK2, BRIP1, PALB2 a málo penetrantní geny FGFR2, TOX3, MRPS30, MAP3K1, FAM84B, LSP1, ESR1 a další, které zvyšují riziko výskytu rakoviny prsu/vaječníků pro nositele mutaci BRCA1 a BRCA2.(30)

Obrázek 1: Schéma znázorňující hlavní proteiny podílející se na reparaci dvouřetězcových zlomů v DNA pomocí homologní rekombinace



Zdroj: Polreich 2012 (převzat obrázek i jeho popis)

Přímý vliv na patogenezi hereditárních i sporadických forem karcinom prsu mají proteiny reparace dvouřetězcových zlomů DNA, jsou jimi senzorké proteiny (ATM) a proteiny MRN komplexu (MRE11, RAD50, NBS2 (NBN)), přenašeči signálu (CHK2), výkonné molekuly regulující vlastní reparační pochody (BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD51), kontrolní body buněčného cyklu (CDC25A) nebo aktivace apoptózy (p53).

Proteiny kódované významnými geny souvisejícími s predispozicí pro karcinom prsu a vaječníků jsou znázorněny tmavě modrou barvou, proteiny kódované geny se středním rizikem světle modře. Bíle jsou označeny nádorové predispoziční faktory v populaci pacientů ČR.(32)

1.6 Syndrom hereditárního karcinomu prsu a vaječnicků

První významný důkaz o rodinné dědičnosti rakoviny prsu publikoval už v roce 1866 francouzský chirurg Paul Broca. Sledoval příčiny úmrtí 38 členů manželčiny rodiny v průběhu pěti generací mezi lety 1788 až 1856. Deset z 24 žen v této rodině zemřelo na rakovinu prsu. Tato zpráva byla prvním vypovídajícím důkazem o hereditárním karcinomu prsu společně s rakovinou gastrointestinálního traktu a částečně i s rakovinou kolorekta.(21)

Odhaduje se, že 5 – 10 % nádorů prsu nebo vaječnicků je dědičného původu. Asi v 80 % případů je příčina v zárodečné mutaci genu BRCA1 nebo BRCA2. Jejich dědičnost je autozomálně dominantní, to znamená, že je zde 50% riziko přenosu mutace z rodičů na děti.(3,29)

U nosiček mutace v genech BRCA1 a BRCA2 vzniká celoživotní riziko karcinomu prsu a ovárií od 40 do 85 % (pro BRCA1 až 60 %, pro BRCA2 10-20 %). Do 40 let věku onemocní 19 % nosiček mutace genu BRCA1 a 12 % nosiček genu BRCA2. Do věku 80 let se objeví nádor prsu až u 87 % žen a nádor vaječnicků až u 40-60 % žen s mutací BRCA1.(3,30) U mužů je celoživotní riziko karcinomu prsu s mutací v BRCA2 genu 6 %, to znamená 100x vyšší než u normální zdravé populace, zvyšuje se i celoživotní riziko rakoviny prostaty na 14-26 % (7) a společně s další mutací v genu BRCA1 na 3 % (50x zvýšené riziko). U nosičů těchto mutací může být zvýšené riziko i pro jiné malignity, patří mezi ně nádory vejcovodů, dělohy, děložního čípku, kolorekta, žaludku, slinivky, žlučníku a žlučových cest a maligní melanomy.(3,30)

Dědičné formy nádorů se vyznačují rychlým růstem a mladým věkem pacientek, zhruba o 7 – 10 let dříve než je medián výskytu nádorového onemocnění dané populace.(30) Dále jsou také často typické horší viditelnosti při mamografickém vyšetření a vysokou proliferační schopností.(20) Z histologického hlediska se často vyskytuje v souvislosti s mutacemi genu BRCA1 medulární karcinom prsu, ostatní histotypy jsou zastoupeny ve stejné míře jako u sporadických nádorů. Nádory bývají oboustranné a multifokální. V histologii nádorů vaječnicků jsou v souvislosti s přítomností mutací v genech BRCA1 a 2 nejčastěji popisovány

karcinomy serózní, epitelální a nádory z jasných buněk. Stupně diferencovanosti a rozsah nádoru (grading a staging) jsou stejné jako u skupiny sporadických nádorů. (3)

1.7 Incidence a mortalita

Podle statistické ročenky, kterou vydává Ministerstvo zdravotnictví je maligní karcinom prsu nejčastějším zhoubným onemocněním žen v České republice. Přibližně každá desátá žena u nás onemocní během svého života nádorem prsu. Podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR onemocnělo v roce 2011 rakovinou prsu 51 mužů, to je 1 na 100 000 mužů. Nově diagnostikovaných nádorů prsu u žen v roce 2011 bylo 6620, to znamená 123,9 případů na 100 000 žen. Incidence výskytu karcinomu prsu má tendence stoupat.(URL3) Počet úmrtí na zhoubné nádory prsu na 100 000 obyvatel za rok (mortalita) naopak v dnešní době alespoň mírně klesá. Z toho lze usoudit, že se zlepšují preventivní a léčebné možnosti.(URL2)

Nádory vaječníků a vejcovodů zastupují asi 15 % všech maligních novotvarů u žen a Česká republika je v incidenci těchto nádorů na 4. místě v Evropě. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR udává absolutní počet 1080 nově diagnostikovaných žen v roce 2011, to je 20,2 na 100 000 žen.(URL3) Mortalita je však na tento typ rakoviny poměrně vysoká (15 zemřelých na 100 000 žen za rok).(URL1)

Časový vývoj incidence a mortality zhoubného nádoru prsu a vaječníků udávám v příloze v tabulkách 1 a 2.

1.8 Indikace k vyšetření DNA

Genetickému vyšetření předchází vždy konzultace s klinickým genetikem, který vysvětlí pacientovi problematiku hereditárních karcinomů, možnosti a omezení DNA vyšetření a následné možné kroky v případě nalezení mutace.(40) Sestaví nejméně třígenerační rodokmen, ověří genealogické údaje, diagnózu pacienta i dalších příbuzných.(15) Genetické vyšetření se provádí od 18 let a nezbytný je i informovaný souhlas pacienta s genetickým laboratorním vyšetřením.(40)

Molekulárně genetické vyšetření genů BRCA1 a BRCA2 je indikováno na základě kritérií rozdělených podle forem nádorového onemocnění do dvou skupin:

1.8.1 Familiární formy

Podmínkou jsou alespoň tři přímí příbuzní (včetně pacienta) s karcinomem prsu/vaječnicků bez ohledu na jejich věk. Nebo 2 příbuzní prvního stupně s ca prsu/vaječnicků, z nichž alespoň jeden byl diagnostikován pod 50 let věku. (40)

1.8.2 Sporadické formy

Zde je podmínkou bilaterální nádor prsu nebo vaječnicku s první diagnózou pod 50 let nebo samotný výskyt karcinomu prsu nebo vaječnicku s diagnózou pod 40 let, medulární a atypický ca prsu nebo triple negativní ca (chemorezistentní pro cílenou léčbu, nádor neobsahuje žádný z estrogenových, progesteronových receptorů) ve věku do 50 let. Stejně podmínky platí i pro muže s karcinomem prsu.(40)

1.9 Možnosti prevence a profylaxe

V případě nalezení mutace jsou zde pro pacientky možná profylaktická opatření, která zahrnují celkové dispenzární sledování, chemoprevenci a chirurgické výkony.

Doporučuje se například samovyšetření prsů jednou měsíčně od 18 let, celkové vyšetření onkologem od 25 let, nukleární magnetická resonance (NMR) a ultrazvukové vyšetření prsů jedenkrát ročně od 25 let, mamografie jedenkrát ročně od 30 let. Je možné i ultrazvukové vyšetření břicha jednou ročně, gynekologické vyšetření 2krát ročně, kolonoskopie a gastroskopie jednou za tři roky od 45 let atd.

Další možností z hlediska prevence je také vyšetřování onkomarkeru CA125 a prevence související s působením BRCA genů i na jiné malignity, například v případě karcinomu tlustého střeva test na okultní krvácení ročně od 40 let a kolonoskopie.(30)

V chirurgické profylaxi se doporučuje mastektomie, tou se myslí odstranění jednoho či obou prsů, kdy není možné vyloučit pozdější riziko vzniku karcinomu v druhém prsu, po které vždy následuje i rekonstrukce odstraněných prsů.(4) Bilaterální profylaktická adnexektomie (odstranění vaječníků i s vejcovody) by se měla provádět nejlépe ve věku 35-40 let u nosiček mutace. V chemoprevenci je schváleno podávání tamoxifenu a raloxifenu po dobu 5 let od 40 let, zvláště pro nositele mutace BRCA2 genu. V České republice tato prevence však není doporučována. Je potřeba zvážit s ošetřujícím lékařem – onkologem všechna pro a proti vzhledem k negativním účinkům léků na lidský organismus.(30)

1.10 Laboratorní praxe a používané metody detekce

Organizace EMQN (European Molecular Genetics Quality Network) doporučuje jako materiál pro mutační analýzu BRCA genů genomickou DNA izolovanou z periferní krve, ale nevylučuje i použití jiného biologického materiálu.(6) Strategie vyšetření je následující: kompletní mutační analýza by měla být provedena u postiženého jedince a detekovaná mutace by měla být následně potvrzena z nového vzorku DNA. Společnost lékařské genetiky nedoporučuje pro diagnostické účely pouze cílené testování jednotlivých mutací k vyloučení

rizika onemocnění, ale celogenové sekvenování genů BRCA1 i BRCA2. V běžné praxi se nejprve testuje několik nejčastějších mutací (5-6 mutací) vyskytujících se v dané populaci a pokud není nalezena kauzální patogenní mutace, přistupuje se vždy k sekvenaci celých genů BRCA1 i BRCA 2.(URL6)

Pokud i přes vysokou pravděpodobnost přítomnosti patogenní mutace pomocí citlivých metod screeningu nebyla u jedince mutace nalezena, měla by se zvážit možnost sporadického výskytu. Jedná se o případy tzv. fenokopii, kdy u 24 % žen s nádorem prsu není přítomna mutace BRCA1/2, přestože pocházejí z rodin s prokázanou BRCA1/2 mutací. (6,12)

Výběr metody detekce závisí na více faktorech, jako jsou preference pro vyšetření v určité geografické oblasti a na možnostech vybavení laboratoře, není tak možné doporučit jen jednu techniku.

Vždy je vhodné provést kompletní analýzu kódujících sekvencí včetně míst sestřihu obou genů BRCA vzhledem k velké řadě detekovaných mutací.(6)

Každá takto detekovaná mutace by měla být na závěr stanovena sekvenováním a ověřena na DNA izolované z nového vzorku. Pokud se přítomnost patogenní mutace nepotvrdí, není možné nabízet prediktivní testování příbuzných. Ve výsledkové zprávě musí být uvedeno řádné vysvětlení významu nalezené mutace.(6)

Níže uvádím nejvyužívanější metody detekce podle EMQN.

1.10.1 PCR

Základem pro většinu následujících technik je polymerázová řetězová reakce, metoda, která umožňuje amplifikaci (tj. zmnožení) specifického úseku DNA, přičemž využívá základních principů replikace nukleových kyselin. Princip metody spočívá v mnohonásobné syntéze komplementárního řetězce pomocí příslušné DNA polymerázy, a to v rámci sekvence ohraničené na začátku a na konci krátkými syntetickými oligonukleotidy (ssDNA, 15– 30 b), tzv. primery, které jsou odvozeny od dané sekvence. Z jedné molekuly templátu (jednořetězcové DNA) je teoreticky možné získat 2^n kopií konkrétní sekvence při n cyklech.

Vizualizace amplifikovaného PCR produktu obvykle probíhá s využitím gelové elektroforézy. PCR umožňuje detekovat různé typy mutací, které jsou spojovány s vyšším rizikem vzniku karcinomu.

PCR, obvykle ve spojení s dalšími molekulárně-biologickými technikami např. RFLP, HRM analýza, sekvenování, umožňuje cíleně i necíleně detekovat různé typy mutací spojené s vyšším rizikem vzniku nádoru a pomáhá tak zlepšit preventivní screeningové programy nádorových onemocnění či podrobněji charakterizovat typ nádoru pro následnou volbu účinnější terapie. (18)

1.10.2 Přímé sekvenování

Jako zlatý standard sekvenování je často uváděna Sangerova metoda sekvenování, protože poskytuje informace o přímém řazení nukleotidů. Základem této metody je sekvenace prostřednictvím detekce prodlužujícího se vlákna DNA. K ukončení vlákna se využívá dideoxynukleotid (ddNTP). Jedná se o nejčastěji používanou sekvenační technologii založenou na elektroforéze.(6) Automatizace této technologie využívající kapilární elektroforézu pro 96 vzorků umožnila osekvenovat 500 kb za den.(19) Přímé sekvenování celých genů je pracné a časově velice náročné, není ekonomicky nákladné jako nové přístupy detekce. Pro průkaz či verifikaci konkrétních mutací se používá zcela běžně.

1.10.3 Sekvenování nové generace

V současnosti je tendence nahradit Sangerovo sekvenování moderními metodami založenými na paralelním sekvenování celých genů popř. i genomů v poměrně krátkém časovém úseku.(6) Sekvenátory druhé generace (NGS, next generation sequencing) umožňují masivní paralelní sekvenování až tisíců molekul DNA současně. Tato technologie výrazně snižuje dobu nezbytnou k přečtení dlouhých sekvencí DNA.

Dnes na trhu převládají tři platformy NGS sekvenátorů: Roche 454 Genome Sequencer, Illumina Genome Analyzer a Life Technologies SOLiD System. a ačkoli všechny dostupné technologie využívají rozdílnou chemii, mají společné některé kroky: a) příprava templátu neboli vytvoření knihovny amplikonů, b) vlastní sekvenování a c) analýza dat.(46)

Principiálně je možné NGS technologie rozdělit do dvou základních kategorií. První skupinou jsou technologie založené na PCR amplifikaci templátu (PCR-based technologies) a druhou představují technologie využívající tzv. single-molecule sequencing, tzn., že nedochází k amplifikačnímu kroku před vlastní sekvenací.(37) Praktické zavedení NGS sekvenování do laboratoří vyžaduje finančně velice nákladné specifické přístrojové vybavení a spotřební materiál. Výhodou oproti přímému sekvenování je velká časová úspora, kdy jsou výsledky známy během několika dnů a ne týdnů či měsíců, jako v případě Sangerova sekvenování. Náklady na jeden vzorek jsou bohužel stále relativně vysoké.

1.10.4 DHPLC

Denaturační vysokoučinná kapalinová chromatografie je metoda chromatografie založená na detekci heteroduplexní dsDNA a je určena pro detekci substitucí bází, malých delecí nebo inzercí v DNA. Díky své vysoké citlivosti, specifčnosti, rychlosti a vysokému rozlišení vhodná pro nalezení polymorfismů v DNA s výjimkou velkých genových přestaveb. PCR fragmenty jsou od sebe odděleny pomocí chromatografie iontových párů a reverzní fáze kapalinové chromatografie na koloně se speciální matricí (stacionární fáze) s použitím částečné tepelné denaturace a zvyšující se koncentrace acetonitrilu (mobilní fáze).

Hodnotí se výsledný chromatogram, pokud je nalezena změna v sekvenci, je u daného fragmentu sekvenováním prokázána přítomnost dané změny.(6)

1.10.5 Další metody využívající rozdílné pohyblivosti fragmentů

Mezi další možnosti detekce mutací založené na rozdílné pohyblivosti fragmentů patří metody jako confirmation – sensitive gel electrophoresis (CSGE), heteroduplex analýza (HA), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) a metody vyvinuté z těchto technik jako na fluorescenci založená CSGE (F-CSGE). Původně se pro detekci fragmentů používaly polyakrylamidové gely a později byly metody upraveny pro kapilární elektroforézy. Po optimalizaci nabízejí tyto metody výbornou citlivost, mají schopnost detekovat všechny typy drobných mutací a jsou nízkonákladovou alternativou pro DHPLC metodu. Dnes jsou tyto metody ale postupně nahrazovány méně pracnými a účinnějšími postupy. (18)

1.10.6 HRM analýza

V případě kvalitativních analýz se velmi často používá vysokorozlišovací analýza křivek tání tzv. HRM (high resolution melting) analýza. Ta byla vyvinuta pro detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNP) a jako první použita pro genotypizaci.(44)

V principu je tato metoda založena na heteroduplexní analýze, v rámci které jsou detekovány rozdíly v teplotách tání PCR disociačních křivek.

DNA se při zvyšující se teplotě mění z dsDNA na ssDNA. Přítomnost heterozygotní mutace v jednořetězcové molekule DNA způsobuje výskyt nekomplementárních bází. Tím se molekula stává méně teplotně stabilní. Se vzrůstající teplotou a táním dsDNA se uvolňuje fluorescenční barvivo, jehož intenzita je přístrojově detekována.(6)

Kromě stanovení rozdílů v analyzovaných sekvencích, především přítomnosti specifických mutací, lze HRM použít i k detekci metylací. Typickým příkladem využití HRM v onkologii je diagnostika hereditárních nádorových syndromů.(18)

1.10.7 MLPA

Pro detekci větších genomových přestaveb je možné použít techniku MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Výhodou MLPA je časová hospodárnost, snadné použití a nevelké nároky na množství DNA, ale vysoké nároky na její kvalitu. Technika je založená na klasické PCR reakci, v jednom procesu amplifikace je současně vyšetřováno až 45 specifických sekvencí získaných hybridizací sond zacílených na konkrétní úseky genomu testované DNA za použití stejného páru primerů. Nejprve se tedy na cílovou sekvenci DNA navazují specifické oligonukleotidové sondy, které hybridizují těsně vedle sebe a na jejich konci je vždy stejný pár primerů, který s lidskou DNA není homologní. Po hybridizaci na cílové místo jsou oligonukleotidy spojeny ligací a následně amplifikovány v rámci PCR. Nakonec jsou produkty amplifikace rozděleny a detekovány kapilární elektroforézou na základně jejich různé délky.(6,43)

1.10.8 PTT

Technika PTT (protein truncation test) je určena pouze na detekci mutací, které vedou k předčasnému ukončení syntézy proteinů. PTT je nejvhodnější pro screening velkých exonů v BRCA1 a 2, protože je vyžadován fragment o délce alespoň 1000 bp pro optimální rozlišení. Tato metoda se skládá z kombinace *in vitro* transkripce a translace. Detekce translatovaného proteinu probíhá za použití elektroforézy na polyakrylamidovém gelu.

Vzhledem k velkému počtu nezařazených variant v exonu 11 u obou genu BRCA, je výhodou použití PTT, který detekuje pouze patogenní mutace. Nevýhodou je však to, že se jedná o mnohastupňový proces, čímž se zvyšuje riziko záměny vzorků nebo kontaminace.(6,37)

1.10.9 Další metody pro testování konkrétní mutace

Technik pro testování konkrétní mutace v daném místě genu je velké množství. Patří mezi ně restriční analýza real-time PCR, PCR ARMS (amplification-refractory mutation systém) atd.(6)

1.11 Výskyt mutací BRCA1 a BRCA2 v České republice

Podle studie Ramūnase Janavičiuse (2010), který se zaměřil na shrnutí současných znalostí o rozmanitosti zakladatelských mutací BRCA1 a 2 v Evropské populaci, je na území České republiky evidentní silný slovanský zakladatelský efekt. Několik nedávných studií už shrnulo důkazy o tom, že určitě země a etnické komunity mají určité spektrum BRCA1/2 zakladatelských mutací.(8,9,27,34) Zakladatelský efekt je nejvíce viditelný v geograficky, kulturně a nábožensky izolovaných populacích, které prošly výrazným nárůstem populace z malého počtu předků. Díky tomu se v této populaci s nízkou genetickou rozmanitostí staly některé alely frekventovanější.(36)

Genetické testování a poradenství pro vysoko-rizikové pacienty v České republice začalo v roce 1997. Zpočátku se testování účastnila dvě centra - Masarykův onkologický ústav v Brně a Všeobecná fakultní nemocnice s 1. lékařskou fakultou Univerzity Karlovy v Praze.(10)

V roce 2001 Macháčková et al. publikovala studii o nových zárodečných mutacích v České republice identifikovaných ve skupině 100 rizikových rodin s výskytem rakoviny prsu nebo prsu a vaječníků, ve které uvádí „frame-shift“ mutace 3761_3762delAG a 2616_2617ins10 v exonu 11 genu BRCA1 a v genu BRCA2 to byly mutace 5073_5074delCT a 6866delC v exonu 11. Použila při tom metody neradioaktivního PTT, heteroduplexní analýzy (HA) a přímého sekvenování.(24)

Další studie zaměřující se tentokrát na kompletní analýzu kódujících sekvencí genů BRCA1/2, kterou vydala Foretová et al. v roce 2004, se týkala 197 pacientů s rakovinou prsu/vaječníků z vysoce rizikových rodin a u 53 pacientů se sporadickým výskytem rakoviny. Tato analýza využívající neradioaktivní PTT pro exony 11 genu BRCA1 a exony 10 a 11 genu BRCA2, heteroduplex analýzu pro zbývající exony a ověření pozitivního výsledku pomocí přímého sekvenování, ukázala tři nejčastěji nalézané mutace v genu BRCA1 c.5266dupC, c.3700_3704del5 a c.181T>G a v genu BRCA2 to byly dvě mutace c.7910_7914del5 a c.8537_8538del2. Mimo široké spektrum dalších detekovaných mutací, byly objeveny i čtyři nové mutace – c.2762delA v BRCA1 a c.6449_6450del2, c.6754dupT, c.8169_8172dup4 v genu BRCA2.(11)

Mutační analýza provedená ve studii Polreicha v roce 2005 u 96 rodin s opakujícím se výskytem rakoviny prsu a/nebo rakoviny vaječníků a u 55 žen, které byly považovány za vysoce rizikové, detekovala celkem 44 patogenních mutací. Jednalo se o pacientky žijící v Praze a Středních Čechách, mající české předky. Výsledky prokázaly v genu BRCA1 tři nejčastěji se opakující mutace (71,4 % - 25 rekurentních mutací u 35 žen), první z nich byla mutace c.5266dupC, která tvořila 51,4 % ze všech nalezených mutací v genu BRCA1. Mutace c.3700_3704del5 byla druhou nejčastější mutací v genu BRCA1 (11,4 %). V 8,6 % to byla mutace c.181T>G (300T>G). Změny v genu BRCA2 byly spíše ojedinělé než opakující se. Jedinou rekurentní mutací byla mutace c.5763dupT. Pro analýzu mutací zde byla použita kombinace metod PTT (protein truncation test) a přímého DNA sekvenování.(33)

Studie Macháčkové et al. z roku 2008 identifikovala 44 mutací v genu BRCA1 a 41 mutací v genu BRCA2 ve 294 nepříbuzných rodinách. Tři zakladatelské mutace v BRCA1 c.5266dupC, c.3700_3704del5, p.Cys61Gly (podle BIC databáze: 5382insC, 3819del5, 300T>G) a dvě zakladatelské mutace v genu BRCA2 c.7913_7917del5, c.8537_8538del2 (podle BIC databáze: 8141del5, 8765delAG) představovaly 52 % všech detekovaných mutací mezi českými jedinci s vysokým rizikem onemocnění. Metody využité pro tuto analýzu byly PTT pro exon 11 genu BRCA1 a pro exon 10 a 11 genu BRCA2. Zbylé exony a místa

sestřihu (splice sites) byly detekovány heteroduplexní analýzou (HA). Pro domnělá místa sestřihu byla použita cDNA analýza.(22)

Rozdílný způsob testování oproti uvedeným použila Vašíčková et al. (2007). V rámci jejich studie byla snaha prozkoumat velká intragenová přeskupení v genu BRCA1 pomocí metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) u 172 nepříbuzných pacientů s hereditárním karcinomem prsu a/nebo vaječníků v České republice. Bylo nalezeno 6 různých velkých přeskupení v genu BRCA1, které byly potvrzeny a lokalizovány pomocí long-range PCR (amplifikace dlouhých úseků DNA), místa zlomu detekovaných přeskupení byla charakterizována přímým sekvenováním. Jednalo se o delecii exonu 1A/1B-2; částečnou delecii exonů 11 a 12; delecii exonů 18 a 19; delecii exonu 20; exonu 21 a 22 a delecii exonů 5 až 14.(41)

Pokud shrneme výsledky prací zabývajících se výskytem mutací v genech BRCA1/2 v České republice, pak v genu BRCA1 můžeme považovat za zakladatelské celkem tři mutace: v c.181T>G, c.3700_3704del5 a c.5266dupC, které tvoří přibližně 9 %, 13 % a 44 % všech BRCA1 identifikovaných mutací.(33,22)

Zakladatelský efekt mutací v genu BRCA2 v České republice je zřejmý pro mutace c.7913_7917del5 a c.8537_8538del2, který je ovšem častější na Moravě, kde tyto dvě mutace tvořily 41,5 % detekovaných mutací v genu BRCA2, než v Čechách, kde nebyly nalezeny vůbec. Spektrum mutací v genu BRCA1 je pro obě části národa téměř stejné.(10)

Přehled základních výsledků studií uvádím v tabulce 1.

Tabulka 1: Rekurentní a nově objevené mutace detekované v průběhu let 2001 - 2008 v České republice

rok	BRCA1	exon	R/N	BRCA2	R/N	exon
2001	3761_3762delGA	11	nové	5073_5074delCT	nové	11
	2616_2617insC	11	nové	6866delC	nové	11
2004	c.5266dupC	20	rekurentní	c.7910_7914del5	rekurentní	17
	c.3700_3704del5	11	rekurentní	c.8537_8538del2	rekurentní	20
	c.181T>G	5	rekurentní	c.6449_6450del2	nové	11E
	c.2881delA	11B	nové	c.6754dupT	nové	11E
				c.8169_8172dup4	nové	18
2005	c.5266dupC	20	rekurentní	c.5763	nové	11
	c.3700_3704del5	11C	rekurentní	c.3939delC	nové	11
	c.181T>G	5	rekurentní			
	c.1747A>T	11	nové			
2008	c.5266dupC	20	rekurentní	c.7913_7917del5	rekurentní	17
	c.3700_3704del5	11	rekurentní	c.8537_8538del2	rekurentní	20
	c.181T>G	5	rekurentní			

Z českých studií prováděných u českých pacientů, jak jsem shrnula výše, je zřejmé, že mutace c.5266dupC je jednou z nejčastěji detekovaných mutací u nás. Tento názor ještě podporují data uvedená v *Tabulce 2*, která mi byla poskytnuta panem MUDr. Eduardem Hájkem, klinickým onkologem z Polikliniky Medipont v Českých Budějovicích. Tato data neodhalovala jakékoli identifikátory, byla začerněna jména, rodná čísla a další, vše tedy bylo absolutně anonymní. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením. I v malém množství poukázala na nápadnou převahu mutace c.5266dupC. Mutace byla detekována u 8 ze 17 pacientů, tedy téměř u poloviny pacientů s mutací. Mutace jako c.3700_3704del5 a c.181T>G v genu BRCA1 se zde vyskytují pouze jednou.

Tabulka 2: Souhrn mutací detekovaných na pracovišti Poliklinika Medipont v Českých Budějovicích.

Gen	Mutace (podle HGVS)	exon	pohlaví
BRCA1	c.5266dupC	exon 20	muž
BRCA1	c.5266dupC	exon 20	žena
BRCA2	c.8591G>A	exon 19	muž
BRCA1	c.5266dupC	exon 20	žena
BRCA2	c.8591G>A	exon 19	žena
BRCA1	c.5266dupC	exon 20	žena
BRCA1	c.3700_3704del5	exon 11	žena
BRCA1	c.5266dupC	exon 20	žena
BRCA2	c.1296_1297delAG	exon 10	žena
BRCA2	c.1296_1297delAG	exon 10	žena
BRCA1	c.5266dupC	exon 20	žena
BRCA1	c.5266dupC	exon 20	žena
BRCA1	c.5266dupC	exon 20	žena
BRCA1	c.181T>G	exon 5	žena
BRCA2	c.3847_3848delGT	exon 11	žena
BRCA1	c.315T>A	exon 7	žena
BRCA1	c.2488_2497dup10	exon 11	žena

2 Cíle práce

- Cílem mé práce je shrnutí současných poznatků na dané téma.
- Optimalizace metody PCR ARMS pro zjištění mutace c.5266dupC v BRCA1 genu.
- Praktické zvládnutí izolace DNA z periferní krve a bukalního stěru a základních metod molekulární biologie jako je metoda PCR, gelová elektroforéza a analýza získaných dat.

3 Metodika

3.1 Izolace DNA

Každé PCR reakci a jakékoli jiné molekulárně biologické metodě vyžadující DNA musí předcházet izolace DNA. Izolace DNA je nejčastěji prováděna z lymfocytů periferní krve nebo bukalního stěru pacienta.

3.1.1 Bukální stěr

K izolaci genomové DNA z bukalního stěru posloužil DNA Isohelix DNA Isolation Kit: DDK-3/DDK-50 dle doporučení výrobce.

Reagencie

Lysis buffer LS

Proteinkinase K

Capture buffer CT

Re-hydration buffer TE

Postup

Před začátkem práce se pro jeden vzorek připravily tři 1,5 ml mikrozkušavky. Nastavila se suchá lázeň na 60 °C a Proteinkináza K byla vytažena z mrazáku, aby roztála při pokojové teplotě.

Do zkumavky s tamponem s bukálním stěrem se napipetovalo 500 μ l LS a poté se přidalo 20 μ l PK. Zkumavka byla krátce zvortexována a zcentrifugována a uložena na hodinu do suché lázně při 60 °C. Po vytažení opět krátce zvortexování a zcentrifugování. Následně se přepipetovalo 400 μ l vzorku do 1,5 ml mikrozkušavky. Tampon se otočil tak, aby byl vzhůru nohama a zkumavka se krátce zcentrifugovala. Vzniklý supernatant se přepipetoval k již odebraným 400 μ l vzorku. Poté se přidalo 500 μ l CT a vše se vortexovalo a centrifugovalo při 13 tisících otáčkách za minutu po 7 minut. Po centrifugaci se opatrně odebral supernatant (nesmělo dojít k porušení pelety DNA). Zkumavka byla opětovně zcentrifugována a byl opatrně odstraněn všechny zbylý supernatant. K peletě DNA se přidalo 30 – 150 μ l TE (množství je volitelné), ponechalo se k inkubaci při pokojové teplotě po dobu 5 minut a krátce se zvortexovalo. Dále se zkumavka centrifugovala po dobu 2 minut při 13 tis. ot./min a odebral se supernatant do nové 1,5 ml zkumavky. DNA se archivovalo v mrazicím boxu s teplotou -20 °C.

3.1.2 Plná krev

Izolace genomové DNA z plné krve se provádí pomocí Genomic DNA Mini Kitu dle přiloženého protokolu.

Reagencie

96% ethanol

GT Buffer

W1 Buffer

Wash Buffer

Elution Buffer

RBC Lysis Buffer

Postup

Na začátku se napipetovalo 300 μ l plné krve do označené 1,5 ml mikrozkušavky, přidáno se 900 μ l RBC Lysis Buffer a promíchalo se převrácením v ruce. Takto se směs inkubovala 10 minut při pokojové teplotě a následně se centrifugovala 5 minut při 3 tis. ot./min. Byl odstraněn supernatant a ponechána peleta. Ta se resuspendovala přidáním 100 μ l RBC Lysis Bufferu. Přidalo se 200 μ l GB Bufferu, zvortexovalo, krátce stočilo a inkubovalo se 10 – 15 minut v termostatu při 60 °C, kdy by měl být lyzát projasněný. Během inkubace se zkumavka převracela každé 3 minuty. Přidalo se 200 μ l 96% ethanolu, vortexovalo 10 s a centrifugovalo stolní centrifugou. Následovalo přepipetování lyzátu do mikrozkušavku na kolonku (GD Column), která se vložila do čisté sběrné zkumavky (2 ml Collection Tube) a centrifugovala se při 14 – 16 tis. otáčkách po dobu 5 minut. Po centrifugaci se kolonka přesunula do nové sběrné zkumavky (a použitá byla vyhozena). Na kolonku se napipetovalo 400 μ l W1 Bufferu a ve sběrné zkumavce centrifugovalo při 14 – 16 tis. otáčkách po 30 s. Ze sběrné zkumavky se odlila tekutina a na kolonku se přidalo 600 μ l Wash Bufferu a znovu se centrifugovalo při 14 – 16 tis. otáčkách/30 s. Ze sběrné zkumavky se znovu odlila tekutina, vrátila se do ní kolonka a takto se materiál zcentrifugoval při 14 – 16 tis. otáčkám po dobu 3 minut. Pokud byla kolonka suchá, přesunula se do připravené 1,5 ml mikrozkušavky a řádně se označila štítkem (se jménem a příjmením klienta, LIČ vzorku, datum izolace, iniciály toho, kdo izolaci provedl). Po té se přímo na filtr kolonky přidalo 100 μ l Elution Bufferu (vytemperovaného na 60 °C), inkubovalo se nejméně 3 minuty při pokojové teplotě a i se 1,5 ml označenou mikrozkušavkou centrifugovalo při 14 – 16 tis. otáčkách/30 s. Nakonec se uložila do lednice pro pozdější použití nebo do mrazicího boxu (-20 °C), ve kterém je DNA archivována.

3.2 Měření koncentrace a čistoty DNA (NanoDrop Implen)

V rámci prozkoušení vhodnosti použití periferní krve nebo bukalního stěru pro vyšetření, jsme koncentraci a čistotu v laboratoři dostupných vzorků DNA proměřovaly pomocí přístroje NanoPhotometer P 360.

Hodnoty koncentrace DNA jsou vyjádřené v ng/μl. Poměr absorbancí při 260 a 280 nm by se měl ideálně pohybovat mezi 1,8 – 2,0. Toto číslo klesá pod hodnotu 2, je-li vzorek znečištěný bílkovinami, které díky obsahu aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu absorbují více při 280 nm. Pokud je číslo vyšší než 2, znamená to přítomnost RNA. Ideální výsledek poměru absorbancí 260/230 se pohybuje okolo 2,0 – 2,2, nízké hodnoty poukazují na znečištění různými organickými látkami, vysoké spíše na špatný postup při měření.

Výsledky, které shrnuji v příloze č. 3, nedokázaly zásadní rozdíl v koncentraci mezi DNA izolovanou z periferní krve a DNA z bukalního stěru. Můžeme si ale povšimnout, že průměrná koncentrace DNA bukalního stěru (72,619 ng/μl) je vyšší než z periferní krve (47,738 ng/μl), naproti tomu je tato DNA zásadně více znečištěná bílkovinami a dalšími organickými látkami, což patrně vzniká v důsledku způsobu izolace takové DNA, kdy není použita kolonková metoda

3.3 Optimalizace metody PCR ARMS pro mutaci c.5266dupC v BRCA1 genu

Ruská studie (Sokolenko A. P. et al, 2006), která k identifikaci mutace c.5266dupC využila alelově specifickou PCR, byla inspirací pro náš vlastní experiment. Z této studie jsme převzali zejména sekvence primerů a PCR profil, který jsme se snažily dále optimalizovat pro naše účely.

3.4 Princip PCR ARMS

PCR ARMS je metoda principiálně založená na polymerázové řetězové reakci. Metoda využívá tři specifické primery. Jeden je společný pro obě varianty genu, tedy zdravou i mutovanou, druhý je specifický pro nemutovanou formu genu (tzv. wild-type allele) a třetí pro mutovanou formu genu (mutated allele). Reakce je založena na amplifikaci konkrétního úseku genomu pomocí těchto primerů ve dvou nezávislých reakcích obsahujících primery pro mutovanou formu genu a pro nemutovanou formu genu. Samotná PCR pak probíhá v několika cyklech sestávajících z denaturace, nasednutí primerů a samotné syntézy DNA. Tyto kroky se cyklicky opakují, aby byly původní molekuly dostatečně amplifikovány. Vzniklé produkty jsou detekovány pomocí gelové elektroforézy a vizualizovány pomocí příslušného detekčního systému.

V našem případě, kdy použijeme metodu PCR ARMS pro vyšetření mutace c.5266dupC dle Sokolenko et al. 2006, má výsledný PCR produkt velikost 168 bp. V případě zdravého jedince je zřetelný PCR produkt pouze v reakci s primerem pro wild-type alelu. U jedince s mutací v heterozygotní formě je na gelu možné vidět produkty jak v reakci s primerem pro wild-type alelu, tak i v reakci pro mutovanou alelu (obr. 2). V případě mutace v homozygotní formě by byl PCR produkt detekován pouze ve zkumavce s primery pro mutovanou formu genu.

Obrázek 2: Výsledek PCR ARMS pro mutaci c.5266dupC na elektroforetickém gelu



Zdroj: Sokolenko, 2006

3.4.1 Mutace c.5266dupC

Mutace c.5266dupC (podle tradiční BIC nomenklatury c.5382insC) je jednou z nejčastějších zakladatelských mutací detekovaných nejen v populaci Aškenázských židů ale i v celosvětovém měřítku. V důsledku stěhování jejich lidu na jiná místa Evropy, je tato mutace identifikována i v několika jiných zemích jako Rusko, Polsko, Česká republika a Litva, kde čítají 90 %, 60 %, 33 % a 50 % vyskytujících se mutací. (9)

Tato mutace způsobuje tzv. posun čtecího rámce, což má za následek vznik předčasného stop kodónu v exonu 24 (poslední exon genu), výsledkem je vznik nefunkčního proteinu (tzv. truncated mutation). (17)

3.4.2 PCR Mixy a příprava reakčních směsí

V rámci experimentální fáze jsme otestovali PCR reakční mixy od třech různých výrobců, které obsahovaly různý poměr složek. Patří do nich enzym Taq DNA polymeráza izolovaný z bakterie *Thermus Aquaticus*, reakční pufr, dNTP, hořčnaté ionty ve formě MgCl₂ a aditiva zabraňující inhibici PCR reakce a další stabilizátory a enhancery. Přesné složení reagentů výrobci z pochopitelných důvodů neuvádějí.

1. MyTaq™ Red DNA Polymerase (Bioline)

Reakční směs pro jednu reakci o celkovém objemu 50 µl obsahovala 10 µl 5x MyTaq Red Reaction Buffer 300-400 nM od každého z primerů, 1-2,5 U MyTaq Red DNA Polymerase, vstupní množství DNA do reakce se pohybovalo od 49 – 199,5 ng a reakce se doplnila do objemu 50 µl deionizovanou vodou (ddH₂O).

2. gb Basic PCR Master Mix (Generi Biotech)

Reakční směs o celkovém objemu 20 µl pro jednu reakci obsahovala 10 µl gb Basic PCR Master Mixu, 300-400 nM každého primeru, podle množství DNA (v µl) obsahovala reakce od 49 – 199,5 ng templátu a doplnila se do konečného objemu 20 µl ddH₂O.

3. HotStartTaq DNA Polymerase (Quiagen)

Reakční směs pro jednu reakci obsahovala 12,5 µl HotStart Master mix, 300-400 nM každého primeru, podle množství DNA (v µl) templátové obsahovala reakce od 49 – 199,5 ng/µl, a doplnila se do konečného objemu 20 µl ddH₂O.

3.4.3 Sekvence použitých primerů

Primer pro wild-type alelu je specifický pro zdravé jedince. Primer pro mutovanou alelu pro jedince s mutací a common primer je společný pro obě reakce.

wild-type alela 5'- AAGCGAGCAAGAGAATTCCAG-3'

mutovaná alela 5'- AGCGAGCAAGAGAATTCCCA-3'

common primer 5'- AGAACCTGTGTGAAAGTATCTAGCACTG-3'

Příprava reakční směsi pro PCR probíhala vždy ve sterilních podmínkách laminárního boxu v jednorázových rukavicích, pro znemožnění kontaminace vzorků i použitých chemikálií a za použití chladicího stojánku i v případě použití Hot- Star polymerázových kitů. Samotná amplifikace fragmentů DNA probíhala v gradientovém termocykleru Multigene Labnet Internacional (Labnet), který umožňuje použití několika různých teplot např. pro nasednutí primerů v rámci jednoho běhu.

3.4.4 Výchozí teplotní profil reakce

Počáteční denaturace	5 min	95 °C	
Denaturace	35 s	95 °C	
Annealing	60 s	65 °C	35 cyklů
Extenze	60 s	72 °C	
Závěrečná extenze	5 min	72 °C	
Hold - chlazení		14 °C	

Při pokusech optimalizovat metodu jsme využívaly tři možné PCR Mixy, měnily teplotu annealingu a přidávaly DMSO (dimethylsulfoxid), aditivum omezující vznik nežádoucích produktů.

3.4.5 Příprava a provedení gelové elektroforézy

Reagencie

Crystal 10xTBE Buffer – prášek

10x TBE – roztok připravený z Crystal 10xTBE Buffer dle doporučení výrobce

Pracovní roztok 1x TBE

Agarózové tablety* (1 tableta=0,5 g ararózy)

Midori Green Advanced DNA Stain*

100 bp DNA LADDER H3RTU*

DNA Loading Buffer Blue

* takto označené reagencie jsou součástí kitu: FastGene®Electrophoresis Reagent Kit (dodává Elisabeth Pharmacon)

Postup

Pro potřeby elektroforézy bylo nutné nejprve připravit pracovní roztok 1x TBE. Výměna TBE pufru v elektroforetické vaně je prováděna 1x za 14 dní.

Příslušný počet agarózových tablet se vložil do plastové kádinky o celkovém objemu minimálně 100 ml (1 tableta/50 ml = 1% gel, 2 tablety/50 ml = 2% gel, atd.). Přidalo se 50 ml/100 ml 1x TBE pufru (malý gel/velký gel). Tablety se nechaly úplně rozpustit a kádinka se vložila do mikrovlnné trouby. Zahřála se (maximální ohřev/3 min) minimálně dvakrát. Kontrolovalo se, aby gel nevytekl a agaróza se úplně rozpustila. Přidalo se 6 μ l barvy Midori Green Advanced DNA Stain a promíchalo se a nechalo krátce zchladnout. Připravila se elektroforetická podložka pro nalévání gelu a příslušné hřebeny. Gel se nalil do elektroforetické podložky a vložily se hřebeny. Gel se nechal ztuhnout ve tmě po dobu 10 – 15 minut. Z tuhého gelu se vyjmuly hřebeny a gel se vložil do elektroforetické vany s dostatečným množstvím 1x TBE pufru tak, aby hladina pufru byla nejméně 3 mm nad gelem.

Do první nebo poslední jamky se napipetovalo 5 μ l markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU (Obr. 3).

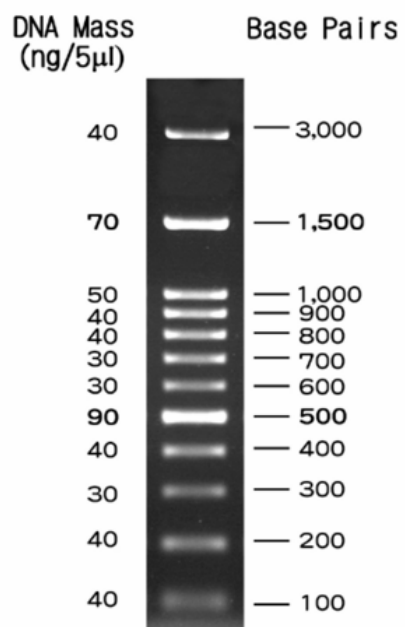
Elektroforéza se spustí na 10 – 15 minut při 100 – 135 V. Průběh elektroforézy je možné sledovat pomocí speciálního iluminátoru MupidTM LED Illuminator díky použité barvě Midori Green Advance DNA Stain.

Focení gelu je umožněno pomocí detekčního systému FastGene® GelPic LED Box.

Princip elektroforézy

Elektroforéza provádí separaci, identifikaci a purifikaci nukleových kyselin na základě jejich rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Nukleové kyseliny mají jednotný záporný náboj a tak je jejich elektroforetická mobilita závislá na jejich délce a konformaci. (46)

Obrázek 3: 100 bp DNA LADDER H3RTU



1.5 % TAE agarose gel

Zdroj: <http://www.nippongenetics.eu/>

4 Výsledky

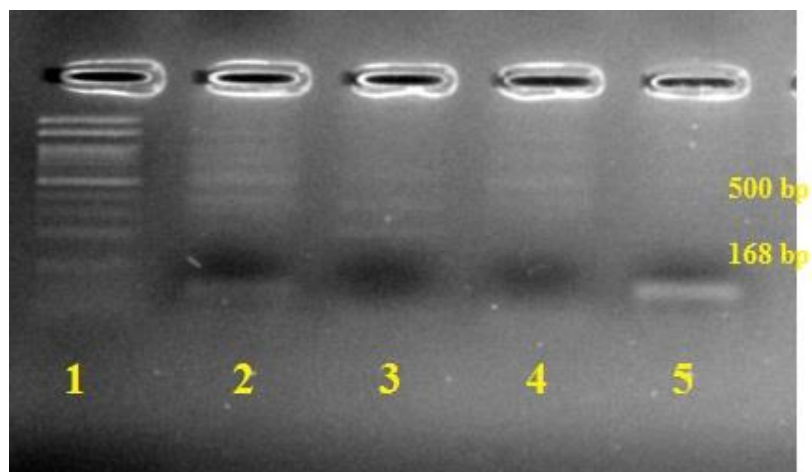
1. Reakce s PCR mixem MyTaq Red DNA Polymerase bez DMSO, kdy byl zachován původní protokol ze studie Sokolenko et al. 2006.

Teplota annealingu: 65 °C

Použití DMSO: NE

Koncentrace primerů 400nM

Vstupní množství DNA: Použita byla DNA zdravého jedince izolovaná z periferní krve (Z, vstupní množství DNA 99,75 ng) a izolát DNA jedince s mutací c.5266dupC (M, vstupní množství DNA 30 ng).



Pořadí vzorku na gelu:

1 - DNA Ladder

2 - zdravá DNA s primerem pro wild type alelu (**Z+wt**)

3 - zdravá DNA s primerem pro mutovanou alelu (**Z+m**)

4 - mutovaná DNA s primerem pro wild type alelu (**M+wt**)

5 - mutovaná DNA s primerem pro mutovanou alelu (**M+m**)

2. Reakce s PCR mixem MyTaq Red DNA Polymerase s DMSO

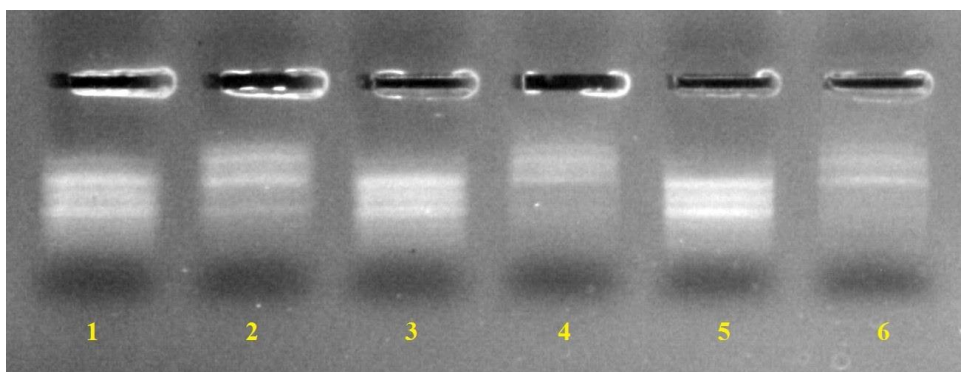
Teploty annealingu: 55 °C; 57,5 °C; 60 °C

Použití DMSO: 5%

Koncentrace primerů: 400 nM

Na gelu jsou zobrazeny pouze výsledky s primerem pro wild type alelu.

Použita byla DNA z periferní krve zdravého jedince (Z - 99,75 ng) a jedince s prokázanou mutací c.5266dupC (M - 30 ng).



Pořadí vzorků na gelu: 1 – Z+wt při 55 °C, 2 – M+wt při 55°C, 3 – Z+wt při 57,5 °C, 4 – M+wt při 57,5°C, 5 – Z+wt při 60°C, 6 – M+wt při 60°C

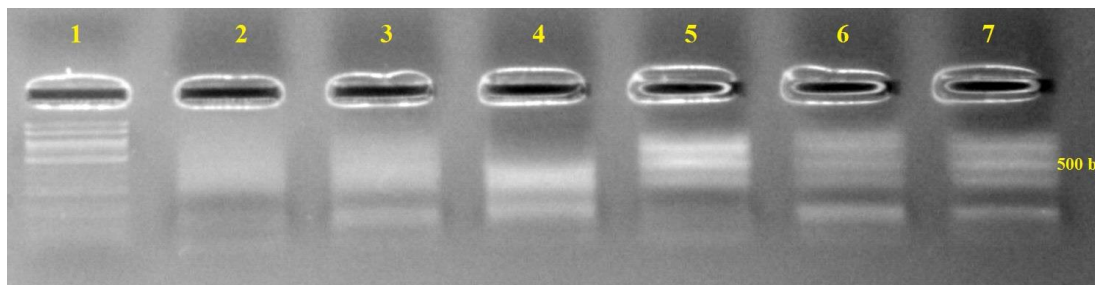
3. Reakce s PCR mixem MyTaq Red DNA polymerase s DMSO

Teploty annealingu: 61 °C, 63 °C, 65 °C

Použití DMSO: 5 %

Koncentrace primerů: 400 nM

Použita byla DNA z periferní krve zdravého jedince (Z - 199,5 ng) a jedince s mutací (M - 60 ng).



Pořadí vzorků na gelu: 1 – DNA ladder, 2 – Z+wt při 61 °C, 3 - Z+wt při 63 °C, 4 – Z+wt při 65 °C, 5 – M+m při 60°C 6 - M+m při 63 °C, 7 – M+m při 65 °C

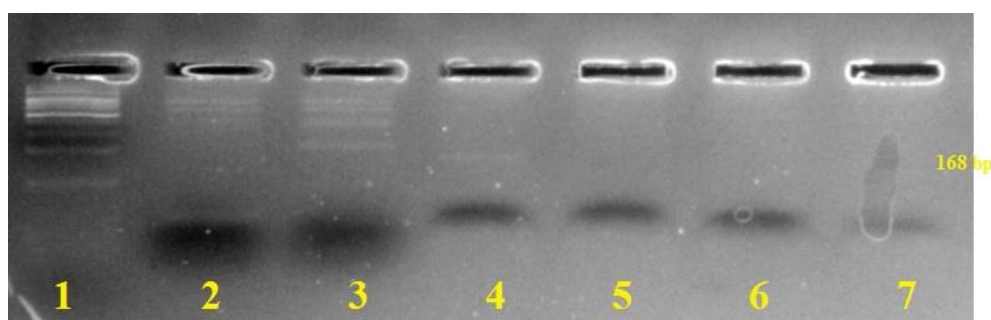
4. Reakce se třemi PCR mixy – MyTaq Red DNA polymerase, gb Basic PCR Master mix, HotStartTaq DNA Polymerase bez DMSO

Teplota annealingu: 64 °C

Použití DMSO: NE

Koncentrace primerů: 400 nM

Použita byla pouze DNA z periferní krve zdravého jedince (199,5 ng).



Pořadí vzorků na gelu: 1 – DNA Ladder, 2 – Z+wt s MyTaq, 3 – Z+m s MyTaq, 4 – Z+wt s gb Basic, 5 – Z+m s gb Basic, 6 – Z+wt s HotStarTaq, 7 – Z+m s HotStartTaq

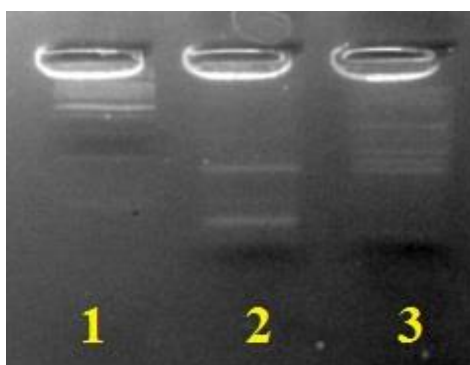
5. Reakce s PCR mixem gb Basic PCR Master mix bez DMSO

Teplota annealingu: 60 °C

Použití DMSO: NE

Koncentrace primerů: 300 nM

Použita byla DNA jedince s mutací (60 ng)



Pořadí vzorků na gelu: 1- DNA Ladder, 2 – M+wt, 3 – M+m

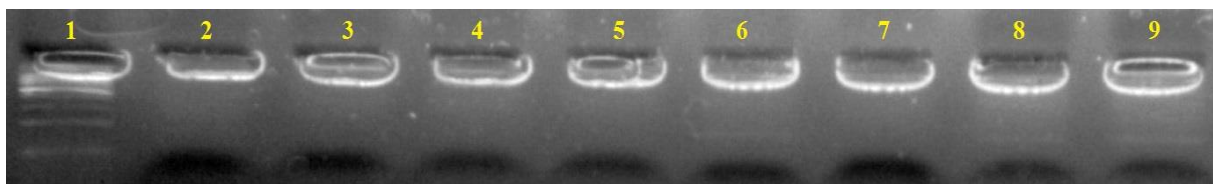
6. Reakce s PCR mixem gb Basic PCR Master mix s DMSO a bez DMSO

Teplota annealingu: 64 °C

Použití DMSO: 2 – 5 5%, 6 – 9 NE

Koncentrace primerů: 300 nM

Použita byla zdravá kontrola (Z - 133 ng) izolovaná z periferní krve a mutovaná DNA (M – 40ng).



Pořadí vzorků na gelu: 1 – DNA Ladder, 2 – Z+wt s DMSO, 3 – Z+m s DMSO, 4 – M+wt s DMSO, 5 – M+m s DMSO, 6 – Z+wt bez DMSO, 7 – Z+m bez DMSO, 8 – M+wt bez DMSO, 9 – M+m bez DMSO

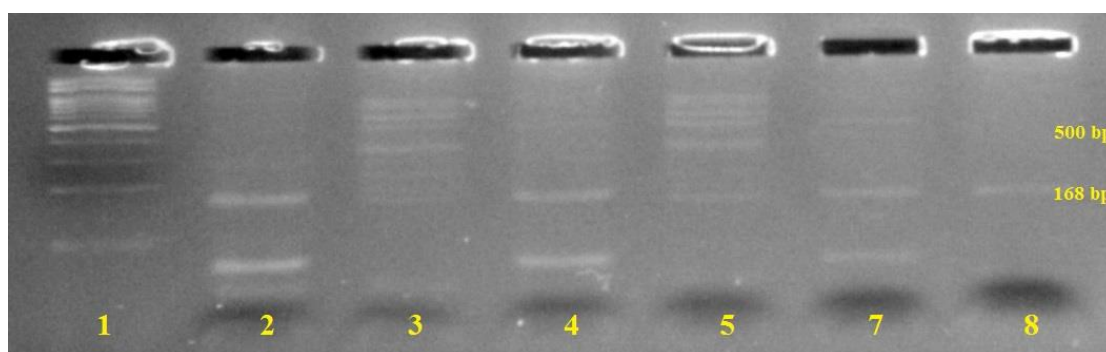
7. Reakce s PCR mixem gb Basic PCR Master Mix bez DMSO

Teploty annealingu: 61,6 °C; 63 °C; 64,3 °C

Použití DMSO: NE

Koncentrace primerů: 300 nM

Použita byla pouze zdravá DNA izolovaná z periferní krve (133 ng).



Pořadí vzorků na gelu: 1 – DNA Ladder, 2 – Z+wt při 62 °C, 3 – Z+m při 62 °C, 4 – Z+wt při 63 °C, 5 – Z+m při 63 °C, 7 – Z+wt při 64,3 °C, 8 – Z+m při 64,3 °C

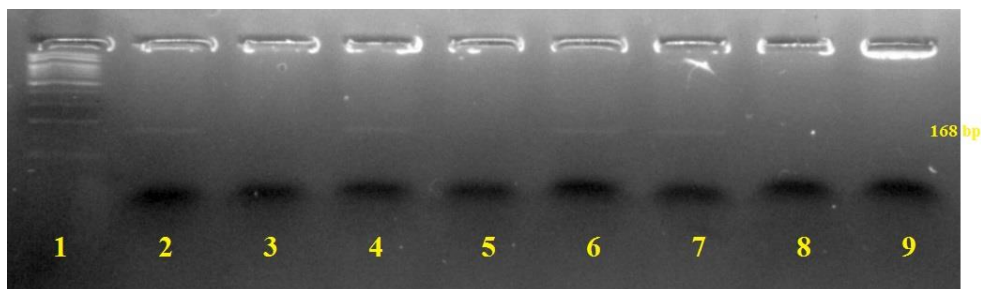
8. Reakce s PCR mixem gb Basic PCR Mater Mix bez DMSO

Teplota annealingu: 65,5 °C

Použití DMSO: NE

Koncentrace primerů: 300 nM

Použita byla DNA izolovaná z periferní krve dvou zdravých jedinců (Z1 – 134 ng, Z2- 104 ng), izolát DNA jedince s mutací (M – 40 ng) a negativní kontrola (NK).



Pořadí vzorků na gelu: 1 – DNA Ladder, 2 – Z1+wt, 3 – Z1+m, 4 – Z2+wt, 5 – Z2+m, 6 – M+wt, 7 – M+m, 8 a 9 - NK

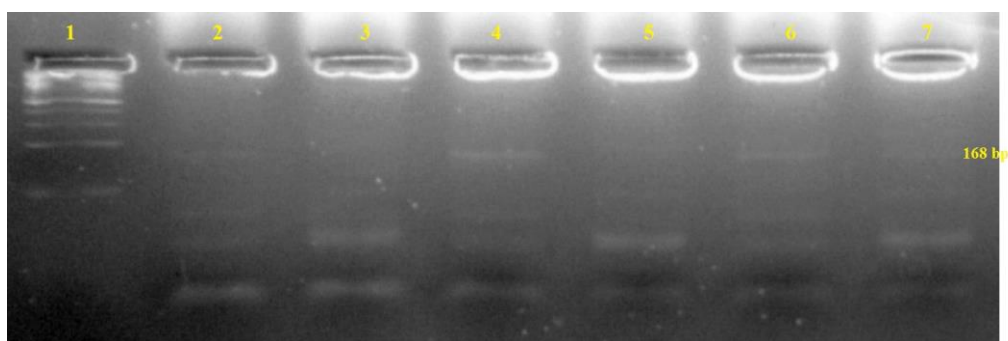
9. Reakce s PCR mixem gb Basic PCR Mater Mix bez DMSO

Teplota annealingu: 65,5 °C

Použití DMSO: NE

Koncentrace primerů: 300 nM

Použita byla DNA izolovaná z bukalního stěru dvou jedinců (Z1 – 28,5 ng, Z2 – 24,5 ng), izolát jedince s mutací (M – 20 ng)



Pořadí vzorků na gelu: 1 – DNA Ladder, 2 – Z1+wt, 3 – Z1+m, 4 - Z2+wt, 5 – Z2+m, 6 – M+wt, 7 – M+m

Diskuze

V experimentální části mé práce bylo cílem optimalizovat metodu PCR ARMS pro mutaci c.5266dupC v genu BRCA1. Tato mutace se v České republice vyskytuje u 44 % pacientů s mutací v genu BRCA1.(22) Pohlreich (2005) udává dokonce 51,4 %.(33)

V podmínkách laboratoře GENLABS s.r.o. jsme se snažili metodu optimalizovat pomocí tří různých komerčních PCR kitů a to MyTaqTM Red DNA Polymerase, gb Basic PCR Master Mix a HotStartTaq DNA Polymerase. Optimalizace reakcí s těmito PCR mixy byla provedena za přítomnosti či nepřítomnosti DMSO a za rozdílné teploty annealingu, dále byla upravována koncentrace primerů a vstupní množství DNA do reakce. Studie, kterou jsme se inspirovali při provedení experimentu (Sokolenko, 2006) uváděla jako nejvýhodnější teplotu annealingu 65 °C.

Přestože je MyTaqTM Red DNA Polymerase s DMSO i bez v laboratoři rutinně využívána pro jiná vyšetření, pro naše účely se prokázala jako nevhodná při jakékoli teplotě annealingu. Primery nasedaly nespecificky nebo vůbec a produkt tím pádem nebyl zřetelný. Hot StartTaq DNA Polymerase se stejně jako předchozí neosvědčila.

Nejlépeších výsledků bylo dosaženo s PCR mixem gb Basic PCR Master Mix bez přidání DMSO při teplotě 65,5 °C. Produkty byly hůře pozorovatelné, ale jejich specifická byla zřetelná. Dostali jsme se tedy nakonec na téměř stejnou teplotu anealingu jako v článku. Rozdíl teplot může být dávat i odlišnými termocyklery a odchylkami v teplotách, které mohou být až 2 °C.

Ačkoli při proměřování koncentrací a čistoty vzorků DNA izolované z bukálního stěru i periferní krve pomocí spektrometru Nanophotometer Implen, se zdála být aplikovatelnost obou matric téměř shodná, použití bukálního stěru pro vyšetření v podmínkách optimalizovaných pro izolát z periferní krve neposkytovalo jednoznačné výsledky a musí být dále upraveno. Optimalizaci metody PCR ARMS pro detekci této konkrétní mutace v genu BRCA1 v případě, že máme k dispozici DNA izolovanou z periferní krve pacienta, můžeme považovat za úspěšnou.

5 Závěr

Cílem mé práce bylo shrnutí aktuálních informací o dané problematice, genových mutacích, hereditární formě karcinomu prsu a vaječníků, genech BRCA1 a BRCA2, které jsou zodpovědné asi za 5 – 10 % karcinomů prsu a vaječníků a metodách jejich detekce.

V experimentální části jsem se zabývala praktickým zvládnutím izolace DNA z bukalního stěru a periferní krve, optimalizací metody PCR ARMS pro detekci mutace c.5266dupC v genu BRCA1.

Optimalizace metody se nám podařila s použitím PCR mixu gb Basic PCR Master Mix, bez přidání DMSO při annealingové teplotě 65,5 °C pro DNA získanou z periferní krve.

Tuto optimalizaci bude v budoucnu možné využít k cílené diagnostice nebo verifikaci této mutace v rámci rutinní praxe v laboratoři. Nezbytnou součástí zavedení tohoto vyšetření do rutinní praxe bude také její validace pro podmínky v laboratoři.

Závěrem lze říci, že se jedná o cílené vyšetření sice nejčastěji se vyskytující, ale pouze jediné mutace v konkrétním genu. To znamená, že negativní výsledek tohoto vyšetření neznamená, že se u pacienta nemůže vyskytovat jiná mutace v genu BRCA1 nebo v genu BRCA2. Pro kvalitní diagnostiku je tedy vhodnější využití moderních metod molekulární biologie jako je přímé nebo masivní sekvenování, které nám umožní testování celých genů.

6 Literatura

1. BRDLIČKA, R. *Genetika v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Galén, 2014, 126 s. ISBN 97880749210631
2. CIBIČEK, N. a VACEK, J. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014, s. 101
3. CIBULA, D. a PETRUŽELKA, L. *Onkogynekologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009, 614 s., s. 69-76, ISBN 978-802-4726-656
4. DRAŽAN, L., VESELÝ, J., HÝŽA, P., KUBEK, T., FORETOVÁ, L., COUFAL, O. *Chirurgická prevence karcinomu prsu u pacientek s dědičným rizikem*, Klin Onkol 2012, Č. 25, s. 78-83
5. EMERY, J., LUCASSEN, A., MURPHY, M. *Common hereditary cancers and implications for primary care*. Lancet, 2001; svazek 358, č. 9275, s. 56-63
6. EMQN (2007) *Best Practice Guidelines for Molecular Genetic Analysis in Hereditary Breast/Ovarian Cancer*.
Dostupné z: <http://www.emqn.org>
7. EVANS, D. G. et al. *Risk of breast cancer in male BRCA2 carriers*. J Med Genet 2010, č. 47, s. 710 – 711
8. FACKENTHAL, J. D., OLOPADE, O. I. *Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations*. Nat Rev Cancer. 2007, č. 7, s. 937–48

9. FERLA, R., CALÓ, V., CASCIO, S., RINALDI, G., BADALAMENTI, G. et al. *Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes*. *Annals of Oncology*, 2007, č. 18, s. 93-98
10. FORETOVÁ, L. et al. *Genetic and Preventive Services for Hereditary Breast and Ovarian Cancer in the Czech Republic*, *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 2006, č. 4, s. 3-6
11. FORETOVÁ, L., MACHÁČKOVÁ, E. et al. *BRCA1 and BRCA2 mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech republic*. *Human Mutation - Mutation in Brief*, 2004, č. 697
12. FORETOVÁ, L., NAVRÁTILOVÁ, M., MACHÁČKOVÁ, E. *Limitace genetického testování v onkologii*. *Klin Onkol*, 2009, roč. 22 (Suppl), s. 65 – 68
13. GARBER, J. E., OFFIT, K. *Hereditary cancer predisposition syndromes*. *J Clin Oncol*. 2005, svazek 23, č. 2, s. 276-292
14. GAYTHER, S.A., MANGION, J., RUSSELL, P. et al. *Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA 2 gene*. *Nat Genet*, 1997, č. 15, s. 103 – 105
15. GOETZ, P., FORETOVÁ, L., PUCHMAJEROVÁ, A. *Hereditární etiologie nádorových onemocnění a význam genetického poradenství a testování v onkologii*, *Klinická onkologie*, 2006, č. 19, s. 44-47
16. HAMEL, N. et al. *On the origin and diffusion of the BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations*, *European Journal of Human Genetics*, 2011, č. 19, s. 300-306
17. HOHENSTEIN, P., FODDE, R. *Of mice and (wo)men: genotype-phenotype correlations in BRCA1*, *Human molecular Genetics*, 2003, č. 12, s. 271-277

18. HRSTKA, R., KOLÁŘOVÁ, T., MICHALOVÁ, E., VOJTĚŠEK, B. *Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi*. Klin Onkol, 2014; roč. 27 (Suppl 1), s. 69-74
19. KOUBKOVÁ, L., VOJTĚŠEK, B., VYZULA, R. *Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi*. Klin Onkol, 2014, roč. 27 (Suppl 1): s. 61 – 68
20. KRŠKA, Z., HOSKOVEC, D., PETRUŽELKA, L. a kolektiv, *Chirurgická onkologie*. Grada Publishing a.s., Praha 2014, 904 s., s. 296, ISBN 978-80-247-4284-7
21. LYNCH, H. T., SHAW, T. G. and LYNCH, J. F. *Inherited predisposition to cancer: A historical overview*. American Journal of Medicinal Genetics, 2004, č. 129, s. 5-22
22. MACHÁČKOVÁ, E. et al. *Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer*, BMC Cancer, 2008. č. 8
23. MACHÁČKOVÁ, E. et al. *Genetická predispozice ke vzniku maligního nádoru prsu*. Klinická onkologie, 2006, roč. 19, s. 48-54
24. MACHACKOVA, E. et al. *Novel germline BRCA1 and BRCA2 mutation in breast and breast/ovarian cancer families from the Czech republic*, Human Mutation – Mutation in brief 2001, č. 459
25. MIKI, Y., SWENSEN, J., SHATTUCK- EIDENS, D. et al. *A strong candidate for the Breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science 1994, č. 266, s. 66-71

26. NAJMABADI, H. et al. *Amplification refractory mutation system (ARMS) and reverse hybridization in the detection of beta-thalassemia mutations*, Archives of Iranian Medicine, 2001 č. 4, s. 165-170
27. NEUHAUSEN, S. L. *Founder populations and their uses for breast cancer genetics*. Breast Cancer, 2000, č. 2, s. 77–81
28. NUSSBAUM, L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F., THOMPSON, J. a THOMPSON, M. W. *Klinická genetika: Thompson*. Vyd. 6, Praha: Triton, 2004, ISBN 80-725-4475-6
29. PALÁCOVÁ, M., et al. *Diagnostika nádorů prsu ve skupině rizikových žen – vlastní zkušenosti*. Klin Onkol 2012, č. 25, s. 96-98
30. PLEVOVÁ, P. et al. *Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií*. Klin Onkol, 2009, č. 22, s. 8-11
31. PLEVOVÁ, P., HLADÍKOVÁ, A. *Genetické poradenství u mužů nosičů mutací v genech BRCA 1 a BRCA 2*. Klin Onkol, 2012; roč. 25 (Suppl), s. 68
32. POLREICH, P., KLIEBL, Z., KLEIBLOVÁ, P., JANATOVÁ, M., SOUKUPOVÁ, J. et al. *Klinický význam analýz genů středního rizika pro hodnocení rizika vzniku karcinomu prsu a dalších nádorů v České republice*, Klin Onkol 2012, Č. 25, s. 59 – 66
33. POLREICH, P. et al *High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague*, Breast Cancer Research, 2005, č. 7, s. 728-736
34. RAMUS, S. J., GAYTHER, S. A., *The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer*. Mol Oncol. 2009, č. 3, s. 138–50

35. 34) ROGAN, P. K., FAUX, B. M., SCHNEIDER, T. D. *Information analysis of human splice site mutations*. Human Mutation, 1998, č. 12, s. 153 – 171
36. RUMUNAS, J. *Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for the hereditary breast-ovarian cancer prevention and control*. EPMA Journal, 2001, č. 1, s. 397-412
37. SHOKRALLA, S., SPALL, J. L., GIBSON, J. F. et al. *Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research*. Mol Ecol, 2012, č. 21, s. 1794–1805
38. SOKOLENKO, A. P. et al. *High frequency of BRCA 5382insC mutation in Russia breast cancer patients*. European Journal of Cancer, 2006, č. 42, s. 1380 – 1384
39. STRACHAN, T. a READ, A. P. *Human molecular genetics 3*. New York: Garland Press, 2004, xxv, 674 p. ISBN 08-153-4183-0.
40. ŠTĚPÁNKOVÁ, H., MACHÁČKOVÁ, E. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií. In: *XX. Jihočeské onkologické dny: Sborník přednášek – Diagnostika a léčba nádorů prsu*, 2013, s. 16-17. ISBN 978 – 80 – 905041-3-4
41. VAŠÍČKOVÁ, P., MACHÁČKOVÁ, E. et al. *High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangement in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in Czech Republic*, BMC Medical Genetics, 2007, č. 8
42. LALLOO, F., EVANS, D. G. *Familial breast cancer*, Clin Genet, 2012, č. 82, str. 105 – 114
43. VÍCHA, A., ECKSCHLAGER, T. *Využití MLPA techniky k průkazu genetických změn u neuroblastomu*, Klinická onkologie, 2008, č. 21, s. 149-153

44. VOSSSEN, R., ANTEN, E., ROOS, A., DUNNEN, J. *High-Resolution Melting Analysis (HRMA)-More Than Just Sequence Variant Screening*, Human Mutation, 2009 svazek 30, č. 6, s. 860-866
45. YOSHIDA, K., MIKI, Y. *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage*. Cancer Science, 2004, č. 95, s. 866-871
46. ZHOU, X., REN, L., MENG, Q. et al. *The next-generation sequencing technology and application*. Protein Cell, 2010, č. 1, s. 520–536
47. HALL, J. M. et al. *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. 1990, Science, č 250, s. 1684-89
48. MIKI, Y. et al. *A strong candidate for the Breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. 1994, Science, č. 266, s. 66-71
49. WOOSTER, R. et al. *Localisation of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. 1994, Science, č. 265, s. 2088-90
50. WOOSTER, R. et al. *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. 1995, Nature, č. 378, s. 789-792.

Internetové zdroje:

URL1: FÍNEK J. *Nádory vaječníků a vejcovodů* [online]. Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [cit. 2015-1-21]

Dostupné z: <http://www.linkos.cz/gynekologicke-nadory-c51-54-c56-57/nadory-vajecniku-a-vejcovodu/>

URL2: PETRÁKOVÁ K., VORLÍČEK J. O nádorech prsu [online]. Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [2015-1-21]

Dostupné z: <http://www.linkos.cz/nadory-prsu-c50/o-nadorech-prsu/>

URL3: ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ, Novotvary 2011 ČR [online]. [2015-2-3]

Dostupné z: <http://www.uzis.cz/publikace/novotvary-2011>

URL4: FORETOVÁ, L., MACHÁČKOVÁ E. *Zásady testování BRCA1/2 genů* [online]. Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [2015-4-12]

Dostupné z: <http://www.linkos.cz/cinnost-skupiny-1/zasady-testovani-brca1-2-genu/>

URL5: ATLAS OF GENETICS AND CYTOGENETICS IN ONCOLOGY AND HAEMATOLOGY, BRCA1 (breast cancer 1, early onset) [online]. [2015-4-12]

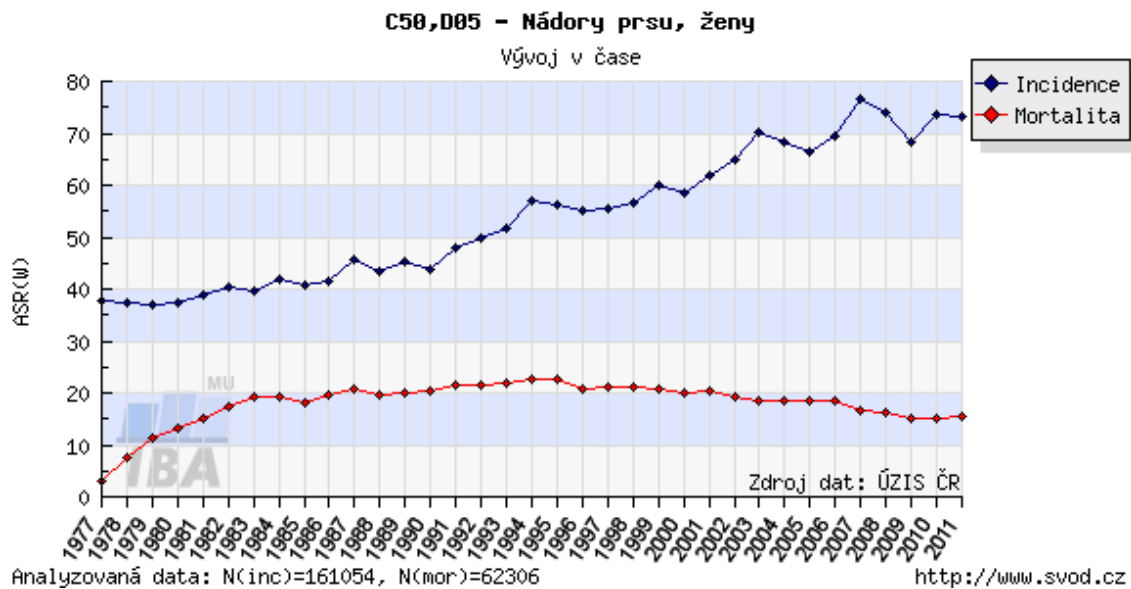
Dostupné z: <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/BRCA1ID163ch17q21.html>

URL6: SPOLEČNOST LÉKAŘSKÉ GENETIKY ČESKÉ LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI JANA EVANGELISTY PURKYNĚ, Stanovisko k testování BRCA1 a BRCA2 [online]. [2015-4-16]

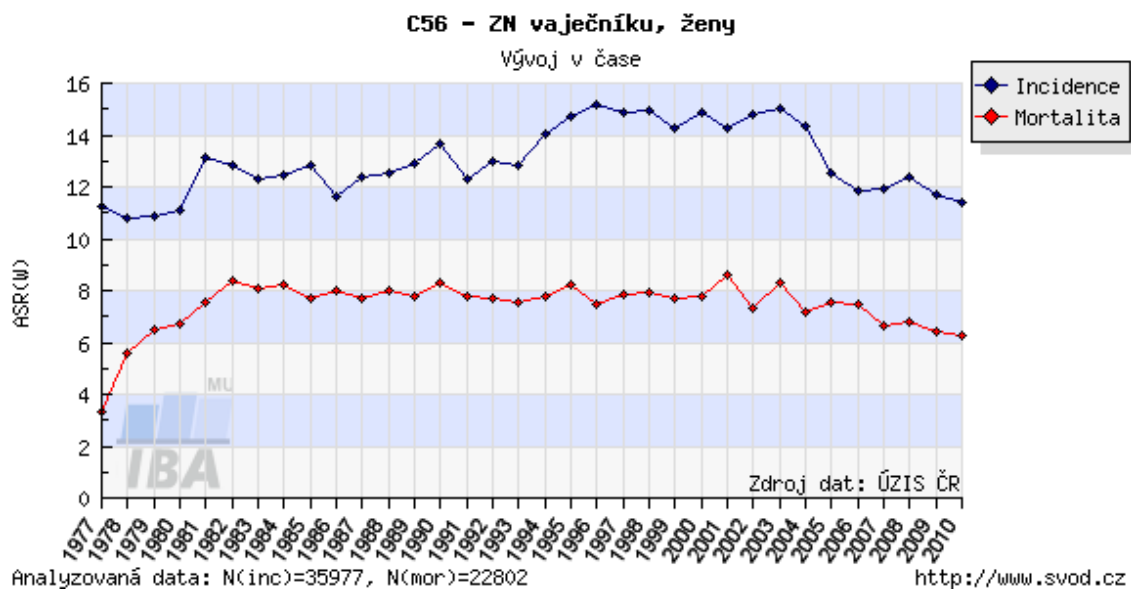
Dostupné z: <http://www.slg.cz/stanoviska>

Přílohy

Příloha 1: Časový vývoj incidence a mortality nádorů prsu



Příloha 2: Časový vývoj incidence a mortality nádoru vaječnicků



Příloha č. 3: Měření koncentrace a čistoty DNA pomocí přístroje NanoDrop Implen

Periferní krev				Bukální stěr			
číslo vzorku	ng/μl	260/280	260/230	číslo vzorku	ng/μl	260/280	260/230
1	19,5	1,625	1,857	1	172	1,759	0,855
2	26	1,857	2,476	2	51	1,342	0,363
3	35,5	1,732	0,91	3	85	1,616	0,783
4	67,5	1,8	2,015	4	53	1,493	0,914
5	52,2	1,825	2,122	5	293	1,729	0,954
6	48,5	1,732	1,366	6	51,5	1,661	1,338
7	158	1,842	2,072	7	80	1,702	0,762
8	74,5	1,84	2,069	8	11,5	1,853	2,556
9	67	1,836	2,161	9	260	1,365	0,677
10	54,5	1,787	1,946	10	229	1,409	0,568
11	55	1,864	2,391	11	20,5	1,323	0,586
12	52	1,677	1,351	12	39,5	1,646	0,868
13	73,5	1,815	2,162	13	122	1,736	0,835
14	83	1,804	1,976	14	178	1,7	0,71
15	35	1,795	1,458	15	30	1,714	1,875
16	27,5	1,833	1,667	16	38,5	1,674	0,987
17	25,5	1,7	0,879	17	28,5	1,629	1,781
18	73,5	1,75	1,028	18	21,5	1,654	2,636
19	103	1,708	1,273	19	24,5	1,75	1,69
20	43,5	1,813	1,74	20	53	1,726	1,286
21	20	1,818	1,739	21	29	1,568	1,611
22	78,5	1,847	2,151	22	47,5	1,696	0,88
23	74	1,85	2,242	23	102	1,706	0,781
24	60	1,791	1,579	24	10	1,818	
25	62,5	1,812	2,232	25	44	1,63	0,989
26	13	1,733	2,364	26	38	1,583	0,567
27	22,5	1,8	3,75	27	18	1,44	
28	49	1,782	2,178	28	102	1,759	0,745
29	66,5	1,822	2,18	29	101	1,656	0,743
30	47,5	1,827	2,209	30	43	1,654	0,589
31	67	1,836	2,094	31	10	1,538	
32	29,5	1,788	1,788	32	63,5	1,716	0,92
33	50,5	1,804	1,578	33	15,5	1,632	
34	28,5	1,839	2,591	34	87,5	1,786	0,795
35	48	1,846	2,286	35	60	1,739	1,224
36	66,5	1,797	2,111	36	92	1,72	1,017

37	24	2,087	2,182	37	18	2	
38	10	2,222	1,25	38	16,5	1,737	
39	17,5	2,059	2,692	39	98	1,735	1,248
40	20,5	1,783	1,783	40	52,5	1,4	0,656
41	24	1,92	1,655	41	100	1,667	0,58
42	38,5	1,925	2,265	42	60	2,182	2,182
43	38	1,854	2,171				
44	31	2,067		průměr	72,619	1,663	1,071
45	21	1,826	1,68	maximum	293	2,182	2,636
46	50	1,786	3,333	minimum	10	1,323	0,363
47	11	1,833	1,375				
průměr	47,738	1,830	1,965				
maximum	158	2,222	3,75				
minimum	10	1,625	0,879				