

Hereditárne onkologické syndrómy: mutácie v DNA a diagnostické techniky genetického testovania

Mgr. Lenka Dolešová¹, prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.¹, doc. MUDr Daniel Böhmer, PhD.¹, RNDr. Katarína Závodná, PhD.², Mgr. Ján Markus, PhD.², RNDr. Michal Konečný, PhD.²

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava, Bratislava

²Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

Variety DNA rozdeľujeme podľa rôznych kritérií jednak na základe ich typu či klinického významu, t. j. vplyvu na funkčnosť proteínu, respektíve vznik ochorenia, alebo podľa lokalizácie v kódujúcej sekvencii génu. Identifikácia variantov DNA predstavuje v rámci klinických laboratórnych postupov základný spôsob diagnostiky genetických ochorení, pričom za týmto účelom bolo vyvinutých niekoľko rôznych prístupov a metód, ktoré sa historicky výrazne menili a vyvíjali. V našom príspevku sa zameriavame na identifikáciu variantov DNA z pohľadu onkogenetickej DNA diagnostiky a onkologických chorobných jednotiek, najmä pri hereditárnom karcinóme prsníka a ovárií (HBOC). Všeobecne možno tieto postupy rozdeliť na základné kroky: izolácia a purifikácia DNA/RNA molekuly, zrnženie, respektíve amplifikácia cieľových sekvencií analyzovaných génov a samotná analýza prítomnosti variantov DNA v týchto amplifikovaných fragmentoch. Výsledky DNA diagnostiky majú následne za cieľ identifikovať predispozíciu na nádorové ochorenie, t. j. rizikových pacientov či zdravých jedincov. Následne zostaviť špecifické dispenzarizačné preventívne programy, a teda snažiť sa predchádzať vzniku onkologického ochorenia. V prípade pacientov s nádorovým ochorením pomáha DNA diagnostika k ich personalizovanej liečbe alebo využitiu preventívnych profylaktických výkonov.

Kľúčové slová: DNA varianty, izolácia DNA, PCR amplifikácia, sekvenčná analýza.

Hereditary oncological syndromes: DNA mutations and diagnostic techniques of genetic testing

DNA variants may be dissociated according to many criteria, based on the type, clinical effect – impact to the function of the protein and onset of the disease, or according to its localization in coding sequence of the gene. Identification of DNA variants is basic method in the clinical laboratory practice in diagnosis of genetic diseases, and for this reason there are number of different approaches and methods that are historically significantly changed and evolved. In this paper, we focus on the identification of DNA variants in terms of DNA diagnostics of oncology units, especially hereditary breast and ovarian cancer (HBOC). In general these procedures considered of the following basic steps: DNA/RNA molecules isolation and purification, amplification of target sequences of analysed genes and analysis of the presence of DNA variants in these amplified fragments. The results of DNA diagnostics are the named at identifying predisposition to cancer of risk patients and healthy individuals. Then set up specific dispensarisation prevention programs, and thus prevent the occurrence of cancer. In patients with cancer promotes DNA diagnostics on their personalized therapy or preventive prophylactic surgery intervention.

Key words: DNA variants, DNA isolation, PCR amplification, sequencing analysis.

Onkológia (Bratisl.), 2015; roč. 10(2): 90–95

Zloženie molekuly DNA a rozdelenie mutácií

James Watson, Francis Crick a Maurice Wilkins v roku 1953 determinovali štruktúru deoxyribonukleovej kyseliny – DNA. Molekula DNA je základ dedičnosti a obsahuje informácie pre konštrukciu proteínov, respektíve rôznych enzýmov zahrnutých v bunkových procesoch, pričom kódujúci úsek sekvencie DNA sa nazýva gén. Molekula DNA je zložená z dvoch reťazcov, ktoré sú viazané na základe komplementarity medzi bázami (nukleotidmi), t. j. medzi adenínom (A) a tymínom (T), respektíve guanínom (G) a cytozínom (C). Nukleotidy predstavujú základné stavebné jednotky, pričom vytvárajú dvojzávitnicovú štruktúru. Trojica nukleotidov definuje kodón (triplet) a zároveň určuje

zaradenie konkrétnej aminokyseliny v sekvencii proteínu (1).

DNA v bunke obsahuje veľké zastúpenie nekódujúcej sekvencie (98 %), pričom jedným z príkladov sú intróny génov, ktoré sú v procese transkripcie do mRNA vyštiepené v presne definovaných štiepných miestach. Okrem intronických sekvencií sa v DNA nachádza aj junk DNA (nekódujúca sekvencia), pri ktorej nie je známa jej funkcia alebo regulátorové oblasti DNA, ktoré predstavujú najmä promótorové sekvencie, sekvencie pre regulačné miRNA alebo sekvencie, ktoré môžu byť transkribované do nekódujúcej RNA (tRNA, rRNA). Micro RNA predstavujú skupinu malých endogénnych nekódujúcich RNA molekúl, ktoré regulujú génovú expresiu prostredníctvom degradá-

cie cieľových mRNA molekúl alebo procesom translačnej represie (2).

Molekula DNA môže obsahovať rôzne štruktúralne zmeny nazývané mutácie (varianty), ktoré sa môžu nachádzať v heterozygótnej, t. j. mutácia je prítomná v jednej kópii alebo homozygótnej forme, kedy je prítomná v oboch kópiách sledovaného génu. V tejto práci sme sa zamerali na genetické testovanie syndrómu HBOC konkrétne *BRCA1/2* génov, a to z dôvodu, že analýza prebieha v celej kódujúcej sekvencii vzhľadom na neprítomnosť typických hot-spot miest so zvýšeným výskytom mutácií. Ďalším dôvodom bola rovnomerná prítomnosť rôznych typov DNA variantov, a to aj z hľadiska klinického efektu.

Prítomné DNA mutácie nemusia mať vplyv na štruktúru a funkciu proteínu, pričom iné ju môžu zásadne meniť. Varianty typu substitúcií spôsobujú zmenu jedného nukleotidu za iný, čo môže spôsobiť napríklad zmenu v kodóne, ktorý následne kóduje inú aminokyselinu, čo vedie až k zmene v proteínovom produkte. Tieto alterácie sú označované ako varianty meniace zmysel, tzv. missense mutácie. Ak nedochádza k zámene kodónu, respektíve aminokyseliny, funkcia proteínového produktu ostáva zväčša nezmenená, vtedy hovoríme o tzv. tichých (silent) mutáciách. Ďalším typom variantu môže byť zámena, ktorá vedie k predčasnému zaradeniu terminačného STOP kodónu, čo následne spôsobuje tvorbu skrátenej, prípadne nefunkčnej formy proteínu. Iné mutácie typu inzercii/delácií vedú k zaradeniu extra nukleotidu alebo, naopak, spôsobujú stratu jedného či viacerých nukleotidov v reťazci DNA. Označujú sa ako posunové (frameshift) mutácie a spôsobujú posun čítacieho rámca, a teda vedú k zmene štruktúry a funkcie proteínu, respektíve zaradeniu predčasných terminačných kodónov. Štandardne vedú STOP kodóny k ukončeniu translácie mRNA do proteínu, avšak v prípade predčasne zaradených terminačných tripletov dochádza k narušeniu štruktúry proteínu, k zníženiu alebo strate jeho funkcie či jeho úplnej absencii v bunkových procesoch (3).

Varianty DNA na základe ich klinického efektu klasifikujeme na patologické varianty, varianty s neznámym klinickým efektom (VUS) a benígne varianty. Patologické mutácie majú klinický dosah a korelujú so zvýšeným rizikom vzniku nádorového ochorenia, pričom sú charakteristické vysokou penetranciou. Výsledkom je vznik skrátenej, nefunkčnej formy proteínu. Varianty s neznámym klinickým efektom, pri ktorých je potrebné objasnenie ich významu na predikciu rizika vzniku karcinómu, a to na základe viacerých prístupov, ako napríklad segregáčna analýza v rodine, *in silico* predikcia pomocou predikčných softvérov, detekcia variantu v populácii zdravých kontrol, identifikácia LOH v tumore v mieste lokalizácie variantu a iné. Tretiu skupinu predstavujú benígne varianty, ktoré sa vyskytujú pomerne často. Niektoré z nich sa nazývajú polymorfizmy DNA, v prípade, ak sa vyskytujú vo frekvencii viac ako 1 %. Benígne varianty sa často vyskytujú aj u zdravých jedincov a nemajú klinicko-patologický efekt (4).

Regióny niektorých génov obsahujú hustú oblasť repetitívnych DNA elementov, ktoré môžu viesť ku genetickej instabilite. Relatívne vysoká frekvencia výskytu mutácií typu veľkých genómových prestavieb (LGRs) napríklad v géne

BRCA1 existuje práve v dôsledku akumulácie *Alu* sekvencií. Veľké genómové prestavby vznikajú ako dôsledok homologickej rekombinácie napríklad s pseudogénom a taktiež mechanizmom tzv. nehomologického spájania koncov (5).

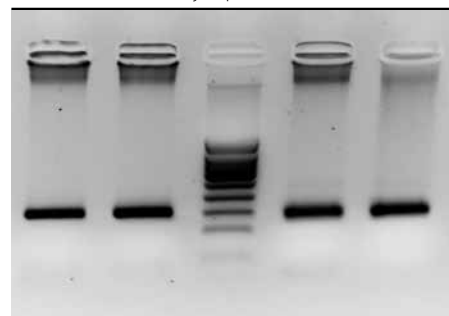
Izolácia DNA z bunkových štruktúr

Z diagnostikovaných vzoriek je primárne dôležité získať molekulu DNA ako templát na ďalšie analyzačné postupy. Izolácia a purifikácia DNA prebieha prostredníctvom rôznych prístupov, pričom historicky a principiálne môžeme izolácie postupy rozdeliť na vysoľovacie izolácie techniky, kolónkové metódy alebo techniky využívajúce magnetické partikuly. Uvedené prístupy sa využívajú na izoláciu DNA z rôznych tkanív, napríklad bunkových kultúr, plnej krvi, krvného séra či plazmy, natívných alebo fixovaných nádorových tkanív alebo iných telových tekutín, napríklad bunkové stery z bukálnej sliznice.

Vysoľovacia DNA izolačná metóda je založená na použití nasýtených roztokov anorganických solí (NaCl) do koncentrácie nasýtenia, pričom v prvom kroku dochádza k rozrušeniu bunkových membrán a štruktúr, t. j. k lýze buniek a až následne k samotnému vyvráždaniu DNA (6). Historicky sa tieto postupy používali ako prvé a viedli k izolácii obrovského množstva, respektíve koncentrácie DNA, až 1 000 ng/μl, avšak často s veľmi nízkou čistotou (puritou), čo následne komplikovalo ďalšie diagnostické postupy.

Kolónkové metódy sú založené na purifikácii DNA na základe väzby tejto molekuly na membránu kolónky za použitia premývacích roztokov a opakujúcej sa centrifugácie vzorky, pričom opäť v prvom kroku dochádza k lýze buniek. Tieto metódy izolácie majú v súčasnosti najväčšie rozšírenie, pričom zabezpečujú relatívne stabilné, aj keď nižšie výťažky DNA, okolo 100 – 300 ng/μl a pomerne kvalitnú puritu DNA (1,6 – 1,9). V súčasnosti sa však čoraz častejšie dostávajú do popredia metódy izolácie využívajúce magnetické partikuly, a to najmä z dôvodov nepoužívania centrifugácie a možnosti automatizácie pomocou izolačných robotických staníc. Pri magnetickej metóde izolácie je DNA viazaná na povrch magnetických guľôčok, pričom ostatné zložky sa nachádzajú v roztoku a sú postupne odstraňované. Použitie týchto metód je spravidla pomerne náročné na kvalitu vstupného materiálu, pričom výťažky izolovanej DNA sú pomerne nízke 50 – 200 ng/μl, avšak postačujúce na ďalšie analýzy. Na druhej strane purita vyizolovanej DNA je vysoká a pomerne uniformná.

Obrázok 1. Vizualizácia PCR fragmentov pomocou elektroforetickej separácie



Všeobecne možno povedať, že DNA izolačné metódy vychádzajú zo základných princípov, ako je lýza bunkových membrán a partikul, štiepenie a odbúravanie nepotrebných bunkových proteínov pomocou enzýmov a následná elúcia molekúl DNA. Pre kontrolu kvality izolačného procesu, ako aj pre nutnosť ďalších analýz sa po izolácii DNA kvantifikuje (koncentrácia, purita) pomocou rôznych prístupov, či už fluorescenčných alebo elektronických (Nanodrop, Q-bit) (6).

Molekula RNA má úlohu najmä pri syntéze proteínov. Aj keď bolo navrhnutých množstvo metód na analýzu RNA, ich presnosť a efektívnosť je značne limitovaná. Jednou z nevýhod RNA analýzy je jej nestabilita najmä v dôsledku prítomnosti RNáz, ktoré molekulu degradujú. Využívaná je primárne na analýzu génovej expresie, detekciu štiepných miest pri zozbieraných mutáciách alebo RNA sekvenčnú analýzu (RNA-Seq) pomocou prístrojov sekvenovania novej generácie. RNA-Seq je prístup vhodný na profilovanie a kvantifikáciu RNA transkriptov, takisto na identifikáciu alternatívnych zozbieraných miest, určenie alelovo-špecifickej expresie alebo detekciu vzácných či nových transkriptov. RNA je analyzovaná ihneď po prepise do cDNA a využíva sa napríklad pri technikách RNA interferencie, fluorescenčnej *in situ* hybridizácii, real-time PCR metóde, Northern blote alebo pri použití DNA čipov (7).

Zmnoženie cieľovej časti génu

Na identifikáciu jednotlivých DNA variantov sa nielen v onkogenetike, ale aj všeobecne využívajú rôzne typy detekčných metód. Prvým krokom na začatie detekcie DNA variantov je však dostatočné namnoženie sledovaného úseku génu pomocou PCR amplifikácie, tzv. polymerázovej reťazovej reakcie. Amplifikácia jednotlivých fragmentov prebieha s využitím špecifických primerov, ktoré nám ohraničujú sledovaný úsek DNA, termostabilnej Taq DNA polymerázy, a najmä využitím opakujúcich sa cyklov (30- až 40-krát) za rôznych teplotných podmienok. Základná štruktúra PCR pro-

Tabuľka. Porovnanie jednotlivých priamych a nepriamych detekčných metód

Metóda	Princíp	Výhody	Nevýhody
PTT	analýza dĺžky PCR produktov	vysoká citlivosť, cena	rádioaktívne značenie, detekcia iba delečných mutácií
SSCP	mobilita ssDNA v nenedaturačných podmienkach	detekcia všetkých typov mutácií, cena	nízka citlivosť, manuálna prácnosť
DHPLC	detekcia heteroduplexov na chromatografickom nosiči za čiastočne denaturačných podmienok	vysoká citlivosť, detekcia širokého spektra mutácií, cena	náročná validácia
HRM	topenie amplifikovaného PCR templátu, rozdiely v priebehu kriviek topenia PCR fragmentov	rýchlosť, citlivosť, cena	štandardizácia, prítomnosť viacerých typov mutácií v jednom fragmente
MLPA	multiplexná hybridizácia špecifických prôb, amplifikácia sekvencie DNA, kapilárna elektroforéza	rýchlosť, citlivosť, cena	manuálna prácnosť, náročnosť na kvalitu DNA
Sekvenčná analýza	inkorporácia rôzne značených ddNTP, kapilárna elektroforéza	citlivosť, kvalita, detekcia všetkých typov mutácií	manuálna prácnosť, hodnotenie analýz
SNaPshot analýza	nasadenie primerov pred miesto DNA variantu, inkorporácia ddNTP, terminácia reakcie	citlivosť, cena, hodnotenie, multiplexovanie	mutačne špecifická metóda, manuálna prácnosť
NGS sekvenčné prístupy			
NGS – GS Junior	zmena v emitácii svetla, multiplexná PCR, ligácia špecifických adaptorov, emulzná PCR, pyrosekvenovanie	robustnosť, citlivosť	kapacita, emulzná PCR, homopolymérne sekvencie, cena
NGS – Ion Torrent	zmena pH signálu po inkorporácii nukleotidu pri syntéze DNA, emulzná PCR, modifikácia pyrosekvenovania	cena, citlivosť	homopolymérne sekvencie, emulzná PCR, náročná štandardizácia, nutné bioinformatické spracovanie
NGS – Illumina	sekvenovanie na báze syntézy, na platničke s ligovanými primermi, ktoré viažu ssDNA, pridávanie adaptorov	cena, rýchlosť, citlivosť, kapacita	GC bohaté DNA sekvencie, nutné bioinformatické spracovanie
Nanopórové sekvenovanie	detekcia signálu v póre počas enzymatických reakcií	rýchlosť, kapacita	cena, zacielenie na určité typy mutácií

gramu využíva iniciálnu denaturáciu vzorky pri 92 – 95 °C. Nasleduje cyklus denaturácie (95 °C), nasadenia, resp. annealingu primerov (sekvenčne špecifická teplota 53 – 65 °C) a polymerizácie sekvencie medzi primermi pomocou Taq DNA polymerázy (72 °C). Po ukončení stanoveného počtu cyklov nasleduje finálna polymerizácia vzorky zväčša pri 72 °C a schladenie, respektíve deaktivácia reakcie pri 4 – 15 °C.

Primery sú sekvenčne špecifické syntetické oligonukleotidy s dĺžkou 18 – 25 bp, ktoré sú navrhnuté približne 50 bp od začiatku a 50 bp za koncom kódujúcej jednotky génu, tzv. exónu. Pritom do každej PCR reakcie sa pridáva minimálne jeden pár primerov, jeden primer sadá na DNA v smere forward (5'-3') a druhý v smere reverse (3'-5'), a tak spolu ohraničujú analyzovaný úsek. Pri dizajne primerov je potrebné dodržať niekoľko základných pravidiel: primery využívané v jednej reakcii by mali mať podobnú teplotu topenia (annealingu), čo najmenšie zastúpenie GC párov, nemali by tvoriť sekundárne štruktúry

(hairpin a selfdimer), nedochádza medzi nimi k párovaniu báz (selfcomplementarity). Tieto nežiaduce primerové štruktúry totiž môžu mať za následok zníženie účinnosti PCR reakcie, respektíve jej nefunkčnosť. Sekvencia primerov by mala byť absolútne špecifická k jednej oblasti v DNA, aby nedochádzalo k tvorbe nešpecifických PCR produktov. Na dosiahnutie tohto základného cieľa sa pri dizajne primerov využíva porovnanie so sekvenciou jednotlivých génov v online prístupných databázach, respektíve pomocou rôznych voľne prístupných softvérov (8).

Na overenie kvality namnoženia jednotlivých PCR fragmentov sa využíva elektroforetická separácia v agarózovom géle a elektrickom poli, ktorá prebieha na základe pohyblivosti záporne nabitých DNA molekuly k anóde. Na vizualizáciu PCR fragmentov sa následne využívajú rôzne interkalačné farbivky (napríklad EtBr, komerčné fluorescenčné farbivky), štandard molekulej hmotnosti a UV svetlo (obrázok 1). Fragменты môžu byť analyzované aj kvantitatívne, kedy sa porovnávajú s komerčným kvan-

tifikovaným štandardom molekulej hmotnosti (ladder), pričom intenzita jednotlivých prúžkov (bandov) je merateľná pomocou špecifických softvérov. Koncentrácia PCR produktov závisí od účinnosti PCR amplifikácie, respektíve kvalitatívne posúdenie môže určovať mieru degradácie DNA alebo kontaminácie vzorky (9). Využitie rôznych detekčných elektroforetických softvérov, samozrejme, umožňuje aj archiváciu jednotlivých PCR amplifikácií.

Nepriama diagnostika DNA variantov

Determinácia DNA alel (markerov), ktoré vykazujú väzbu s ochorením, sa nazýva aj nepriama diagnostika, a to najmä vzhľadom na fakt, že nedeterminuje DNA varianty priamo, ale odhaduje ich prítomnosť na základe väzby s iným markerom, respektíve na základe fyzikálnej zmeny analyzovaného PCR fragmentu (počtu, zmeny mobility). Nepriame diagnostické metódy najčastejšie využívajú zmenu fyzikálnych vlastností PCR produktov, respektíve DNA v rôznom prostredí, napríklad denaturačné podmienky, zmeny teploty, zmeny konformácie či počtu bandov. Na nepriamu detekciu variantov DNA sa využívajú rôzne typy metód, avšak v súčasnosti sa väčšina z nich prakticky používa už len zriedkavo.

Výhodou nepriamych diagnostických metód bola najmä ich finančná nenáročnosť a skriningový charakter (dôkaz akýchkoľvek zmien v PCR produktoch pri viacerých vzorkách), naopak, nevýhodami boli pomerne veľká manuálna prácnosť, problémová reproducibilita a pomerne nízka špecifita a senzitivita.

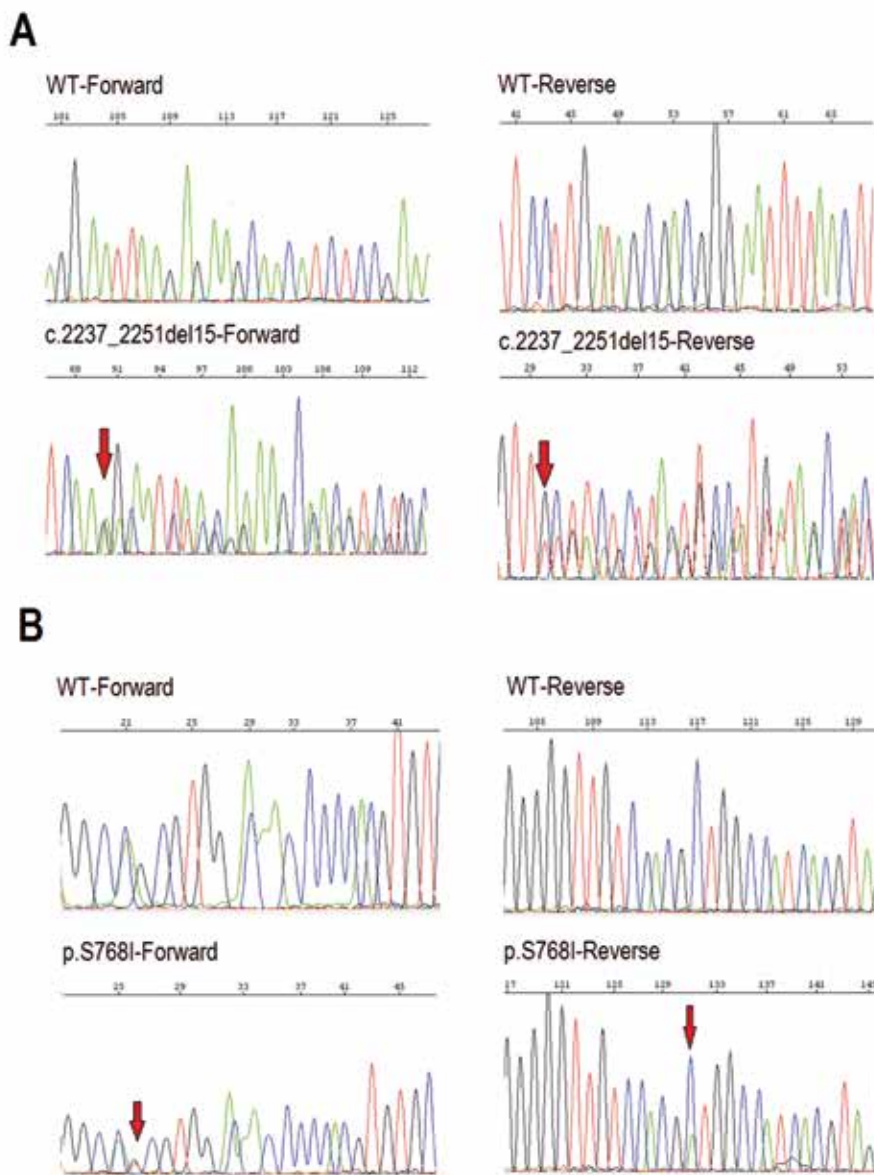
Protein Truncation Test (PTT) je rýchla skriningová metóda na detekciu bodových génových mutácií, najmä tých skraccujúcich proteín, t. j. vedúcich k inkorporácii predčasného STOP kodónu, pričom metóda je založená na analýze veľkosti PCR produktov. Proteíny s nižšou molekulej hmotnosťou predstavujú produkty, odvodené z mutácií vedúcich k zaradeniu STOP kodónu v analyzovanom fragmente génu. Nevýhodou uvedenej metódy bola pomerne nízka senzitivita (82 %) a využívanie rádioaktívne značených prvkov na značenie proteínov. Aktuálna modifikácia PTT metódy vo forme využitia fluorescenčných farbiviek alebo značených epitopov umožnila jednoduchšiu nerádioaktívne detekciu mutácií. Nevýhodou PTT však zostáva fakt, že analýzou nemožno detegovať všetky typy mutácií (najmä substitúcie) a rovnako, že v niektorých prípadoch je nutné využitie nestabilnej molekuly RNA, ale takisto aj pomerne veľká finančná, experimentálna a štandardizačná

náročnosť. Výhodou PTT je vysoká senzitivita pri detekcii mutácií vedúcich k zaradeniu predčasného terminačného kodónu (10).

Single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) predstavuje v súčasnosti veľmi zriedkavo využívanú, avšak v minulosti v DNA diagnostike pomerne populárnu metódu. Princípom SSCP techniky je fakt, že jednovláknová ssDNA (single-stranded) má odlišnú konformáciu v prípade zámery, čo i len jednej bázy a prejavuje sa odlišnou mobilitou alebo počtom fragmentov v nedenaturačných podmienkach gélovej elektroforézy. Výsledkom sú odlišné elektroforetické produkty pri nemutovanej (WT) a heterozygotne, či homozygotne mutovanej vzorke. Samotná technológia pozostáva zo štyroch základných krokov: PCR amplifikácia, denaturácia dvojláknových ds-DNA PCR fragmentov na ssDNA, prudké schladenie denaturovanej DNA, respektíve fixácia v jednovláknovom stave a detekcia rozdielnej mobility fragmentov v nedenaturačných podmienkach, čo je dôležité, pri zachovaní nízkej teploty. Na vizualizáciu fragmentov bolo vyvinutých niekoľko techník založených na využití rádioizotopov, striebra alebo fluorescenčne značených PCR primerov v kombinácii s kapilárnou elektroforézou. Celkovo možno povedať, že výhodou SSCP metódy bola jej finančná nenáročnosť, relatívna rýchlosť, ale hlavne detekcia všetkých typov variantov (inzercie, delécie, substitúcie). Nevýhodami však boli relatívne nízka senzitivita, nutnosť využitia PCR fragmentov do maximálnej dĺžky 250 bp, klesajúca detekčná schopnosť v prípade prítomnosti viacerých variantov v jednom PCR fragmente a pomerne veľká manuálna prácnosť (11).

Metóda **DHPLC** (Denaturation High Performance Liquid Chromatography) je založená na detekcii prítomnosti heteroduplexov, a to na základe ich odlišnej prílnavosti na kvapalnóm chromatografickom nosiči za čiastočne denaturačných podmienok. Jednonukleotidové substitúcie, delécie a inzercie môžu byť úspešne detegované pomocou UV žiarenia alebo monitorovaním fluorescencie vo fragmentoch veľkých až do 1,5 kb. Senzitivita a špecificita DHPLC sa pohybuje výrazne až okolo 96 % a spolu s nízkymi finančnými nákladmi robí túto metódu jednou z najlepších techník používaných na genotypizáciu fragmentov ľudského genómu a skrining variantov v DNA. Pri použití úplných denaturačných podmienok môže byť metóda využitá aj na mutačne špecifickú genotypizáciu konkrétnych známych DNA polymorfizmov. Nevýhodami uvedenej metódy je potreba širokého prístrojového vybavenia, neschopnosť určiť presnú pozíciu mutácie a náročný proces

Obrázok 2. Výstupný elektroforetogram sekvenčnej analýzy: A – príklad delečnej mutácie; B – príklad substitučnej (missense) mutácie



štandardizácie pri využití na diagnostiku celých alebo viacerých génov (12).

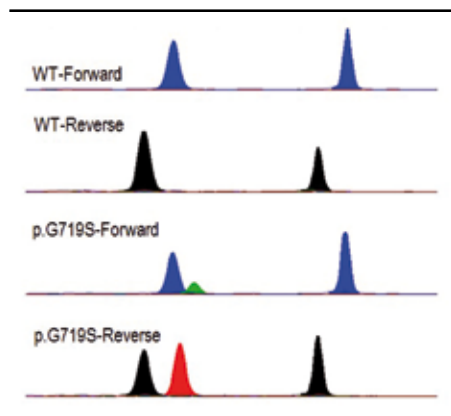
Na identifikáciu variantov sa aktuálne často používajú aj špecifické metódy, ktoré sú na rozhraní nepriamej a priamej detekcie mutácií, pričom bezprostredne počas PCR amplifikácie detegujú príslušný variant a často využívajú na detekciu sekvenčne špecifické a fluorescenčne značené sondy. Na druhej strane vo väčšine prípadov ide o mutačne špecifické metódy, nie o skriningové technológie, identifikujúce iba definované mutácie.

V súčasnosti je veľmi často využívaným spôsobom kombinácia qPCR a tzv. interkalačných fluorescenčných farbív, ktoré sú schopné včleniť sa počas PCR do dsDNA molekuly a emitovať svetlo. Príkladom takejto metódy je **HRM (High Resolution Melting) analýza**, ktorá predstavuje post-PCR analyzáčnú metódu, keďže

k detekcii signálu dochádza až po PCR reakcii, počas topenia amplifikovaného PCR templátu. K identifikácii variantov dochádza na základe rozdielov v priebehu kriviek teploty topenia PCR fragmentov. Výhodami spomínanej metódy je malé množstvo vstupných reagentií, jednoduchý pracovný postup, pomerne rýchla optimalizácia, malé množstvo vstupného DNA templátu a relatívne nízke finančné náklady. Nevýhodou je však pomerne náročná štandardizácia pri použití rôznych PCR fragmentov, respektíve detekcii variantov v celých génoch a aj nutnosť použitia krátkych PCR fragmentov, do 200 bp (13).

Medzi DNA varianty radíme aj alterácie typu veľkých genómových prestavieb (LGR's), ktoré zapríčiňujú deléciu, amplifikáciu alebo inzerciu jedného či viacerých exónov analyzovaných génov. Tieto genómové prestavby nie je možné identifikovať klasickými PCR metódami,

Obrázok 3. Výsledný elektroforetogram SNaPshot analýzy: porovnanie WT vzorky s mutovanou.

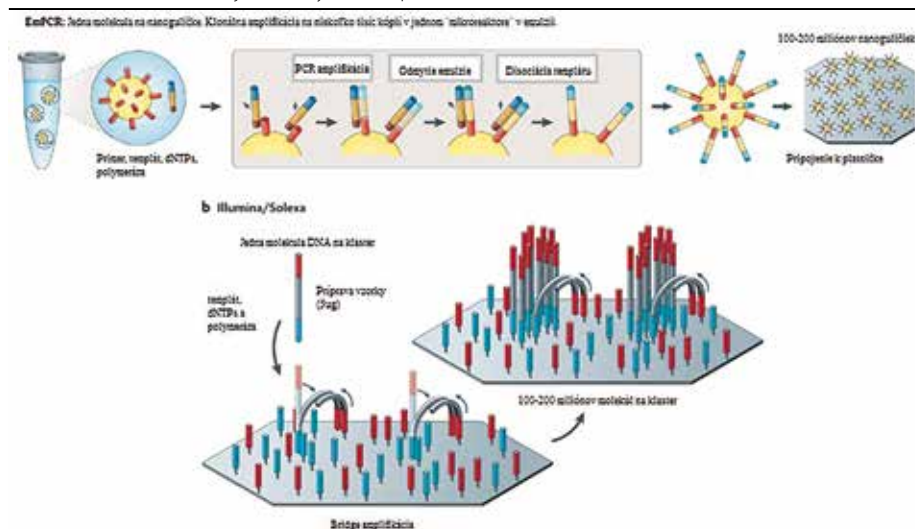


a preto sa na ich detekciu využívajú rôzne typy špeciálnych analýz, ktoré v sebe kombinujú prvky hybridizačných a amplifikačných metodík ako napríklad MLPA (multiplexná amplifikácia ligo-vaných prób) alebo MAPH (multiplexná amplifikácia hybridizovaných prób). Multiplexná metóda **MLPA** v porovnaní s inými technikami ako DHPLC, Southern blott poskytuje pri detekcii zmeny počtu kópií výhodu schopnosti detegovať zmeny počtu kópií, teda semi-kvantitatívnosť. Na druhej strane, v porovnaní s kvantitatívnou metódou CGH je MLPA podstatne menej finančne náročná. V súčasnosti sa štandardne využíva na detekciu alterácií pri rôznych syndrómoch, pri dedičných onkologických syndrómoch, pri Duchenovej muskulárnej dystrofii, DiGeorgovom syndróme, SMA a mnohých iných. Metodicky je pre MLPA typické, že dochádza k hybridizácii sekvenčne špecifických prób s využitím špecifických primerov a až následne k amplifikácii cieľovej sekvencie DNA, a to všetko v jedinej multiplexnej fluorescenčnej PCR reakcii. Produkty výslednej amplifikácie sú rôzne dlhé, fluorescenčne značené a ďalej analyzované kapilárnou elektroforézou. Následne sú porovnávané plochy píkov pre príslušné exóny s plochami píkoxónov zdravých kontrolných vzoriek, čo indikuje prítomnosť aberantných kópií exónov jednotlivých génov. Metóda MLPA je relatívne finančne nenáročná, umožňuje testovanie viacerých vzoriek, vyžaduje relatívne malé množstvo DNA a možnosť použitia rovnakých reagentií, čo zjednodušuje manuálnu prípravu vzoriek. Nevýhodou metódy je jej využiteľnosť na detekciu neznámych bodových variantov, ovplyvniteľnosť výsledného signálu napríklad typom izolácie, kvalitou izolovanej DNA a kvalitou amplifikácie (14).

Priama diagnostika DNA variantov

V rámci metód priamej detekcie identifikujeme priamo alely, respektíve mutácie, ktoré súvisia s ochorením. Najčastejšie využívaná

Obrázok 4. Porovnanie jednotlivých NGS platforiem



metóda v tomto smere je **sekvenčná analýza**, t. j. určenie primárnej štruktúry DNA, poradie nukleotidov (obrázok 2). V roku 1977 bola publikovaná najvýznamnejšia z metód sekvenovania, Sangerovadideoxy metóda, pričom v tom istom roku publikovali enzymatickú metódu sekvenovania Maxam a Gilbert. Sekvenovanie DNA bolo spočiatku založené na gélovej elektroforéze, ale postupne dochádzalo k výrazným vylepšeniam, či už na úrovni používaných enzýmov, fluorescenčne značených ddNTP (dideoxynukleotidov), alebo elektroforetickej separácie. V súčasnosti sa metóda uskutočňuje v jedinej reakcii a je značne automatizovaná. Spoločnosť Applied Biosystems v roku 1986 ako prvá uviedla automatické sekvenovanie DNA, ale k úplnej automatizácii dochádza až po zavedení kapilárnej elektroforézy, pričom aktuálne existuje na trhu množstvo sekvenátorov od 8 až po 96 kapilárne. Výhodou sekvenčnej analýzy je komplexné čítanie cieľového úseku a prehľad o všetkých prítomných zmenách v DNA, ako aj vysoká senzitivita, v prípade zárodočných mutácií až 99 %. Výsledný elektroforetogram umožňuje na základe porovnania s tzv. referenčnou sekvenciou génu determinovať zmeny sekvencie DNA (15).

Ďalšou modifikovanou metódou je minisekvenčná reakcia alebo **SNaPshot analýza**, ktorá môže byť multiplexná, teda detegovať viacero cieľových variantov (obrázok 3). Primery sú dizajnované priamo pred miesto DNA variantu, následne po ich annealingu dochádza k inkorporácii ddNTP, ktoré PCR reakciu terminujú. Každý zo štyroch ddNTP sa značí inou fluorescenčnou farbičkou a výsledkom sú rôzne dlhé a zároveň farebne odlišené fragmenty, ktoré zodpovedajú jednotlivým variantom DNA, a to v závislosti od inkorporovanej bázy. Po kapilárnej elektroforéze a fluorescenčnej detekcii sa

jednotlivé alely na elektroforetogramе zobrazujú ako rôzne sfarbené píky. Výhodou tejto metódy je jej nenáročnosť, citlivosť až 98 % a možnosť detekcie viacerých mutácií v jednej reakcii (16).

Medzi najnovšie metódy využívané v DNA diagnostike jednoznačne patrí **sekvenovanie novej generácie (NGS)**, ktoré sa v súčasnosti využíva najmä na masívne paralelné sekvenovanie celých genómov, exómov či panelov viacerých génov, prípadne cielečné resekvenovanie. Finančné náklady na analýzu postupne s technologickými inováciami výrazne klesajú. Veľkosť NGS prístrojov, finančná dostupnosť a rozmery jednotlivých platforiem (454 GS Junior, MiSeq a IonTorrent) sprístupňujú techniky NGS aj klinickým pracoviskám, a to za cieľom lacnejšej, rýchlejšej a komplexnejšej analýzy DNA variantov a diagnostických jednotiek. Metóda NGS je výhodná najmä pri ochoreniach, ktoré vyžadujú testovanie viacerých génov súčasne, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *TP53*. Uvedené NGS platforiem sú technicky menej náročné a využívajú minimálne množstvo vstupnej DNA. Z hľadiska princípov použitej detekcie pri NGS systémoch poznáme tri základné metódy: 454 sekvenovanie využívajúce svetelné zmeny, respektíve 454 pyrosekvenovanie (GS Junior), 454 sekvenovanie využívajúce detekciu zmien H⁺, respektíve pH (IonTorrent) a sekvenovanie na princípe ligácie s využitím cyklickej reverzibilnej terminácie, respektíve bridge PCR (MiSeq) (obrázok 4).

V prípade technológie GS Junior sa DNA knižnica vytvorí pomocou multiplexnej PCR s následnou ligáciou špecifických adaptorov na DNA fragmenty. Používané nanogulôčky sú pokryté kovalentne naviazanými primermi komplementárnymi k adaptorovej sekvencii a na každej gulôčke prebieha sekvenovanie jedného fragmentu DNA. Po prichytení fragmentov na

nanogulôčku sa pripraví zmes PCR reagentov, pričom reakcia prebieha v emulznom oleji na zabezpečenie vysokej efektivity amplifikácie DNA, tzv. emulzná PCR (emPCR). Napokon sa z naamplifikovaných gulôčok odmyva olej a magnetickými partikulami sa selektujú tie, na ktorých sa nachádzajú žiadané fragmenty DNA. Sekvenovanie na prístrojoch rady 454 prebieha v pikotitračných platničkách, kde veľkosť jednotlivých jamiek je prispôsobená práve veľkosti jednej nanogulôčky. Platnička sa následne vkladá do prístroja, kde prebieha samotné sekvenovanie metódou pyrosekvenovania a sledovanie svetelných zmien na platničke, ktorá je následne skenovaná citlivou CCD kamerou. Pri inkorporácii komplementárneho nukleotidu dochádza k vzniku pyrofosfátu, ktorý je pomocou enzýmu ATP sulfurylázy spotrebovaný na tvorbu ATP z adenosín 5-fosfosulfátu. Vzniknuté ATP je potrebné na funkciu luciferázy, ktorá umožní transformáciu luciferínu na oxyluciferín, t. j. vysvieti sa a zaznamenáva sa viditeľné svetlo emitované pri obmyvaní konkrétnym nukleotidom (A, C, T, G) (17).

Analogicky technológia platformy IonTorrent je založená na emPCR, avšak zmena je v detekcii signálu. Jemná zmena pH je zaznamenávaná ako signál, ktorý je po inkorporácii nukleotidu pri syntéze DNA vlákna emitovaný vylúčením H⁺. Zaradenie dvoch za sebou idúcich rovnakých nukleotidov v jednom cykle vedie k dvojnásobnému vylúčeniu protónov a zaznamenaný je dvojnásobne vysoký pík (18).

Na druhej strane platforma MiSeq využíva sekvenovanie na báze syntézy, ktoré využíva metódu cyklickej reverzibilnej terminácie. Príprava DNA knižnice spočíva v sekvenovaní na sklenenej platničke, v rámci ktorej sa nachádzajú primery, ktoré viažu ssDNA molekulu. Počas prípravy je k DNA fragmentom viazaná aj adaptorová sekvencia. Po naviazaní DNA fragmentu dochádza k ohybu a pripojeniu voľného konca s adaptorom k primeru na platničke (vytvorenie mostu, preto bridge PCR). Následne prebehne amplifikácia a denaturácia, po ktorej dochádza k rozpadu štruktúry, t. j. dve jednovláknové molekuly sú uchytené na platničke, pričom postupne vznikne klaster, t. j. niekoľko 1 000 kópií daného DNA fragmentu v tesnej blízkosti. Jednotlivé nukleotidy DNA sú označené fluorescenčne (každý inou farbičkou) a reakcia je terminovaná skupinou ddNTP. Po inkorporácii komplementárneho nukleotidu nasleduje terminácia, pričom nezačlenené ddNTP sú následne odmyté a inkorporovaný nukleotid je determinovaný. V poslednom kroku dochádza k štiepeniu, pri ktorom je odstránená

terminačná skupina a fluorescenčná farbička a je zaznamenaný fluorescenčný signál (19).

Aj sekvenovanie novej generácie prechádza inováciami a poskytuje nové vyhliadky a možnosti. Tretia generácia sekvenovania má dve hlavné charakteristiky, prvou je nevyužívanie PCR amplifikácie, čo výrazne skracuje prípravu DNA vzoriek a druhou je detekcia signálu (buď fluorescenčného alebo vo forme elektrického prúdu) v reálnom čase. Signál je monitorovaný vo forme enzymatických reakcií, ihneď po pridaní komplementárneho nukleotidu do vlákna DNA. Jednu z takýchto metód predstavuje nanopórové sekvenovanie. Nanopóry sú biopóry, ktoré sa nachádzajú v proteínovom kanáli lipidovej membrány a umožňujú výmenu iónov. Základným konceptom nanopórového sekvenovania je umiestnenie jednovláknovej DNA do α -hemolýzínového póru, ktorý je poskladaný do heptamerického transmembránového kanála. Tento typ sekvenovania má niekoľko zásadných výhod ako dĺžka čítaných fragmentov (viac ako 5 kbp s rýchlosťou 1 bp/ns), nevyužívanie enzymatického štiepenia ssDNA, menšia senzitivita na teplotu. Pri sekvenovaní cez nanopóry dochádza k výraznému skráteniu krokov prípravy, klonovania a amplifikácie vzorky DNA. Nevýhodou tejto metodiky je jej citlivosť na experimentálne podmienky (pH, teplota, koncentrácia solí), finančná náročnosť a určité systematické chyby pri čítaní sekvencie (19).

Záver

Molekulárno-genetická analýza DNA plní v diagnostickej praxi dôležitú úlohu pri určení genetických faktorov spôsobujúcich vznik rôznych ochorení. V prípade onkologických syndrómov prebieha laboratórne genetické testovanie až po absolvovaní genetického poradenstva a konzultácie v ambulancii klinického genetika. Tu dochádza k presnému spracovaniu rodinnej anamnézy, pričom je pacient oboznámený s podstatou genetického vyšetrenia, jeho limitami a významom. V prípade splnení indikačných kritérií, absolvovaní genetickej konzultácie a podpisu informovaného súhlasu na odber biologického materiálu nasleduje samotná laboratórna molekulárno-genetická analýza. Po jej dokončení genetik interpretuje vyšetrowanému probandovi výsledok DNA analýzy. V prípade dokázania patologického variantu v niektorom z génov je odporúčaná DNA analýza všetkým pokrvným príbuzným. Jedinci s dokázanými mutáciami sú následne zaradení do špeciálnych dispenzarizačných programov, ktoré umožňujú preventívne sledovanie pri pravidelných prehliadkach, využitie profylaktických operačných zákrokov pre prípadné včasné zacy-

tenie ochorenia (20). DNA diagnostika tak výrazne zefektívňuje prevenciu vzniku mnohých vážnych ochorení.

Literatúra

1. Pray, L. Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick. *Nature Education*. 2008;1(1):100.
2. Palazzo AF, Gregory TR. The Case for Junk DNA. *PLoS Genet*. 2014;10(5):1004351.
3. Couch FJ, Weber BL. Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene. *Breast Cancer Information Core. Hum Mutat*. 1996;8:8–18.
4. Abkevich V, Zharkikh A, Deffenbaugh AM, et al. Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of inter specific sequence variation. *J Med Genet*. 2004;41(7): 492–507.
5. Moisan AM, Fortin J, Dumont M, et al. No evidence of BRCA1/2 genomic rearrangements in high-risk French-Canadian breast/ovarian cancer families. *Genet Test*. 2006;10:104–115.
6. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
7. Tinoco I, Bustamante C. How RNA folds. *J. Mol. Biol*. 1999;293(2):271–281.
8. Chacon-Cortes D, Griffiths LR. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. 2014;2:1–9.
9. Mullis KB, Ferré F, Gibbs RA. The polymerase chain reaction. *Birkhauser Boston Inc*. 1994.
10. Johansson, BG. Agarose gel electrophoresis. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 1972;29:7–19.
11. Hauss O, Müller O. The protein truncation test in mutation detection and molecular diagnosis. *Methods Mol Biol*. 2007;375:151–64.
12. Dong Y, Zhu H. Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods Mol Med*. 2005;108:149–57.
13. Li J, Makrigiorgos GM. COLD-PCR: a new platform for highly improved mutation detection in cancer and genetic testing. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(2):427–32.
14. <http://www.lifetechnologies.com/sk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-applications/genetic-variation-analysis-using-real-time/high-resolution-melting-hrm.html>
15. Xiao W, Oefner, PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat*. 2001;17(6):439–74.
16. Schouten JP, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research*. 2002;30:57.
17. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature methods* 2008;16–18.
18. Su Z, Dias-Santagata D, Duke M, et al. A Platform for Rapid Detection of Multiple Oncogenic Mutations With Relevance to Targeted Therapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2011;13:74–85.
19. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2008;9:387–402.
20. Vestník ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky. Dostupné na: <https://www.google.sk/url?sa=&rc=j&q=&e-src=&source=web&cd=2&ved=0CCQqFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.health.gov.sk%2Fzdroje%3F%2Fsources%2Fdokumenty%2Fvestniky_mz_sr%2F2014%2Fvestnik-45-60.2014.pdf&ei=xMINVYbcAsfxUjInNgKgD&usq=AFQjCNFbdL9deo4lHkDjZKVI7XOod5tKA&sig2=YzOtpTu-5bQsQdVlmlF5vA&bv-m=bv.88528373,d.bG Q&cad=rj>.

Mgr. Lenka Dolešová

Ústav lekárskej biológie, genetiky
a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava
Sasinkova 4, Bratislava
lenka.dolesova@ousa.sk