

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalárska práca

Olomouc 2013

Gabriela Gabčová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Design pokusov pre získanie značky CE u molekulárne
genetickej typizačnej súpravy pre mutáciu V600E génu
*BRAF***

Bakalárska práca

Gabriela Gabčová

Študijný program: Biologie

Študijný obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma štúdia: Prezenčná

Olomouc 2013

Vedúci práce: doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Prehlasujem, že som predloženú bakalársku prácu vypracovala samostatne pod odborným vedením doc. Mgr. Jiřího Drábka, PhD. a s použitím citovanej literatúry.

V Olomouci dňa 24.04. 2013

.....

(podpis)

Pod'akovanie:

Rada by som poďakovala svojmu vedúcemu bakalárskej práce doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, PhD. za pomoc pri spracovaní práce, za odborné rady, pripomienky a čas, ktorý venoval tejto práci. Ďalej by som chcela poďakovať kolektívu ÚMTM, predovšetkým pani Miroslave Rabčanovej, Veronike Holinkovej, DiS., Mgr. Jane Stránskej, PhD., Mgr. Sylwii Jančík a Mgr. Lenke Radovej, PhD. za pomoc pri vypracovaní experimentálnej časti práce.

SÚHRN

Gén *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) je člen MAPK signálnej dráhy. Mutácie *BRAF* vedú k zmene diferenciacie a regulácie bunkového cyklu, ktoré sú v ľudskom organizme schopné vyvolať rakovinové ochorenie. Najčastejšou mutáciou *BRAF* je mutácia V600E. Detekcia tejto mutácie je dôležitá pre správnu diagnostiku stavu pacienta a následné nastavenie adekvátnej liečby.

Cieľom teoretickej časti práce bolo získať základné informácie a spísať rešerš o géne *BRAF*, vplyve mutácie V600E na ľudský organizmus a možnosti jej detekcie. Cieľom praktickej časti bakalárskej práce bolo vykonať sériu pokusov, ktoré by umožnili detekciu mutácie V600E v systéme so stabilizáciou PCR reagensí pomocou sušenej trehalózy. Stabilizačné pokusy budú slúžiť ako základ pre CE-IVD certifikáciu typizačnej súpravy vytvorenej firmou IntellMed v spolupráci s Ústavom molekulárnej a translačnej medicíny Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Kľúčové slová: genotypizácia, rakovina, *BRAF*, trehalóza, stabilizácia PCR reagensí

SUMMARY

Gene *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) is a member of MAPK signalling pathway. *BRAF* mutations lead to change of differentiation and regulation of cell cycle, which in human body can launch a tumor growth. The most common *BRAF* mutation is mutation V600E. Detection of this mutation is essential for diagnose and prediction in cancer patients.

The theoretical part's aim of this thesis was to summarize knowledge and to create a review about *BRAF* gene. Goal of experimental part of bachelor thesis was to run a set of experiments allowing to detect V600E mutation in system of trehalose - stabilized PCR reagents. Stabilization experiments will be used for CE-IVD certification of testing kit developed by IntellMed in cooperation with the Insitute of Molecular and Translational Medicine of the Faculty of Medicine nad Dentistry of Palacký University in Olomouc.

Keywords: genotyping, tumour, *BRAF*, trehalose, and stabilization of PCR reagents

OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Ciele práce.....	9
3. Súčasný stav problematiky	10
3. 1 <i>BRAF</i> gén a BRAF proteín.....	10
3. 2 Signalizačná kaskáda RAF	11
3. 2. 1 Štruktúra RAF proteínov	11
3. 2. 2 RAS-RAF-MEK-ERK signálna dráha	12
3. 3 Mutácie génu <i>BRAF</i> a nádorové ochorenia.....	14
3. 3. 1 Melanóm.....	14
3. 3. 2 Nádory štítnej žľazy	17
3. 4 Liečba malignít pomocou látok namierených proti <i>BRAF</i>	19
3. 4. 1 Liečba melanómu	19
3. 4. 2 Liečba nádorov štítnej žľazy	20
3. 5 Metódy používané k detekcii mutácií v géne <i>BRAF</i>	21
3. 5. 1 Sangerova sekvenačná metóda.....	21
3. 5. 2 Pyrosekvencovanie.....	22
3. 5. 3 Real-time PCR.....	22
3. 6 Uchovanie reagensí v trehalóze	25
3. 6. 1 Vlastnosti trehalózy.....	26
3. 6. 2 Stabilizačná funkcia trehalózy.....	27
3. 6. 3 Využitie trehalózy v PCR.....	28
3. 7 Certifikácia genotypizačných diagnostík	28
3. 7. 1 CE značka.....	28
3. 7. 2 Certifikácia <i>in vitro</i> diagnostík.....	29
4. Materiál	31
4. 1 Prístroje a pomôcky.....	31
4. 2 Software	31
4. 3 Spotrebný materiál	32

4. 4 Chemikálie a reagensie	32
4. 5 Biologické vzorky	33
5. Metódy.....	34
5. 1 Návrh primerov	34
5. 2. Laboratórne protokoly prípravy PCR mixu, nanášanie na doštičku a prídavok templátovej DNA	34
5. 2. 1 Pracovný protokol detekcie mutačného statusu DNA.....	36
5. 2. 2 Pracovný protokol detekcie <i>BRAF</i> za použitia natívnych reagensí	36
5. 2. 3 Pracovný protokol tvorby sušeného mixu	38
5. 2. 4 Pracovný protokol detekcie <i>BRAF</i> za použitia suchých reagensí, nanášanie na doštičku a prídavok DNA.....	39
6. Výsledky	41
6. 1 Určenie mutačného statusu vybraných vzoriek DNA	41
6. 2 Porovnanie citlivosti detekcie <i>BRAF</i> za použitia natívnych reagensí bez prítomnosti trehalózy a za použitia reagensí vysušených za prítomnosti trehalózy.....	43
7. Diskusia	50
8. Záver.....	52
9. Použitá literatúra.....	53
10. Zoznam použitých skratiek a symbolov	65

1. ÚVOD

Pojmom rakovina rozumieme patologický stav organizmu, ktorý vedie k vzniku zhubného (malígneho) nádoru. Bujenie rakovintvorných buniek je spojené s tvorbou vzdialených ložísk v tele, tzv. metastáz. Populácia buniek stráca kontrolu nad vlastným delením a začína atypicky rásť. Zmeny v bunke vedúce ku tvorbe nádorov vznikajú v dôsledku mutácií DNA určitých génov.

Gén *BRAF* je člen MAPK signálnej dráhy, ktorá reguluje bunkový rast, delenie (proliferáciu), diferenciáciu a apoptózu. Mutáciami génu *BRAF* sa normálne rastúce bunky nekontrolovateľne množia, čím môže dôjsť k indukcii mnohých typov ochorení, vrátane rakoviny. *BRAF* protoonkogén je zložený z 18 exónov, pričom najviac mutácií vzniká v exóne 15 (Ziai a kol, 2012). Najčastejším typom mutácie *BRAF* je mutácia *BRAF*^{V600E}, kedy dochádza k substitúcii dusíkatej báze thymínu za adenín v nukleotide 1799. Mutáciou *BRAF* dochádza k vzniku nádorového ochorenia, pričom mutácia *BRAF*^{V600E} sa vyskytuje predovšetkým u malígnych melanómov kože, rakovine štítnej žľazy, kolorekta a pľúc.

Detekcia prítomnosti mutácie *BRAF*^{V600E} je dôležitá pre diagnostiku ochorení, na základe ktorej sa pacientovi určuje postup liečby. V súčasnosti je možné využiť široké spektrum metód umožňujúcich detekciu mutácie *BRAF*^{V600E}. Často využívanou detekčnou metódou je kvantitatívna PCR v reálnom čase. Reagencie využívané na tvorbu PCR mixu sú citlivé na podmienky skladovania a manipuláciu, čo môže ovplyvniť citlivosť a iné analytické parametre PCR. Stabilizáciou reagensov PCR je možné predísť tvorbe nešpecifických produktov a degradácii reagensov, vznikajúcej pri ich opakovanom rozmrazovaní. Jednou z možností stabilizácie reagensov PCR je sušenie po prídavku sacharidu trehalózy.

2. CIELE PRÁCE

Cieľom teoretickej časti bakalárskej práce (kapitola Súčasný stav problematiky) bolo zozbierať a spracovať informácie o géne *BRAF*, so zameraním na mutáciu *BRAF*^{V600E} a možnosti zvýšenia stability reagensí pre PCR v reálnom čase. Časť teoretickej práce bola zameraná na úlohu *BRAF*^{V600E} pri vzniku rakovín, konkrétne pri rozvoji malígneho melanómu a karcinómu štítnej žľazy, a látky namierené proti mutovanému *BRAF* v zvolených typoch rakovín. Ďalej sa práca zaoberá súčasnými možnosťami detekcie mutácií *BRAF*. Časť práce bola venovaná požiadavkám na získanie CE-IVD značky pre genotypizačnú súpravu.

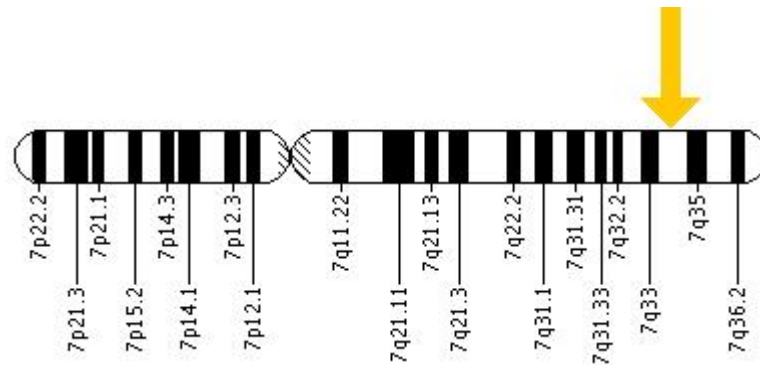
Cieľom praktickej časti (kapitoly Materiál, Metódy, Výsledky, Diskusia a Záver) bolo:

- Stanoviť mutačný status génu *BRAF* u vzoriek DNA, u ktorých bola dostupná informácia o *BRAF* mutačnom stave v online databázach
- Aplikovať systém sušenia reagensí za prídavku trehalózy pre PCR v reálnom čase
- Vykonať časť pokusov potrebných pre získanie CE-IVD značky a pripraviť podklady k získaniu CE značky u molekulárne typizačnej sústavy mutácie V600E génu *BRAF*
- Porovnať analytické parametre detekcie *BRAF* s aplikáciou trehalózy a bez aplikácie trehalózy

3. SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

3. 1 *BRAF* GÉN A *BRAF* PROTEÍN

BRAF gén lokalizovaný na chromozóme 7q34 (Obr. 1) je označovaný ako protoonkogén *BRAF* a v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (NCBI, 2013). Skladá sa z 18 exónov a dĺžka transkribovanej mRNA je 2478 bp (Niihori, a kol, 2006). *BRAF* pôsobí ako onkogén vo viacerých typoch ľudských rakovín, pričom jeho mutácie spôsobujú zmeny v *BRAF* proteíne. Tie môžu uľahčiť rast a rozšíriť výskyt rakovinových buniek.



Obr.1: Lokalizácia *BRAF* na chromozóme 7 (Genetics Home Reference, 2012)

Pri analýze *BRAF* bolo odhalených viac ako 30 mutácií so zmenou zmyslu - tzv. missense mutácií (Wan a kol, 2004). Mutácie *BRAF* génu sa vyskytujú na kinázových doménach lokalizovaných na exónoch 11 a 15 (Trovisco a kol, 2006). Približne 89 % *BRAF* mutácií, je lokalizovaných v kodónoch 595-600 exónu 15 (Ziai a kol, 2012). Najčastejší typ mutácie vyskytujúci sa v exóne 15 vzniká bodovou mutáciou DNA nukleotidu 1799, spojenou so substitúciou dusíkatej báze thymínu (T) na adenín (A), označenej ako T1799A. T1799A mutácia spôsobuje zámenu aminokyselín a následnú aktiváciu *BRAF* kinázy. Dochádza k substitúcii aminokyseliny valín (V) za kyselinu glutámovú (E) v kodóne 600 (Curry, a kol, 2012). Mutácia je označovaná ako *BRAF*^{V600E}, alebo Val600Glu. Substitúcia V za E spôsobuje konštitutívnu aktiváciu *BRAF*.

Gén *BRAF* kóduje proteín BRAF patriaci k rodine RAF kináz. *BRAF*^{V600E} mutácia destabilizuje kinázy a prispieva k tumorigenézii prostredníctvom aktivovanej MAPK dráhy (Elisei a kol, 2008). Proteín BRAF reguláciou MAPK/ERK signálnej kaskády ovplyvňuje bunkové delenie, diferenciaciu a sekréciu. Defosforylovaný štandardný (wildtype, wt) BRAF proteín pretrváva v neaktívnom stave prostredníctvom hydrofóbných interakcií medzi aktivačným miestom a ATP-väzbovým miestom. V600E mutácia rozrušuje tieto interakcie, čím dochádza k fosforylácii. Fosforyláciou v aktivačnom segmente je regulovaná transkripčná aktivita *BRAF*. Dochádza k nej po začlenení BRAF do membrány aktivovaným RAS. Fosforylácia je potrebná na dosiahnutie maximálnej kinázovej aktivity. Zároveň prispieva k bazálnej aktivite, ktorú má BRAF vyššiu než zvyšné RAF izoméry.

3. 2 SIGNALIZAČNÁ KASKÁDA RAF

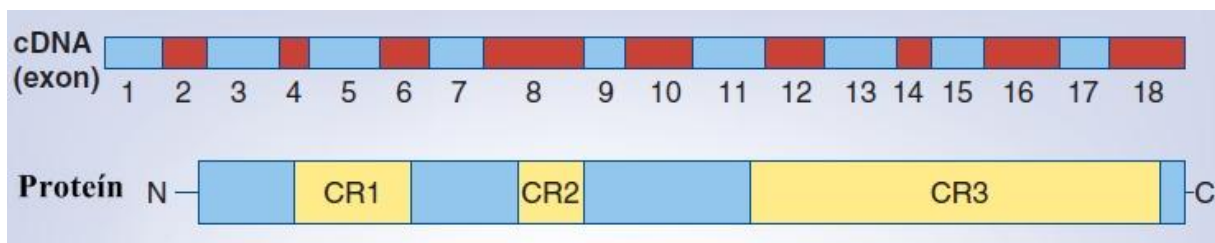
Proteínové kinázy sú enzýmy, ktoré katalyzujú väzbu fosfátu na bočné reťazce aminokyselín serínu, threonínu alebo tyrosínu. Proteínové kinázy zohrávajú úlohu v takmer každom aspekte bunkovej biológie. Fosforyláciou dochádza k zmene vlastností enzýmov: k regulácii ich metabolizmu, katalytickej aktivity, transkripcie, apoptózy (Johnson a Lapadat, 2002). RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma) mutácie sa vyskytujú v 15-30 % všetkých doposiaľ detekovaných typoch ľudských rakovín (Roskoski, 2010). Prvý *RAF* gén bol objavený v roku 1983 ako retrovírusový onkogén (Rapp a kol., 1983).

3. 2. 1 ŠTRUKTÚRA RAF PROTEÍNOV

RAF je označovaná ako rodina proteín-serín/threonínových kináz. RAF proteíny sú esenciálne konektory medzi RAS a MEK-ERK signálnou dráhou (Kyriakis a kol., 1992). U cicavcov rozoznávame 3 odlišné RAF izoformy: ARAF (1986), BRAF (1988) a CRAF (1985, nazývaný aj RAF-1).

Z funkčného hľadiska majú RAF proteínové kinázové domény charakteristické malé N-terminálne a veľké C-terminálne slučky. N-terminálne slučky obsahujú ATP-fosfátovú viažucu slučku, nazývanú aj ako P-slučka. C-terminálne slučky sú zvyčajne α -helikálne,

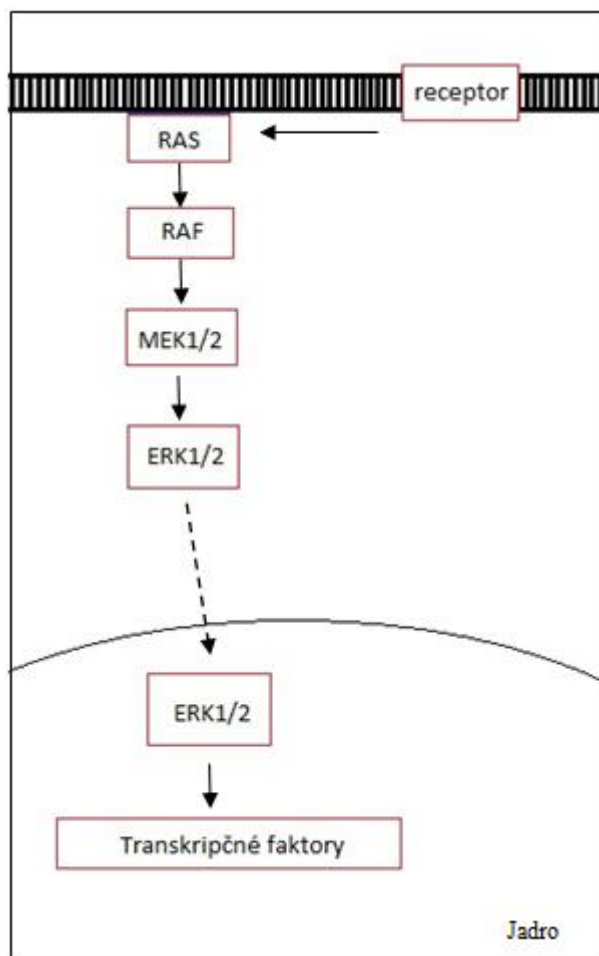
viažuce MEK1/2. Všetky 3 RAF izoformy zdieľajú spoločnú stavebnú štruktúru pozostávajúcu z 3 konzervatívnych (conserved) regiónov (CR) líšiacich sa funkciami, označovaných ako CR1, CR2 a CR3 (Wellbrock a kol., 2004a) (Obr. 2). CR1 obsahuje RAS-viažucu doménu (RBD) ktorá je nevyhnutná pre interakciu s RAS a membránovými fosfolipidmi, a na cysteín bohatú doménu (CRD), ktorá slúži ako sekundárne RAS-viažuce miesto (Tran a kol., 2005). CR2 obsahuje dôležité fosforylačné miesta, podieľajúce sa na RAF aktivácii (Dhillon a kol., 2002). CR2 je miestom fosforylácie CRAF (Morrison a kol., 1993). CR3 je lokalizovaný v blízkosti C-konca, a obsahuje kinázovú doménu vrátane aktivačného segmentu, ktorého fosforylácia je kľúčová pre kinázovú aktiváciu BRAF (Chong a kol., 2001).



Obr. 2: Schématické znázornenie štruktúry BRAF (upravené podľa Ziai a kol., 2012)

3. 2. 2 RAS-RAF-MEK-ERK SIGNÁLNA DRÁHA

Všetky tri izoformy RAF rodiny sa podieľajú na tzv. RAS-RAF-MEK-ERK signálnej transdukčnej kaskáde. Je označovaná ako mitogénom aktivovaná proteinová kinázová (MAPK) kaskáda (Zebisch a kol., 2006). Táto kaskáda sa zúčastňuje regulácie širokého spektra procesov, vrátane apoptózy, progresie bunkového cyklu, diferenciácie, proliferácie a transformácie na rakovinový stav. Nejedná sa o samostatnú lineárnu dráhu, ale práve naopak – ide o široko rozvetvenú dráhu. Kostra RAF dráhy pozostáva z trojúrovňovej kinázovej kaskády (Obr. 3).



Obr. 3 RAS-RAF-MEK-ERK signálna dráha

Tento rozvetvený design umožňuje rozšírenie možností regulácie krížením signalizačných dráh (crosstalkov) a zvýšenie citlivosti na vstupné signály (Brown a kol., 1997). Signálna dráha je aktivovaná RAS proteínom. Inaktívny RAS-GDP viazaný na membránu sa fosforyláciou premieňa na aktívny membránový RAS-GTP, ktorý následne aktivuje ďalších členov dráhy. K aktivácii dochádza väzbou RAS-GTP s RBD lokalizovanou na N-terminálnom regulačnom úseku kinázy. Analýzou rodiny RAS bolo preukázané, že jedine H-RAS, N-RAS a K-RAS sú schopné aktivácie BRAF (Rodriguez-Viciano a kol., 2010).

RAF kinázové proteíny sa vyskytujú v neaktívnom stave v cytosole. Všetky RAF proteíny ako substrát zdieľajú MEK1/2 kinázu. Aj keď všetci členovia rodiny RAF majú schopnosť viazať a fosforylovať MEK, *in vitro* aktivita sa smerom k MEK široko líši (Papin a kol., 1996). Najsilnejšiu aktivitu k MEK má BRAF, zatiaľ čo aktivita na hranici detekovateľnosti

je typická pre ARAF a CRAF. Aktivované RAF kinázy fosforylujú obe MEK izoformy v aktivačnej slučke. Fosforyláciou proteínov RAF sa tak zvyšuje aktivita MEK, ktorá je následne schopná viazať, fosforylovať a aktivovať ERK.

MEK1/2 ako duálne špecifické proteínové kinázy sprostredkujú aktiváciu tyrozínu i serínu v ERK1 alebo ERK2 prostredníctvom ich fosforylácie. ERK dráha je charakteristická následnou reguláciou množstva proteínov, ktoré sprostredkujú cross-talk s ostatnými signálnymi dráhami, pričom ERK reguluje mnohé biologické funkcie, vrátane bunkovej proliferácie, diferenciacie, migrácie, alebo apoptózy.

Na udržanie RAS-signalizácie je potrebné vykonať posttranslačnú modifikáciu schopnú prichytiť RAS proteíny na vnútornú bunkovú membránu – farnezyláciu a prenyláciu (Matallanas a kol., 2011).

3. 3 MUTÁCIE GÉNU *BRAF* A NÁDOROVÉ OCHORENIA

Približne 8 % všetkých ľudských rakovín nesie mutáciu *BRAF*. Najvyššia frekvencia *BRAF* mutácií je v melanómoch (70 %) (Wellbrock a kol, 2004). Mutácia je prítomná i v 40-70 % prípadoch rakoviny štítnej žľazy, 5-15 % kolorektálnej rakoviny a 1-3 % rakoviny pľúc. (Namba, 2003; Tie, 2010). V klinickej praxi sa vyšetruje *BRAF* mutácia rutinne u melanómu a rakoviny kolorekta.

3. 3. 1 MELANÓM

Melanóm je zhubný nádor kože vznikajúci z pigmentových kožných buniek – melanocytov. Melanocyty sú špecializované bunky produkujúce pigment, ktorých úlohou je ochrana kože pred škodlivými účinkami UV svetla. U černochovo a Hispáncovo dochádza ku tvorbe malígnych melanómov zriedka, najčastejšie sa vyskytuje na chodidlách, dlaniach, či pod nechtami. Väčšina melanómov sa u ľudí so svetlým typom kože vyskytuje na trupe a na končatinách. Rýchlosť delenia melanocytov je pomalá, a ovplyvňujú ju environmentálne faktory, ako je UV žiarenie. UV zložka slnečného žiarenia je jedným z najrizikovejších faktorov, ktoré majú vplyv na vznik melanómov. Intenzívne vystavenie UV žiareniu

v rannom veku môže ovplyvniť výskyt melanómov u dospelých v neskoršom veku. Ďalším rizikovým faktorom je výskyt rakoviny kože v rodine, sklon k rýchlemu opáleniu i prítomnosť materských znamienok. 95 % prípadov melanómov je možné liečiť, v prípade ich skorej diagnostiky - primárne chirurgickým odstránením.

Incidencia zhubného melanómu kože sa v Českej republike každoročne zvyšuje. V roku 2010 bolo zaznamenaných 2058 prípadov, zatiaľ čo v roku 2000 bolo diagnostikovaných 1458 prípadov (Dušek a kol., 2005).

Menej ako 5 % mutácií melanómov sú mutácie tumor supresorového génu p53. Mutácie *RAS* onkogénu tvoria 21 % prípadov. Najčastejším typom mutácie melanómov je mutácia génu *BRAF* (Davies a kol, 2002). Táto mutácia však s najväčšou pravdepodobnosťou nie je indukovaná priamo UV žiarením. Pri ožiarení UV svetlom totiž dochádza ku zmenám C-T a tvorbe pyrimidínových dimerov, zatiaľ čo pri *BRAF*^{V600E} mutácii dochádza ku zmene GTG na GAG. UV svetlo teda indukuje *BRAF* mutácie v melanómoch ako sekundárny následok vystavenia kože žiareniu (Davies a kol, 2002). Vysoká frekvencia mutácií v melanómoch môže súvisieť s prítomnosťou α -melanocyt stimulujúceho hormónu (α -MSH), ktorý aktivuje receptor pre melanokortín-1 (MC1R), čím dochádza k stimulácii syntézy cAMP aktivujúceho *BRAF* (Dhomen a kol, 2007; Landi a kol, 2006).

V melanocytoch môže dôjsť súčasne k aktivácii viacerých signálnych dráh, ktoré ovplyvňujú fungovanie bunky. Najčastejšie aktivovanými dráhami sú RAS-RAF-MEK-ERK signálna dráha a dráha cAMP (Dumaz a kol, 2006).

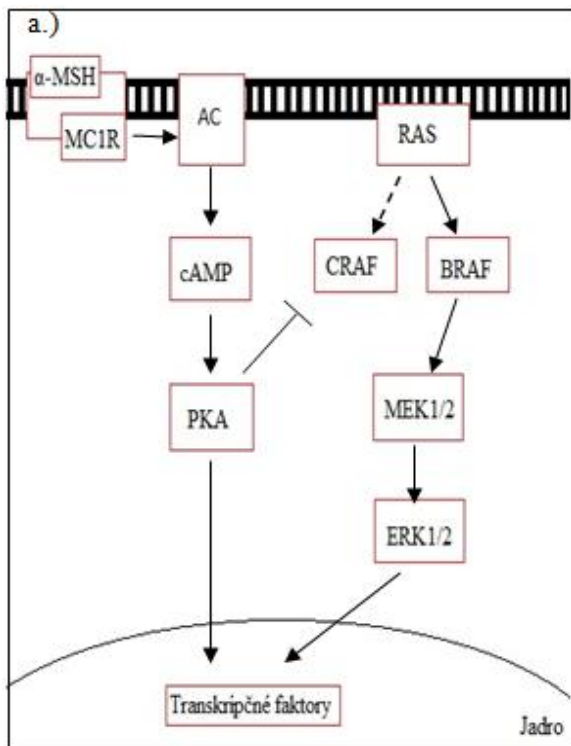
Cyklický adenosínmonofosfát (cAMP) slúži v signálnych dráhach ako druhý posol. Je syntetizovaný z ATP prostredníctvom adenylátcyklázy (AC) lokalizovanej na vnútornej strane plazmatickej membrány. Aktivuje proteinkinázy, predovšetkým proteínkinázu A (PKA), čím sa fosforylujú ďalšie enzýmy a dochádza k ich aktivácii. K ukončeniu signalizácie dochádza v momente, keď je cAMP degradovaný pomocou cAMP-fosfodiesteráz (Dumaz a kol, 2006).

V nemutovaných génoch *RAS* prechádza signál z *RAS* priamo na *BRAF* do MEK, zatiaľ čo izoforma *CRAF* je inhibovaná (Obr. 4a). Stimuláciou produkcie cAMP pomocou adenylátcyklázy sa aktivuje PKA, ktoré inhibuje aktivitu *CRAF* (Dhomen a kol, 2007).

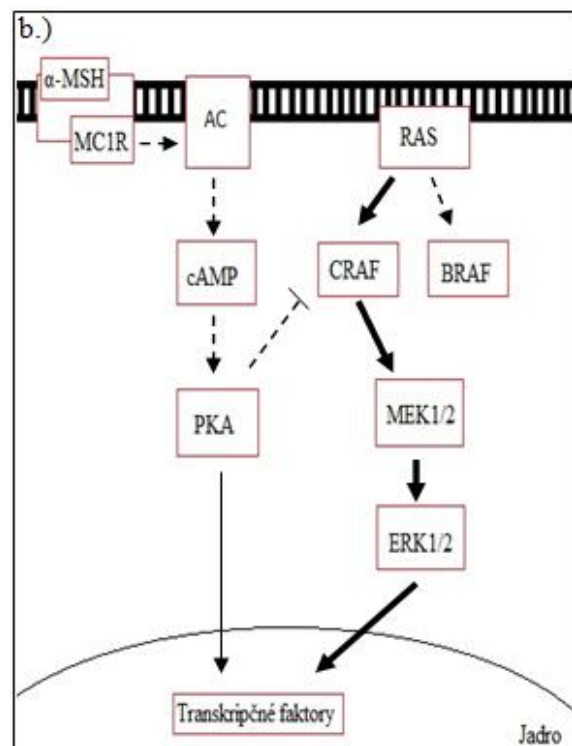
Melanómy môžu byť vyvolané mutáciami *RAS* i *BRAF* génov. Ku aktivácii MEK dochádza teda dvoma odlišnými cestami – buď mutovaným *BRAF* (Obr. 4c) alebo mutovaným *RAS*

prostredníctvom CRAF. V prípade mutovaného *RAS* génu *BRAF* nie je aktivovaný a schopný signalizácie (Obr. 4b). MEK je v tomto prípade aktivovaný prostredníctvom CRAF. Aby bola možná CRAF signalizácia, musí dôjsť k inaktivácii proteínkinázy A (PKA), čím melanocyty s mutovaným *RAS* prestanú odpovedať na α -MSH. *CRAF* sa stáva melanocytným onkogénom. Na potlačenie onkogénnej aktivity CRAF je potrebné inhibovať jeho aktivitu prostredníctvom PKA. Pri zvýšenej hladine cAMP v melanocytoch dochádza k fosforylácii CRAF cez PKA, čím je zabránený ďalší prenos signálu RAS. Konštantne vysoká hodnota cAMP inaktivuje CRAF, a *BRAF* sa tak stáva jediným prepojením medzi *RAS* a MEK (Dhomen a kol, 2007).

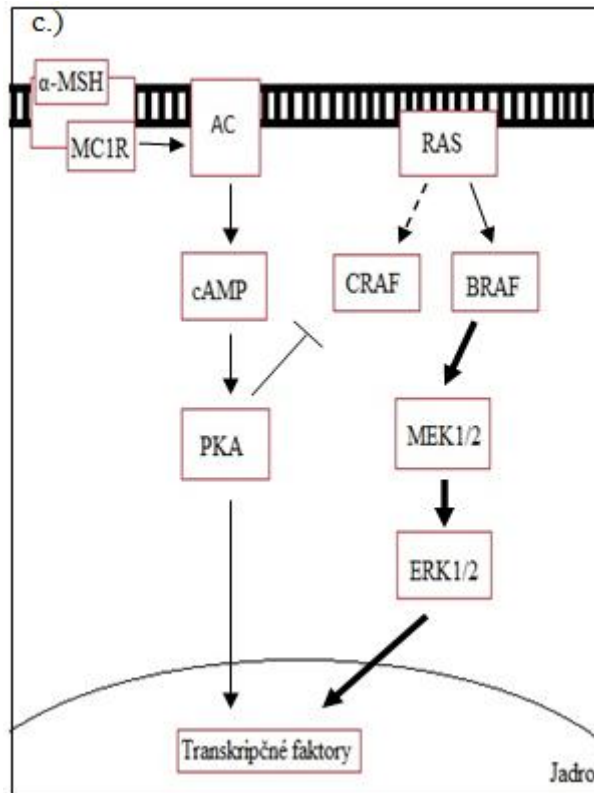
V melanómoch dochádza k častejším mutáciám *BRAF* v porovnaní s *RAS* mutáciami. Pri *RAS* mutáciách musí dôjsť k narušeniu signalizácie cAMP, zatiaľ čo pri *BRAF* mutáciách signalizácia cAMP narušená nie je. Kratšia a priamejšia cesta transformácie melanocytov spôsobuje, že v melanómoch je vyšší práve počet mutácií *BRAF* (Dumaz a kol, 2006).



Obr. 4a – Aktivácia MEK pri wt RAS



Obr. 4b – Aktivácia MEK pri mutovanom RAS



Obr. 4c – Aktivácia MEK pri mutovanom BRAF

Porozumieť účinkom signálnych dráh a vlastnostiam ich jednotlivých členov je esenciálny krok vo vývoji terapeutických postupov pre nádorové ochorenia. Pri vývoji nových liečiv je na základe týchto znalostí možné využiť cieľenú liečbu a zamerať sa tak na schopnosť liečiva inhibovať aktivitu konkrétneho génu spôsobujúceho mutáciu.

3. 3. 2 NÁDORY ŠTÍTNEJ ŽLÁZY

Štítna žľaza (*glandula thyroidea*) je dvojlaločný orgán umiestnený v krku. Jedná sa o najväčší endokrinný orgán v ľudskom tele, regulujúci metabolizmus produkciou hormónov, predovšetkým tyroxínu (T_4) a trijódtyronínu (T_3).

Výskyt rakoviny štítnej žľazy sa za posledné desaťročia zvyšuje. Rakovina štítnej žľazy je 8. najčastejšia zhubnosť u žien, dosahujúc hodnotu 3 % všetkých rakovín (Frasca a kol., 2008). V Českej republike sa za posledných 20 rokov výskyt rakoviny štítnej žľazy zvýšil takmer 4-násobne. V roku 2010 bol výskyt tohto ochorenia u žien v Českej republike približne 10 prípadov na 100 000 obyvateľov (Dušek a kol., 2005). Lukáš a kol. (2013) vo svojej štúdií

poukázali na rozdielny výskyt *BRAF* mutácie rakoviny štítnej žľazy v rôznych častiach Českej republiky.

Väčšinu nádorov štítnej žľazy tvoria karcinómy. Najbežnejšie typy karcinómov predstavujú dobre diferencované karcinómy (papilárny – PTC a folikulárny – FTC), málo diferencované karcinómy (PDTC), agresívne nediferencované karcinómy (anaplastické – ATC) a medulárne karcinómy štítnej žľazy (MTC) (Bendlová a kol., 2012). Pôvodne bolo usudzované, že *BRAF*^{V600E} mutácie sa v rakovine štítnej žľazy vyskytujú výlučne v papilárnych karcinómoch, pretože nebol potvrdený ich výskyt v zvyšných typoch karcinómov, ani benigných tumoroch. Nikiforova a kol. (2003) preukázali menej frekventovaný výskyt *BRAF*^{V600E} i v anaplastických a slabo diferencovaných karcinómoch.

Papilárne karcinómy (PTC) sú v štítnej žľaze najbežnejšie sa vyskytujúci typ karcinómov, tvoriaci približne 80 %. Genetické zmeny spôsobené bodovou mutáciou *BRAF* génu zodpovedajú za 40-70 % prípadov (Kimura a kol., 2003). U papilárnych karcinómov bola *BRAF* mutácia preukázaná vo všetkých štádiách progresie, vrátane mikrokarcinómov (30-50 %) (Frasca a kol., 2008).

Pre vysoké rozšírenie *BRAF* mutácií v papilárnych karcinómoch sa jedná o dôležitý marker pre prognózu a diagnostiku tumorov. Približne 20 % biopsií vykazuje neurčité cytologické nálezy, ktorými nie je možné určiť, či sa jedná o malígnu alebo benígny tumor (Sclabas a kol., 2003). Mutácia *BRAF*^{V600E} nebola detekovaná v benígnych nádoroch štítnej žľazy. Namba a kol. (2003) preukázali signifikantný vzťah medzi *BRAF* mutáciou a klinickým štádiom choroby. Rakovina štítnej žľazy s *BRAF* mutáciou je charakterizovaná ako pokročilý typ rakoviny s metastázami. *BRAF* mutácia sa vyskytuje i v opakovaně sa tvoriacich tumoroch i u pacientov v I. a II. štádiu choroby a vzdialených metastázach (Xing a kol., 2005). Samotná prítomnosť *BRAF* mutácie nemá výrazný vplyv na progresiu ochorenia (Lukáš a kol., 2013).

Aktiváciou *BRAF* a stimuláciou MAPK dráhy dochádza k inhibícii diferenciácie buniek štítnej žľazy. MAPK signálna dráha je fyziologicky aktivovaná väzbou rastových faktorov na kinázové receptory (RTK) ako je napr. RET, pričom ku zmenám v tejto dráhe dochádza na viacerých úrovniach, zahrňujúc *RET*, *RAS* a *BRAF* gény. Aktivované ERK MAPK dráhy translokujú do jadra, kde reguluje transkripciu génov zapojených do bunkovej diferenciácie a proliferácie.

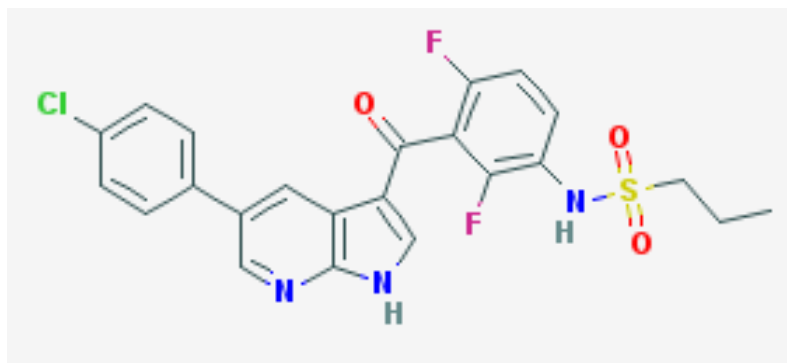
Translokáciou chromozómov môže dôjsť k fúzii génov, čím dochádza k tvorbe proteínu s onkogénnymi vlastnosťami (Chien a Koeffler, 2012). Zriedkavou genetickou zmenou, ktorá rovnako spôsobuje aktiváciu proteínu BRAF u štítnej žľazy, je *in vivo* fúzia *BRAF* génu s *AKAP9* génom prostredníctvom paracentrickej inverzie dlhého ramena chromozómu 7. Dochádza k fúzii exónov 1-8 *AKAP9* génu a exónov 9-18 *BRAF*. Vzniká rekombinantný *AKAP9-BRAF* onkogén, ktorý aktivuje kinázu. Vyskytuje sa predovšetkým v karcinómoch štítnej žľazy indukovaných radiáciou (Ciampi a kol, 2005).

3. 4 LIEČBA MALIGNÍT POMOCOU LÁTOK NAMIERENÝCH PROTI *BRAF*

3. 4. 1 LIEČBA MELANÓMU

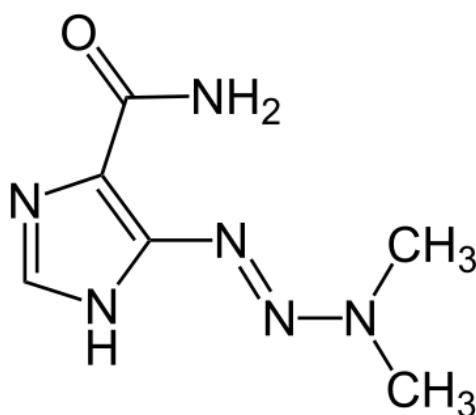
Metastázujúci melanóm je agresívne ochorenie, pre ktoré sa vyvíjajú nové možnosti liečby. Postup liečby malígneho melanómu závisí na type ochorenia, štádiu, v ktorom sa ochorenie vyskytuje, a takisto i na lokalizácii a veľkosti melanómu na tele. Základnou liečbou vo všetkých štádiách ochorenia je chirurgické odstránenie nádoru, v prípade agresívneho alebo pokročilého typu ochorenia nasleduje chemoterapia, rádioterapia, prípadne biologická cieľná liečba. Medzi schválené *BRAF*^{V600E} inhibítory u metastázujúcich melanómov patrí Vemurafenib a Dacarbazin.

Vemurafenib (Plexxikon - PLX4032, Zelboraf®) sa používa na liečbu malígnych melanómov s mutáciou *BRAF*^{V600E} (Chapman a kol., 2011). Názov pochádza od **V600E mutated BRAF inhibition**. Inhibuje kinázovú aktivitu *BRAF*^{V600E}, ruší signalizáciu MAPK dráhy a blokuje proliferáciu buniek s *BRAF*^{V600E}. Zároveň inhibuje rast a indukuje regresiu tumorových melanocytov (Chapman a kol., 2011). Liečba prebieha až do progresie ochorenia, prípadne rozvoja netolerovateľnej toxicity. Medzi nežiadúce účinky bola mimo iné zaznamenaná bolesť kĺbov, únava, bolesť hlavy, zmena chuti do jedla a nadmerné potenie. Komerčne používaný názov lieku je Zelboraf®.



Obr. 5 – Štruktúrny vzorec Vemurafenibu (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2012)

Dacarbazin (DTIC-Dome, imidazole carboxamide) je analóg purínu, ktorý pridáva alkylovú skupinu (C_nH_{2n+1}) na 7 atóm dusíku molekuly guanínu. Po schválení FDA je používaný ako chemoterapeutické agens na liečbu metastázujúceho melanómu. Priemerná hodnota doby prežitia bez progresie je datovaná na 6,4 mesiacov (Chapman a kol., 1999). Medzi najčastejšie nežiaduce účinky Dacarbazinu patrí nevoľnosť, zvracanie, strata chuti do jedla, bolesti v hrdle a krku.

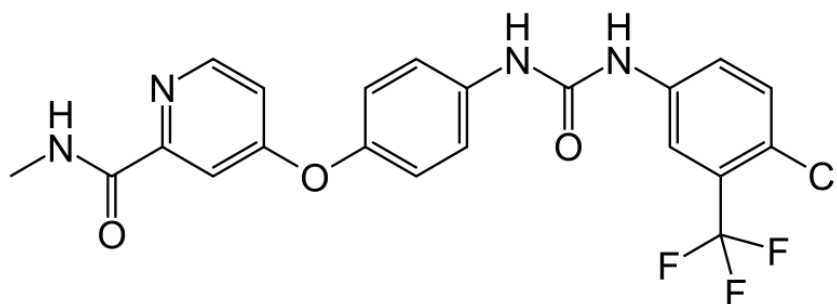


Obr. 6 – Štruktúrny vzorec Dacabrazinu (en.wikipedia.org, 2012)

3. 4. 2 LIEČBA NÁDOROV ŠTÍTNEJ ŽLÁZY

V terapii nádorov štítnej žľazy sa využíva chirurgické odstránenie štítnej žľazy, podávanie rádiojódiu, prípadne cieľená biologická liečba. Najčastejšie aplikovaným liečivom je Sorafenib.

Sorafenib (BAY43-9006) je inhibitor BRAF proteínu, ktorý sa využíva predovšetkým u pacientov s invazívnou alebo metastázujúcou fázou choroby, ktorí nereagujú na liečbu rádiojódom (Wilhelm a kol., 2004). Väzbou Sorafenibu sa $BRAF^{V600E}$ dostáva do inaktívnej konformácie, dochádza k blokácii signalizácie RAF kinázy a bunkovej proliferácii. V II. fáze klinických štúdií liečba Sorafenibom predĺžila priemerné prežívanie bez progresie na 79 týždňov (Gupta-Abramson a kol., 2008). Medzi nežiadúce účinky liečby patrí syndróm ruka-noha (palmárna a plantárna erytrodysézia), únava, tvorba vyrážok a vysoký krvný tlak.



Obr. 7 – Štruktúrny vzorec Sorafenibu (en.wikipedia.org, 2006)

3. 5 METÓDY POUŽÍVANÉ K DETEKCIÍ MUTÁCIÍ V GÉNE *BRAF*

3. 5. 1 SANGEROVA SEKVENAČNÁ METÓDA

Jedná sa o biochemickú metódu (označovanú ako „dideoxy“ metóda) umožňujúcu sekvencovanie až 1000 nukleotidových úsekov jednovláknovej DNA (Sanger a kol., 1977) prostredníctvom reakcie DNA polymerázy v zmesi s deoxynukleotidami (2'-deoxyribonukleozidtrifosfáty, dNTPs) a fluorescenčne označenými dideoxynukleotidami (2',3'-dideoxyribonukleozidtrifosfáty, ddNTPs). Dideoxynukleotid neobsahuje OH⁻ skupinu, na ktorú sa pripieňuje ďalší nukleotid, čím po svojom zabudovaní do reťazca zastavuje elongáciu reťazca DNA. Vzniká zmes rozlične dlhých reťazcov DNA, zakončených príslušným fluorescenčne značeným dideoxynukleotidom. Na elektroforéze (kapilárnej alebo vertikálnej polyakrylamidovej) je na základe ich poradia možné určiť sekvenciu nukleotidov vo vlákne DNA. Výsledkom je elektroforetogram spracovaný automatickým sekvenátorom.

3. 5. 2 PYROSEKVENCOVANIE

Pyrosekvencovanie je sekvencovacia metóda, počas ktorej dochádza ku kooperácii 4 enzýmov v priebehu syntézy reťazca DNA, pričom sa detekuje uvoľnený pyrofosfát (PPi) (Ronaghi a kol., 1996). DNA polymeráza katalyzuje hybridizáciu dNTPs k jednovláknovému reťazcu PCR templátu, pričom sa po ich inkorporácii uvoľňuje množstvo PPi. PPi je spolu s APS prostredníctvom enzýmu ATP sulfuryláza konvertovaný na ATP. Luciferáza využíva ATP na oxidáciu luciferínu na oxyluciferín, čím sa vytvára detekovateľný záblesk. Záblesk je spracovaný CCD kamerou a vo výslednom pyrograme sa zobrazí ako pík pre každý inkorporovaný nukleotid. Množstvo svetla je priamo úmerné množstvu pridaných nukleotidov. dNTPs, ktoré neboli inkorporované do reťazca, sú spolu s nadbytočnými ATP degradované apyrázou. Po ukončení degradácie dochádza k pridaniu ďalšieho dNTP. Jedná sa o rýchlu a citlivú metódu. Využíva sa na stanovenie sekvencie DNA a detekciu bodových mutácií, ako je napr. *BRAF*^{V600E} (Spittle a kol., 2007). Pyrosekvencovanie je však limitované krátkou dĺžkou sekvenovateľného DNA templátu a má sklony na chybovanie pri sekvencii homopolymérov.

3. 5. 3 REAL-TIME PCR

Metóda Real-Time PCR (označovaná ako qPCR) vychádza z princípu klasickej PCR, ale amplifikácia fluorescenčne značenej DNA je monitorovaná počas každého cyklu, tzv. v reálnom čase.

Využívané fluorescenčné substráty delíme do dvoch skupín:

1. Nešpecifické – (napr. SYBR® Green) kde dochádza k nešpecifickej väzbe fluorofóru na dsDNA.
2. Špecifické – (napr. TaqManTM) využívajú duálne značené ss sondy, ktoré sa viažu k vláknku DNA a využívajú princíp FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) medzi molekulou zhášaču (quencher – Q) na 3'konci a fluorescenčného farbiva (fluorofor – F) na 5'konci sondy. Keď je sonda v intaktom stave, obe značky sú umiestnené v tesnej blízkosti, pričom Q pohlcuje žiarenie emitované F. Počas

hybridizácie dochádza k oddeleniu značiek, ukončeniu zhášania a zvýšeniu fluorescenčnej aktivity reportéru.

V porovnaní s klasickou PCR sa jedná o presnejšiu metódu, ktorá monitoruje množstvo amplifikonu počas každého kroku. Automatizácia qPCR umožňuje využiť software, v ktorom dochádza ku spracovaniu výsledkov. V porovnaní so spracovaním produktov na elektroforéze u klasickej PCR dochádza k nižšiemu riziku kontaminácie, pretože sa po amplifikácii neotvára skúmavka.

Cobas 4800 *BRAF*^{V600E} Mutation Test

Kit cobas® 4800 (Roche) umožňuje testovanie mutácie *BRAF*^{V600E} pomocou PCR v reálnom čase, pričom využíva komplementárne primery a dve oligonukleotidové sondy, ktoré sú označené 2 rôznymi fluorescenčnými farbivami. Jedna sonda umožňuje detekciu sekvencie wt *BRAF* a druhá mutovanú sekvenciu V600E. TaqMan sondy s rozličnými fluorescenčnými farbivami sú naviazané na wt *BRAF* sekvenciu (GTG) a mutovanú sekvenciu (GAG). V prípade wt sekvencie dochádza k emisii jedného fluorescenčného signálu, zatiaľ čo pri detekcii mutovanej sekvencie sú emitované dva odlišné fluorescenčné signály. Počas testu nedochádza ku amplifikácii celého génu, miesto toho sa využívajú primery poskytujúce amplikón o dĺžke 116 bp génu *BRAF* v exóne 15. Výhodou testu je vysoká citlivosť detekcie *BRAF*^{V600E} a relatívne malé množstvo potrebnej DNA – odpovedajúce FFPE rezu o veľkosti 5 µm (Lade-Keller a kol., 2013).

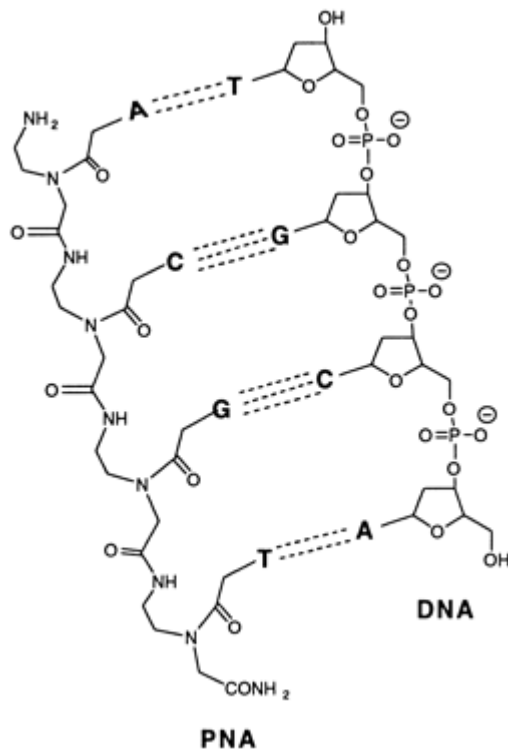
Detekcia mutácií zabrzením amplifikácie (Amplification Refractory Mutation System, ARMS)

ARMS je detekčná metóda, ktorá umožňuje detekciu malých delécií alebo bodových substitúcií (Newton a kol., 1989). ARMS je modifikovaná varianta AS-PCR (alelovo špecifická PCR). ARMS test pozostáva z dvoch jednotlivých reakcií, pričom jedna špecificky detekuje wt sekvenciu DNA a druhá reakcia detekuje mutovanú sekvenciu DNA. Špecifita je daná 3' koncom primeru, ktorý sa buď dokonale páruje s cieľovou sekvenciou a umožní amplifikáciu, alebo nepáruje s cieľovou sekvenciou a amplifikáciu zabrzdí. K reakcii

nedochádza, ak nie je úsek templátovej DNA komplementárny k 3' koncu primeru. Ak vyšetovaná DNA obsahuje mutovanú sekvenciu, amplifikácia prebieha normálne. V prípade wt DNA primer nenasadne a nedochádza k amplifikácii. Test využíva DNA polymerázu (najčastejšie *Taq*), ktorá nemá korektorskú funkciu (3'→5' exonukleázovú aktivitu). ARMS test prebieha s vnútornou PCR kontrolou, druhým primerovým párom, zakončeným iným fluoroforom a cieleným na konzervatívnu (nepolymorfnú) sekvenciu genómu. Vnútorná kontrola poskytne amplifikačný signál vždy, ak je templátová DNA prítomná v reakcii a systém funguje. Jedná sa o citlivú metódu, umožňujúcu detekciu *BRAF* mutácie s citlivosťou 1 % (Ellison a kol., 2010).

PNA Clamp

PNA (peptidová nukleová kyselina) je umelo syntetizovaný polymer podobný DNA a RNA. Kostra PNA pozostáva z opakujúcich sa N-(2-aminoethyl)-glycínových jednotiek spojených peptidovou väzbou. Keďže kostra PNA neobsahuje nabitú fosfátovú skupinu, väzba medzi PNA a DNA vláknom je silnejšia než medzi dvoma vláknami DNA kvôli nedostatku elektrostatického odporu (Obr. 8).



Obr. 8 – Väzba PNA a DNA (Physics Forums, 2010)

V priebehu qPCR sa PNA oligomery silno viažu na komplementárne DNA jedine v prípade, úplnej zhody ich reťazcov. PNA oligomery sú rezistentné na degradáciu enzýmov, pretože nedochádza k ich rozpoznaní nukleázami a proteázami. Nie je možné ich využiť ako primery v qPCR. PNA teda slúži ako svorka, ktorá zabraňuje amplifikácii počas PCR. Pokiaľ je v sledovanom géne mutácia *BRAF*, dochádza k destabilizácii DNA/PNA duplexu. Výsledkom je pozitívna reakcia v qPCR, dochádza teda ku amplifikácii vzoriek s mutovanou sekvenciou, zatiaľ čo wt alela nie je amplifikovaná. PNA Clamp umožňuje rýchlu detekciu *BRAF* mutácie (do 3 hodín) s vysokou citlivosťou (1 %) aj pri malom množstve DNA (10 – 25 ng) (Panagene, 2009).

CADMA (Competitive Amplification of Differentially Melting Amplicons)

Metóda CADMA umožňuje rýchle stanovenie mutačného statusu prostredníctvom HRM (High-Resolution Melting) analýzy v realtime cykléri priamo po ukončení behu. Jedná sa o špecifickú detekciu mutantných sekvencií s citlivosťou približne 0,5 % (Kristensen, a kol., 2012). CADMA prebieha v uzavretom systéme bez použitia značených oligonukleotidov. Princíp spočíva v simultánnej amplifikácii wt a mutovaných sekvencií za použitia troch odlišných primerov. Prvý primer je navrhnutý na amplifikáciu iba mutovaných sekvencií tak, aby T_m bolo nižšie než pre wt amplicon. Druhý, prekrývajúci sa primer, amplifikuje wt aj mutované sekvencie a viaže sa na rovnaký úsek ako primer špecifický k mutácii. V kombinácii s tretím (opačne smerovaným) primerom vznikajú dva odlišné amplicóny s odlišnými vlastnosťami topenia (poskytujúci dva píky v profile topenia) medzi wt a mutovanou sekvenciou. Za použitia detekčného programu HRM je možné vykonať veľmi citlivú detekciu i nízkeho množstva mutácie vo vzorke.

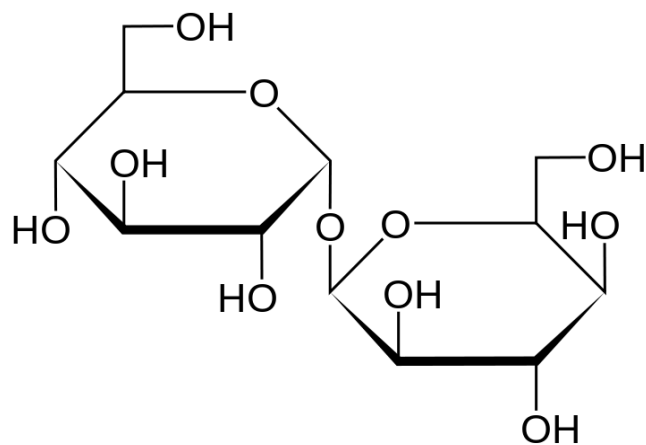
3. 6 UCHOVANIE REAGENCIÍ V TREHALÓZE

Uchovanie štruktúrnej a funkčnej integrity biologických molekúl je dôležitou požiadavkou v molekulárno-biologickom výskume a zároveň je i stabilita reagensí dôležitou požiadavkou pre typizačné súpravy. Stabilizačné vlastnosti boli preukázané u PCR mixov obsahujúcich prídavky Tris-EDTA pufru (Smiths a kol., 2005), NP-40 (Zhang a kol., 2010), trehalózy (Colaco a kol., 1992) ai.

Tris-EDTA pufoer (označovany ako TE pufoer) je zložený z Tris ((tris(hydroxymethyl) aminometan), umožňujúci stabilizáciu pH a EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina), ktorý umožňuje stabilizáciu väzbou bivalentných katiónov Mg^{2+} , čím blokuje aktivitu Dnázy, ale aj aktivitu DNA polymerázy, takže nie je vhodné ho do reakcie pridávať.

NP-40 je neionizujúci detergent, ktorý stabilizuje *Taq*-polymerázu, prekonaním inhibičného efektu silných ionizujúcich detergentov, ktoré mohli zostať v DNA ako zvyšok extrakčných reagentov.

Trehalóza (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoide) je neredukujúci disacharid, ktorého štruktúru tvoria dve molekuly D-glukózy, ktoré sú spojené α, α -1,1-glykosidovou väzbou (Spiess a kol., 2004) (Obr.9).



Obr. 9: Haworthova projekcia trehalózy (en.wikipedia.org, 2007)

3. 6. 1 VLASTNOSTI TREHALÓZY

Trehalóza sa nachádza v množstve organizmov, u ktorých sa v životných cykloch vyskytujú extrémne vysoké teploty, chlad, oxidácia, ionizujúce žiarenie, a u ktorých dochádza ako súčasť životného cyklu k ich takmer totálnemu vysušeniu. Jedná sa o kryptobionty, ktoré pretrvávajú mnoho rokov v nečinnom, tzv. ametabolickom stave, a následne sú schopné svojho úplného zotavenia rehydratáciou. Tento jav je označovany ako anhydrobióza. Schopnosť kryptobiotických organizmov akumulovať vysoké množstvo trehalózy vyjadruje

ich toleranciu na stresové podmienky, predovšetkým na totálne vysušenie. Trehalóza je charakteristická stabilitou pri vystavení extrémnym teplotám (Carnici a kol., 1998). Trehalóza pomáha organizmom zachovať ich bunkovú integritu, čím dochádza k ich stabilizácii počas doby vysušenia.

Pri interakcii trehalózy s molekulami vody sa vytvára pevnejšia väzba, než pri interakcii dvoch molekúl vody (Branca a kol., 2005). Funkcia trehalózy pôsobí mimo úlohy termostabilizátora aj ako v roli termoprotektora, pričom zlepšuje aktivitu enzýmov (Carnici a kol., 1998).

3. 6. 2 STABILIZAČNÁ FUNKCIA TREHALÓZY

Trehalóza je schopná premieňať nestabilné enzýmy na suché stabilné reagentie.

Princíp stabilizácie nie je presne jasný, pravdepodobný účinok popisujú dve teórie:

- a.) Teória nahradenia vody (water replacement theory) – konformácia proteínov je závislá na ich interakcii s vodou prostredníctvom vodíkových väzieb. Trehalóza je, podobne ako ďalšie polyoly, schopná vytvoriť vodíkové väzby. Počas obdobia vysušenia trehalóza vytvára vodíkové väzby, čím dochádza k nahradeniu molekúl vody, tvorbe terciálnych štruktúr biologických molekúl a teda ich stabilizácii. V prítomnosti trehalózy zároveň výrazne klesá dynamika vody (Colaco a kol., 1992; Grasmeyer a kol., 2013).
- b.) Sklená teória (vitrification theory, glassy state theory) – trehalóza po vysušení vytvára štruktúru pripomínajúcu sklo. Roztoky trehalózy transformovaním na sklenú štruktúru komplikujú pohyb a teda aj degradáciu molekúl. Teória je označovaná aj ako vitrifikačná teória, práve kvôli zoskleneniu trehalózy. Vytvorením viskóznej sklenej štruktúry je proteín (resp. bunka) ochránený pred abiotickým stresom (Colaco a kol., 1992; Grasmeyer a kol., 2013). Trehalóza má spomedzi všetkých disacharidov najvyššiu teplotu skleneného prechodu (T_g). Po pridaní vody dochádza k zníženiu T_g a zvýšeniu pohyblivosti molekúl (Liu a kol., 1997).

3. 6. 3 VYUŽITIE TREHALÓZY V PCR

Trehalóza dokáže stabilizovať sekundárnu štruktúru DNA. Špecifické vlastnosti spočívajú v schopnosti trehalózy znižovať teplotu topenia (T_m) DNA a stabilizovať *Taq* polymerázu (Horáková a kol., 2011). Zároveň účinne neutralizuje PCR inhibítory a umožňuje amplifikovať aj ťažšie amplifikovateľné templáty DNA (tj. úseky s vysokým obsahom GC) (Spiess a kol., 2004). Trehalózu je práve vďaka jej unikátnym vlastnostiam možné pridať do PCR mixu a stabilizovať PCR reakciu. Schopnosť trehalózy stabilizovať reagentie umožňuje vytvoriť jednoduché pre-alikvótne kity PCR reakcií.

Smith a kol. (2005) porovnali výnos PCR reakcií obsahujúcich PCR mix s trehalózou pridanou tesne pred PCR reakciou a PCR mix bez pridanej trehalózy. Konečné množstvo ampliconu bolo rovnaké v oboch prípadoch. Smith a kol. (2005) následne testovali účinok vysušenej trehalózy na PCR reakciu. Porovnaním PCR mixu bez trehalózy, s trehalózou pridanou tesne pred PCR reakciou a s vysušenou trehalózou uskladnenou po dobu 6 mesiacov zaznamenali signifikantne lepšie výsledky amplifikácie a mixe s vysušenou trehalózou.

3. 7 CERTIFIKÁCIA GENOTYPIZAČNÝCH DIAGNOSTÍK

3. 7. 1 CE ZNAČKA

Označenie CE (z franc. CONFORMITÉ EUROPÉENNE) dokladuje, že výrobok spĺňa normy EU (bezpečnosť, ochrana zdravia a životného prostredia ai.) a požiadavky nariadené vládou pred jeho uvedením na trh Európskeho hospodárskeho priestoru. CE značka však neznamená, že výrobok bol vyrobený výhradne v EU a neznamená iba značku kvality. Vyjadruje zhodu vlastností výrobku s požiadavkami Smernice Rady 98/79/ES a nariadenie vlády NV 453/3004 Sb (Friedecký a Kratochvíla, 2005). Vizuálna podoba značky je presne daná, a musí byť lokalizovaná priamo na výrobku, obale, záručnom liste a užívateľskom manuáli. Značka musí byť jasne čitateľná, viditeľná a nezmazateľná.

3. 7. 2 CERTIFIKÁCIA *IN VITRO* DIAGNOSTÍK

Pod pojmom *in vitro* diagnostika (IVD) rozumieme detekciu ochorenia vykonanú mimo živý organizmus, najčastejšie v skúmavke, sklenenej miske na živnej pôde, podložnom skle ai. Laboratórne vyšetrenia je možné vykonávať jedine certifikovanými a akreditovanými testami. Certifikácia IVD musí obsahovať spôsob posúdenia zhody (tzn. výrobok spĺňa stanovené požiadavky a je v zhode s EU a CZ legislatívou pre ZP), podľa ktorého je vydané ES prehlásenie o zhode a následné označenie produktu CE značkou, čím sa dokladuje priama zodpovednosť výrobcov za kvalitu ich výrobku. Validácia a následná verifikácia je vykonaná výrobcom (laboratóriom) rovnakým postupom aký je tvorený platným SOP (Standard operating procedure). Počas testovania sa pracuje s certifikovaným materiálom, laboratórnym referenčným materiálom, príp. vzorkou z externého porovnávania kvality o známom výsledku vyšetrenia, pričom sa nevyužívajú zastarané metódy. Validácia má za cieľ potvrdenie, že stanovené požiadavky boli preskúmané a splnené. Cieľom verifikácie je zhromaždenie dostatočného množstva údajov, ktoré overí správnosť a vhodnosť metódy. Pre zisk CE-IVD je mimo iné potrebné vypracovať riadenú dokumentáciu, SOP, vykonať testovanie citlivosti a stálosti. Všetci výrobcovia sú povinní registrácie na Ministerstve zdravotníctva ČR a podať informácie o distribúcii IVD.

Výrobca je povinný pre CE-IVD po prvý krát doručiť na Ministerstvo zdravotníctva ČR nasledovné formuláre (Kráľ a kol., 2011) :

- Formulár 453/11-1 pre oznámenie osoby ponakladajúcej s IVD
- Formulár 453/12-1 pre oznámenie osoby ponakladajúcej s IVD
- Formulár 453/12-2 pre plnenie oznamovacej povinnosti – evidencia podľa GMDN
- Formulár 453/12-3 pre plnenie oznamovacej povinnosti – evidencia podľa UMDNS
- Formulár 453/12-4 pre plnenie oznamovacej povinnosti – evidencia výrobcov distribuovaných ZP

Následne pri každom oznámení nového IVD je na Ministerstvo zdravotníctva ČR potrebné dodať:

- Návod na použitie
- Prehlásenie o zhode
- Hodnotenie funkčnej spôsobilosti / klinické hodnotenie
- Formulár 453/13-1 – evidencia ZP
- Formulár 453/13-2 – zoznam členských štátov, v ktorých je/bude IVD distribuované
- Vzor obalu

4. MATERIÁL

4.1 PRÍSTROJE A POMÔCKY

- Termocyklér umožňujúci PCR analýzu v reálnom čase LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, USA)
- Laminárny Box Mars Safety Classe 2 (LaboGene, Denmark)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Germany)
- Centrifuga Centrifuge 5430 (Eppendorf, Germany)
- Centrifuga Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf, Germany)
- Vortex mixer VX-200 (Labnet, USA)
- Chladnička a mraziak (Liebherr, Germany)
- Mraziaci box Ultra Low Temperature Freezer C340-88 (New Brunswick Scientific, USA)
- Stojan na pipety (Eppendorf, Germany)
- 0,1 – 2,5 µl pipeta (Eppendorf, Germany)
- 0,5 – 10 µl pipeta (Eppendorf, Germany)
- 2 – 20 µl pipeta (Eppendorf, Germany)
- 10 – 100 µl pipeta (Eppendorf, Germany)
- 20 – 200 µl pipeta (Eppendorf, Germany)
- 100 – 1000 µl pipeta (Eppendorf, Germany)
- Stojan PCRack s viečkom (P-LAB, ČR)
- Chladiaci stojan na skúmavky 1,5 ml (P-LAB, ČR)
- Chladiaci stojan na mikroskúmavky (Eppendorf, Germany)
- Plastová nádoba Quarsar (Lunex, UK)

4.2 SOFTWARE

- LightCycler 480 SW 1.5 (Roche, USA)
- Statistica v7.0 (StatSoft Inc.)
- COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer
- Microsoft Office Word (Microsoft Corporation, USA)
- Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, USA)

4. 3 SPOTREBNÝ MATERIÁL

- Mikroskúmavky EU Thin-wall 8-tube strip 0,2 ml (BIOplastics, Netherlands)
- Viečka EU Optical Wide Area 8-cap strip (BIOplastics, Netherlands)
- PCR skúmavky 1,5 ml (Axygen, USA)
- 10 µl špičky s dvojitým filtrom (Eppendorf, Germany)
- 20 µl špičky s dvojitým filtrom (Eppendorf, Germany)
- 100 µl špičky s dvojitým filtrom (Eppendorf, Germany)
- 200 µl špičky s dvojitým filtrom (Eppendorf, Germany)
- 1000 µl špičky s dvojitým filtrom (Eppendorf, Germany)
- Ochranné rukavice NITRILE (Eurotubo© Deltalab, Spain)
- Alobal
- Desikačné guličky

4. 4 CHEMIKÁLIE A REAGENCIE

- DEPC ošetrená voda
- 1,5 M trehalóza
- Tween20 (1%)
- 10 x PCR pufor
- 25 mM roztok MgCl₂
- 25 mM dNTPs
- 5U/µl Thermo Start DNA polymeráza (ThermoScientific, USA)
- 100 µM primerová zmes č. 408 (557, 678, 681)
- 100 µM primerová zmes pre vnútornú kontrolu β-globin č. 337 (576, 577, 574)
- DNA Sample Preparation Kit Cobas R09603 (Roche, USA)

Sekvencie použitých primerov nie sú kvôli ochrane autorských práv súčasťou práce.

4. 5 BIOLOGICKÉ VZORKY

Použitým biologickým materiálom bola DNA izolovaná z bunkových línií a DNA pacientov pochádzajúca z FN Olomouc. Na izoláciu DNA bol použitý izolačný kit DNA Sample Preparation Kit. Izolácia DNA pacientov bola vykonaná laborantkami Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (ďalej ÚMTM). Pre testovanie *BRAF* statusu pacientov bolo získané povolenie etickej komisie v rámci práce na grante MPO TIP FR-TI1/525 a vzorky boli anonymizované štvorčíselným MG kódom.

Zoznam všetkých použitých vzoriek DNA je uvedený v Tabuľkách 9; 10 a 11.

5. METÓDY

5. 1 NÁVRH PRIMEROV

Sekvence použitéch primerov boli navrhnuté doc. Mgr. Drábkom, PhD. a Ing. Marcelou Staňkovou.

5. 2. LABORATÓRNE PROTOKOLY PRÍPRAVY PCR MIXU, NANÁŠANIE NA DOŠTIČKU A PRÍDAVOK TEMPLÁTOVEJ DNA

Všetky použité reagentie boli rozmrazené, premiešané na vortexe a stočené na centrifúge. Následne boli napipetované do PCR mixu.

Použitý PCR mix pozostával z:

- 10x PCR pufoer riedený na výslednú koncentráciu 10x
- MgCl₂ riedený na výslednú koncentráciu 16,6x
- Zmes dNTPs riedených na výslednú koncentráciu 125x
- Primer pre vnútornú kontrolu β -globin č. 337 riedený na výslednú koncentráciu 500x
- Primer č. 408 riedený na výslednú koncentráciu 100x
- Thermo *Taq* polymeráza riedená na výslednú koncentráciu 100x
- DEPC ošetrená voda doplnená na výsledný objem

Do PCR mixu boli reagentie napipetované podľa rozpisu uvedeného v Tabuľke 1 v objeme o množstve stanovenom podľa nasledovného vzorca:

$$x \cdot 1,17 \cdot y$$

kde: x – značí počet vzorkov

1,17 – značí vopred stanovený faktor

y – značí celkový objem

Tabuľka 1: Rozpis reagensii PCR mixu pre detekciu *BRAF* s globínom

x . 1,17 . y		
Reagencie	Riedenie	Výpočet
H₂O		
10x PCR buffer	10x	
MgCl₂	16,6x	
25 mM dNTPs	125x	
PM 337	500x	
PM 408	100x	
Thermo <i>Taq</i> polymeráza	100x	
	Celkom	

Výsledný objem PCR mixu bol stanovený na 10 µl. Po napipetovaní všetkých reagensii uvedených v Tabuľke 1 do 1,5 ml PCR skúmavky bol odobraný objem 9,5 µl a prenesený do 8-jamkovej skúmavky uloženej na doštičke. Na výsledný objem 10 µl bolo následne doplnených 0,5 µl DNA nezávisle na jej koncentrácii. Do každého experimentu bola zaradená voda ako negatívna kontrola. Doštička obsahujúca vzorky bola stočená na centrifúge a vložená do LC 480. Program na LC 480 zostával z nasledujúcich krokov (uvedený v Tabuľke 2):

Tabuľka 2: Program LC 480 umožňujúci detekciu *BRAF* (LC BRAF_2)

Názov programu	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (hh:mm:ss)	Rýchlosť nájazdu (°C/s)
Denaturácia	1	95°C	00:15:00	4,4
PCR amplifikácia	50	95°C	00:00:15	4,4
		65°C	00:00:50	2,2
		72°C	00:00:20	4,4
Ukončenie	1	37°C	00:00:01	2,2

5. 2. 1 PRACOVNÝ PROTOKOL DETEKČIE MUTAČNÉHO STATUSU DNA

Postupom uvedeným v kapitole 5. 2 bolo testovaných 41 vzoriek DNA s neznámym mutačným statusom. Do reakcie bola zaradená vzorka s prídavkom H₂O, ktorá slúžila ako negatívna kontrola. Vo výsledku bolo teda analyzovaných 42 vzoriek. Výsledné objemy PCR reagensí pre 42 vzoriek sú uvedené v Tabuľke 3.

Tabuľka 3: Rozpis reagensí PCR mixu na detekciu mutačného statusu *BRAF*

x . 1,17 . y		
Reagencie	Riedenie	Výpočet (μl)
H₂O		373,1
10x PCR buffer	10x	49,1
MgCl₂	16,6x	29,9
25 mM dNTPs	125x	3,9
PM 337	500x	1,0
PM 408	100x	4,9
Thermo Taq polymeráza	100x	4,9
	Celkom	466,8

5. 2. 2 PRACOVNÝ PROTOKOL DETEKČIE *BRAF* ZA POUŽITIA NATÍVNYCH REAGENCIÍ

Pracovným postupom popísaným v kapitole 5. 2 bol zostavený rozpis reagensí uvedený v Tabuľke 4. Reagencie boli čerstvo pripravené (natívne) a v ďalších pokusoch označené ako mokré. Pokus bol pre následnú štatistickú analýzu vykonaný trikrát. V prvom pokuse bolo testovaných 22 vzoriek a vzorka negatívnej kontroly obsahujúca vodu (celkovo 23 vzoriek). Počas prebiehajúcich experimentov došlo k vyčerpaniu obsahu vzorky DNA s číslom 6482, čím došlo k úprave pracovného rozpisu reagensí (viď Tabuľka 5). Vo zvyšných pokusoch teda bolo analyzovaných celkovo 22 vzoriek.

Tabuľka 4: Rozpis reagentí na detekciu *BRAF* pre 23 vzoriek

x . 1,17 . y		
Reagencie	Riedenie	Výpočet (μl)
H₂O		204,3
10x PCR buffer	10x	26,9
MgCl₂	16,6x	16,4
25 mM dNTPs	125x	2,2
PM 337	500x	0,5
PM 408	100x	2,7
Thermo <i>Taq</i> polymeráza	100x	2,7
	Celkom	255,6

Tabuľka 5: Rozpis reagentí na detekciu *BRAF* pre 22 vzoriek

x . 1,17 . y		
Reagencie	Riedenie	Výpočet (μl)
H₂O		195,4
10x PCR buffer	10x	25,7
MgCl₂	16,6x	15,6
25 mM dNTPs	125x	2,1
PM 337	500x	0,5
PM 408	100x	2,6
Thermo <i>Taq</i> polymeráza	100x	2,6
	Celkom	244,5

5. 2. 3 PRACOVNÝ PROTOKOL TVORBY SUŠENÉHO MIXU

Sušený PCR mix obsahoval:

- 1,5 M trehalóza riedená na optimálnu výslednú koncentráciu 0,2 M
- 10x PCR pufor riedený na výslednú koncentráciu 10x
- $MgCl_2$ riedený na výslednú koncentráciu 16,6x
- Zmes dNTPs riedených na výslednú koncentráciu 125x
- Primer pre vnútornú kontrolu β -globin č. 337 riedený v pomere 0,3 μM primeru č. 576/ 0,3 μM primeru č. 577 / 0,06 μM primeru č. 574
- Primer č. 408 riedený v pomere 1 μM primeru č. 577/ 1 μM primeru č. 678 / 0,2 μM primeru č. 681
- Thermo *Taq* polymeráza riedená na výslednú koncentráciu 100x
- DEPC ošetrenú vodu doplnenú na výsledný objem

Podľa rozpisu uvedeného v Tabuľke 6 bol stanovený objem reagencií pre 96 vzoriek sušeného mixu.

Tabuľka 6: Rozpis reagencií PCR mixu pre tvorbu sušeného koktejlu

Reagencie	Riedenie (konečná koncentrácia)	Výsledný objem (μl)
H ₂ O		302,4
Trehalóza 1,5 M	0,2 M	249,6
PCR pufor 10x	1x	187,2
$MgCl_2$	1,5 mM	112,8
Tween20 1%	0,01%	18,72
dNTPs 25 mM	0,2 mM	14,96
PM 408	(1/ 1/ 0,2 μM)	37,44
PM 337	(0,3/ 0,3/ 0,06 μM)	12,48

Mix bol vytvorený v júni 2012. Reagencie uvedené v Tabuľke 6 boli premiešané a rozpipetované do 8-jamkových skúmaviek po objeme 5 μl . Následne boli vzorky usušené vo

vákuovej centrifúge pri teplote max 37°C až do okamžiku, pokým sa na povrchu vzoriek vytvorila štruktúra pripomínajúca sklo. Vzorky boli za izbovej teploty uložené v plastovej nádobe v prítomnosti desikačných guličiek. Pred svetlom boli vzorky chránené alobalom neprepúšťajúcim svetlo.

Pracovný postup bol vykonaný za pomoci Miroslavy Rabčanovej.

5. 2. 4 PRACOVNÝ PROTOKOL DETEKČIE *BRAF* ZA POUŽITIA SUCHÝCH REAGENCIÍ, NANÁŠANIE NA DOŠTIČKU A PRÍDAVOK DNA

Keďže pri tvorbe PCR mixu boli použité reagentie usušené a uchované v prítomnosti trehalózy, PCR mix bol označovaný ako suchý. Podobne ako pri detekcii mokrého mixu, bolo analyzovaných 23 vzoriek (Tabuľka 7), pričom v druhom a treťom opakovaní bolo pre nedostatok DNA 6482 analyzovaných 22 vzoriek (Tabuľka 8). Do ďalšej samostatnej PCR skúmavky bola napipetovaná *Taq* polymeráza (o objeme 0,21 µl na 1 vzorku) a voda ošetrená DEPC (10 µl na 1 vzorku), ktoré boli zmiešané na vortexe a stočené na centrifúge. Následne bol z daného mixu odobraný objem 8,75 µl, ktorý bol pridaný ku sušenému mixu obsahujúcemu reagentie uvedené v Tabuľke 6. Do 8-jamkových skúmaviek bola nakoniec pridaná vzorka DNA o objeme 0,25 µl nezávisle na jej koncentrácii. Všetky skúmavky boli zmiešané na vortexe, stočené na centrifúge a vložené do LC 480. Vzorky boli analyzované programom LC BRAF_2 uvedenom v Tabuľke 2.

Tabuľka 7: Prídavok reagentí k sušenému PCR mixu pre 23 vzoriek

Reagentie	Riedenie	Výpočet (µl)
H ₂ O		230
Thermo <i>Taq</i> polymeráza	100x	4,83
	Celkom	234,83

Tabuľka 8: Prídavok reagensí k sušenému PCR mixu pre 22 vzoriek

Reagencie	Riedenie	Výpočet (μl)
H₂O		220
Thermo <i>Taq</i> polymeráza	100x	4,62
	Celkom	234,83

Časť experimentov bola vykonaná za pomoci Veroniky Holinkovej, DiS.

6. VÝSLEDKY

6.1 URČENIE MUTAČNÉHO STATUSU VYBRANÝCH VZORIEK DNA

U 41 vybraných nedetekovaných vzoriek DNA bol určený ich mutačný status pre *BRAF*, pričom rozpis jednotlivých reagensii použitý pre vzorky je uvedený v Tabuľke 3. Vzorky boli analyzované v LC 480. Výsledky porovnania sú uvedené v Tabuľke 9. U 41 vzoriek s neznámym mutačným statusom bola detekovaná prítomnosť resp. neprítomnosť mutácie *BRAF*, a určený mutačný status bol následne porovnaný s medzinárodnou databázou COSMIC.

Vzorky boli hodnotené na základe rozdielnych hodnôt amplifikácie (ΔC_p). C_p (crossing point, označovaný aj ako C_t) je charakterizovaný ako moment nahromadenia produktu, kedy dochádza k zvýšeniu množstva fluorescence nad pozadím. Štatistická analýza sledovala hodnoty prekročenia prahovej fluorescence (C_p) medzi signálom FAM (*BRAF*, $\lambda = 465 - 510$ nm) a signálom JOE (globin, $\lambda = 533 - 580$ nm). Ako pozitívny výsledok (mutácia preukázaná) bola braná záporná hodnota ΔC_p ($\Delta C_p < 0$) až $\Delta C_p = +6$. Ako štandardná vzorka bez mutácie bola braná hodnota ΔC_p väčšia ako 9. Hodnota ΔC_p v rozmedzí 6 až 9 je označená ako neurčitá. V prípade ak sa hodnota C_p signálu FAM rovnala 0, bola hodnota cenzurovaná na hodnotu 46. Vzorka obsahujúca prídavok vody bola braná ako negatívna kontrola, ktorá sa v testoch prejavila bez signálu, teda $\Delta C_p = 0$.

Tabuľka 9: Stanovenie mutačného statusu pre *BRAF* u 41 vzoriek DNA

DNA	Názov	Mutačný stav BRAF- ÚMTM	Mutačný stav BRAF- COSMIC
6457	HTC116p53(R248W/-)	nepreukázaný	nie je v databázi
5402	A549	nepreukázaný	nepreukázaný
5403	BT549	nepreukázaný	nepreukázaný
5404	4T1-12B	nelze	nie je v databázi
5405	K-562	nepreukázaný	nepreukázaný
5406	K-562-Tax	nepreukázaný	nepreukázaný

Tabuľka 9: Stanovenie mutačného statusu pre <i>BRAF</i> u 41 vzoriek DNA			
5407	CEM-VCR Bulk	nelze	nie je v databázi
5408	A549-Boh	nepreukázaný	nepreukázaný
5410	UACC-62	V600E	V600E
5411	HTC116p53MUT	nepreukázaný	nie je v databázi
5412	M14	V600E	V600E
5413	MRC-5	nepreukázaný	nie je v databázi
5415	HTC116p53WT	nepreukázaný	nie je v databázi
5416	DU-145	nepreukázaný	nepreukázaný
5417	MCF-7	nepreukázaný	nepreukázaný
5418	CEM-Boh	nepreukázaný	nie je v databázi
5419	CEM-DNR	nelze	nie je v databázi
5420	HL-60(TB)	nepreukázaný	nepreukázaný
5421	SK-MELS5	V600E	V600E
5423	HCT-116	nepreukázaný	nepreukázaný
5424	KM 12	nepreukázaný	nepreukázaný
5425	COLO-205	V600E	V600E
5426	A549	nepreukázaný	nepreukázaný
5427	MDA-MB-468	nepreukázaný	nepreukázaný
5428	A549-VCR	nepreukázaný	nepreukázaný
5429	KM 12	V600E	nepreukázaný
5430	COLO-205	V600E	V600E
6446	SW620	nepreukázaný	nepreukázaný
6455	PC-3	nepreukázaný	nepreukázaný
6458	OVCAR-4	nepreukázaný	nepreukázaný
6509	HCT116p53(R248W/+)mutant K1	nepreukázaný	nepreukázaný
6510	HCT116p53(R248W/+)mutant K1	nepreukázaný	nepreukázaný
6511	HCT116K-ras +/-	nepreukázaný	nepreukázaný

Tabuľka 9: Stanovenie mutačného statusu pre <i>BRAF</i> u 41 vzoriek DNA			
6512	HCT116 parental	nepreukázaný	nepreukázaný
6513	HCT116K-ras G13D/-	nepreukázaný	nepreukázaný
6514	HCT116 parental	nepreukázaný	nepreukázaný
6515	MALME-3M	V600E	V600E
6516	Nci-H2228	nepreukázaný	nepreukázaný
6517	HCT116p53+/-	nepreukázaný	nepreukázaný
6518	HCT116p53-/-	nepreukázaný	nepreukázaný
6519	OVCAR-4	nepreukázaný	nepreukázaný

Zo 41 testovaných vzoriek sme u 38 mohli overiť ich mutačný štatus. 3 vzorky (5404, 5407, 5419) nemali nijakú hodnotu Cp a nebolo možné ich analyzovať. Okrem jednej testovanej vzorky (5429) poskytla zvolená metóda správny výsledkok zhodujúci sa s dátami v databáze COSMIC. Vzorka 5429 bola vyhodnotená ako pozitívna, zatiaľ čo COSMIC databáza uvádza negatívny status. Po nasledujúcom porovnaní so vzorkou 5424 (jednalo sa o rovnakú patientsku vzorku) bol u nich zistený rozdielny záver.

6. 2 POROVNANIE CITLIVOSTI DETEKČIE *BRAF* ZA POUŽITIA NATÍVNÝCH REAGENCIÍ BEZ PRÍTOMNOSTI TREHALÓZY A ZA POUŽITIA REAGENCIÍ VYSUŠENÝCH ZA PRÍTOMNOSTI TREHALÓZY

Podľa pracovného protokolu uvedeného v Tabuľke 4 a 5 (viz. kapitola 5. 2. 2) boli detekované hodnoty ΔC_p rovnakým princípom popísaným v kapitole 6. 1. Analýza všetkých vzoriek bola pre štatistické účely vykonaná trikrát. Počas prebiehajúcich experimentov bola vyčerpaná zásoba DNA 6482, ktorá následne nebola použitá pre štatistické porovnanie. PCR mixom obsahujúcim mokré reagentie bolo detekovaných 23, (resp. 22 vzoriek), z toho 9 pozitívnych a 13 (resp. 12) negatívnych. Záver, odvodený z výslednej hodnoty ΔC_p , bol správny vo všetkých vzorkách, približne rovnaká hodnota ΔC_p sa opakovala v každom opakovaní. Hodnoty ΔC_p sú uvedené v Tabuľke 10.

Tabuľka 10: Výsledné hodnoty ΔC_p u mokrých reagentí

	Prvý pokus 12.11.2012			Druhý pokus 7.2.2013			Tretí pokus 3.12.2012		
DNA	delta Cp	záver	záver	delta Cp	záver	záver	delta Cp	záver	záver
3561	3,45	poz	OK	1,61	poz	OK	3,98	poz	OK
5410	0,94	poz	OK	0,11	poz	OK	1,04	poz	OK
5412	1,08	poz	OK	-0,54	poz	OK	1,34	poz	OK
5421	1,25	poz	OK	0,05	poz	OK	0,53	poz	OK
5425	1,65	poz	OK	0,71	poz	OK	1,58	poz	OK
5429	16,37	neg	OK	16,1	neg	OK	20,31	neg	OK
5430	1,45	poz	OK	0,25	poz	OK	1,45	poz	OK
5610	1,15	poz	OK	0,86	poz	OK	1,04	poz	OK
6431	-0,27	poz	OK	0,51	poz	OK	3,97	poz	OK
6444	13,29	neg	OK	17,51	neg	OK	17,31	neg	OK
6445	15,01	neg	OK	16,02	neg	OK	17,91	neg	OK
6446	9,04	neg	OK	14,75	neg	OK	12,1	neg	OK
6447	13,86	neg	OK	13,84	neg	OK	19,55	neg	OK
6448	13,3	neg	OK	15,93	neg	OK	18,91	neg	OK
6482	13,12	neg	OK	nie je			nie je		
6509	16,02	neg	OK	18,38	neg	OK	26,12	neg	OK
6511	14,92	neg	OK	18,3	neg	OK	18,11	neg	OK
6513	14,76	neg	OK	17,72	neg	OK	20,39	neg	OK
6514	15,32	neg	OK	18,34	neg	OK	18,11	neg	OK
8547	2,63	poz	OK	4,02	poz	OK	5,5	poz	OK
8550	12,7	neg	OK	17,04	neg	OK	10,48	neg	OK
6455	13,47	neg	OK	19	neg	OK	17,09	neg	OK

Pracovným postupom uvedeným v kapitole 5. 2. 4 bolo detekovaných 22 (resp. 21) vzoriek DNA. Hodnota ΔC_p bola analyzovaná rovnakým postupom ako u vzoriek obsahujúcich mokrý mix, uvedeným v kapitole 6.1. Analyzovaných bolo 8 pozitívnych vzoriek DNA a 13 (resp. 12) negatívnych vzoriek DNA. Detekcia vzorky 6482 nebola opäť pre vyčerpanie zásob vykonaná. U vzorky 8547 došlo opakovane k malej chybe počas amplifikácie (hodnoty ΔC_p 6,6; 8,45; 6,2), ktorá následne nebola braná v úvahu. Záver vychádzajúci z hodnoty ΔC_p bol správny v každom opakovaní. Výsledné hodnoty ΔC_p sú uvedené v Tabuľke 11.

Tabuľka 11: Výsledné hodnoty ΔC_p u suchých reagencií

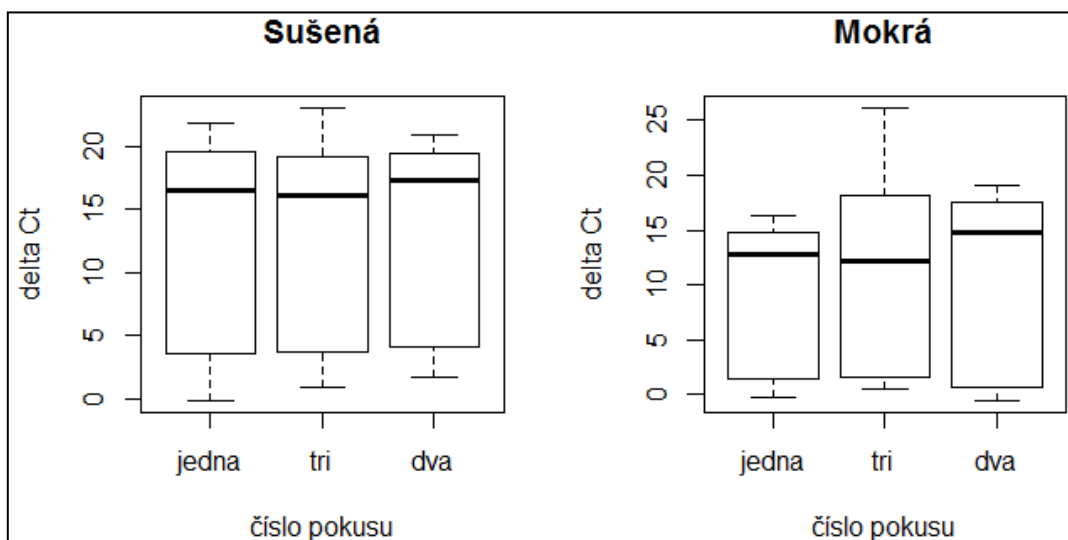
	Prvý pokus 12.11.2012			Druhý pokus 7.2.2013			Tretí pokus 3.12.2012		
DNA	delta Cp	záver	záver	delta Cp	záver	záver	delta Cp	záver	záver
3561-sus	4,82	poz	OK	4,04	poz	OK	4,76	poz	OK
5410-sus	3,87	poz	OK	2,67	poz	OK	2,74	poz	OK
5412-sus	2,94	poz	OK	4,23	poz	OK	1,62	poz	OK
5421-sus	3,61	poz	OK	2,94	poz	OK	3,3	poz	OK
5425-sus	1,2	poz	OK	3,09	poz	OK	3,64	poz	OK
5429-sus	21,12	neg	OK	19,4	neg	OK	19,32	neg	OK
5430-sus	3,48	poz	OK	1,67	poz	OK	3,69	neg	OK
5610-sus	-0,14	poz	OK	4,17	poz	OK	0,86	poz	OK
6431-sus	2,5	poz	OK	3,74	poz	OK	2,24	poz	OK
6444-sus	19,25	neg	OK	19,08	neg	OK	21,01	neg	OK
6445-sus	19,56	neg	OK	18,34	neg	OK	16,99	neg	OK

6446-sus	21,61	neg	OK	20,07	neg	OK	23	neg	OK
6447-sus	18,83	neg	OK	19,06	neg	OK	19,47	neg	OK
6448-sus	21,1	neg	OK	20,67	neg	OK	18,56	neg	OK
6482-sus	11,49	neg	OK	nie je			nie je		
6509-sus	19,6	neg	OK	17,35	neg	OK	20,32	neg	OK
6511-sus	16,54	neg	OK	18,13	neg	OK	18,87	neg	OK
6513-sus	21,79	neg	OK	20,73	neg	OK	16,07	neg	OK
6514-sus	18,72	neg	OK	20,05	neg	OK	19,12	neg	OK
8547-sus	6,6	opak	malá chyba	8,45	opak	malá chyba	6,2	opak	malá chyba
8550-sus	11,27	neg	OK	10,85	neg	OK	10,48	neg	OK
6455-sus	19,6	neg	OK	20,93	neg	OK	18,11	neg	OK

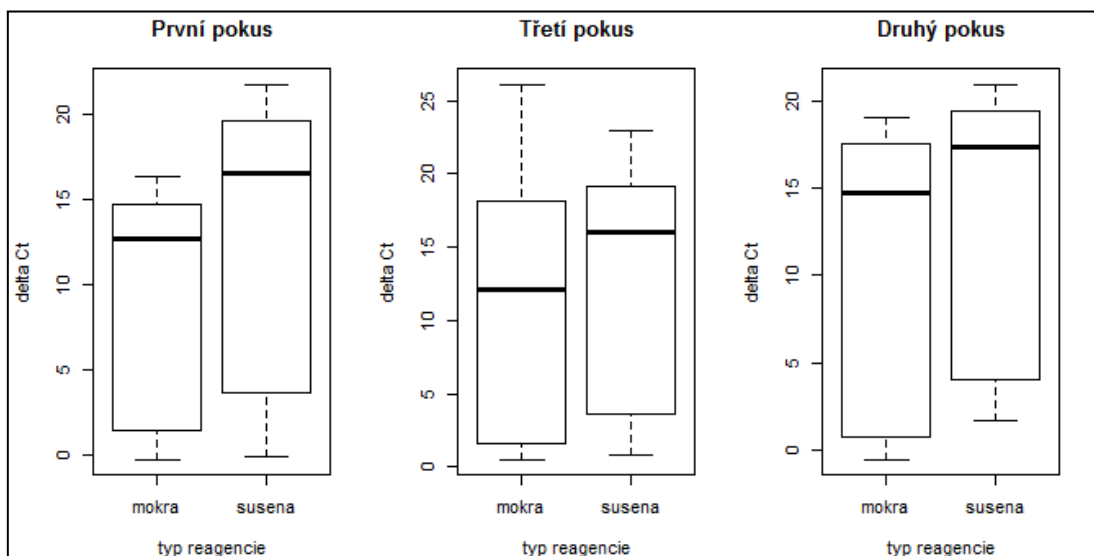
Pomocou štatistickej metódy ANOVA s opakovaným meraním bolo vykonané porovnanie hodnôt ΔC_p u 21 vzoriek DNA v PCR mixe bez trehalózy a v PCR mixe s prítomnosťou trehalózy, pričom analyzované boli hodnoty všetkých troch opakovaní. Princíp spočíva v skúmaní vzťahu medzi intervalovou a nominálnou premennou. ANOVA skúma, či sú namerané rozdiely náhodné (tzn. medzi nominálnou a intervalovou premennou nie je vzťah) alebo signifikantne (štatisticky) významné (tzn. medzi nominálnou a intervalovou premennou je vzťah). Bolo teda testované či je, resp. nie je, posunutie hodnoty ΔC_p medzi dvoma PCR mixami signifikantne významné. Ako hraničná bola braná hodnota $p=0,005$. Vzorky s $p<0,005$ boli stanovené ako signifikantne významné. V prípade, že nebol braný do úvahy pacient, nevyšiel signifikantný ani časový vplyv, ani vplyv sušenia reagensíí. V prípade, že

bol braný do úvahy pacient, vyšiel časový vplyv ($p < 0,02$) i vplyv sušenia ($p < 0,003$) signifikantne významný. Obr. 10 obsahujúci grafy závislosti zmeny ΔC_p na jednotlivých pokusoch porovnáva všetky tri vzájomné opakovania i mokré a suché reagentie. Vzorky obsahujúce sušené reagentie mali vo všeobecnosti vyššiu hodnotu ΔC_p , než vzorky s mokrým PCR mixom (viď. Obr. 11). Hodnota ΔC_p bola u suchých vzoriek v priemere o 2,21 vyššia než u mokrých vzoriek. Hodnoty všetkých meraní sú pre porovnanie uvedené v Tabuľke 12.

Štatistické porovnanie bolo vykonané za pomoci Mgr. Lenky Radovej PhD.



Obr. 10: Porovnanie zmeny ΔC_p troch vykonaných opakovaní u suchých a mokrých reagentií



Obr. 11: Zmena hodnoty ΔC_p v závislosti na type reagentie

Tabuľka 12: Štatistické výsledky hodnoty ΔC_p u všetkých testovaných vzoriek

Prvý pokus (12.11.2012) Počet vzoriek: 21			
mokrú reagenziu:		sušenú reagenziu	
minimum	-0,27	minimum	-0,14
25% kvantil	1,45	25% kvantil	3,61
medián	12,70	medián	16,54
75% kvantil	14,76	75% kvantil	19,60
maximum	16,37	maximum	21,79
priemer	8,64	priemer	12,28
Druhý pokus (7.2.2013) Počet vzoriek: 21			
mokrú reagenziu:		sušenú reagenziu	
minimum	-0,54	minimum	1,67
25% kvantil	0,71	25% kvantil	4,04
medián	14,75	medián	17,35
75% kvantil	17,51	75% kvantil	19,40
maximum	19,00	maximum	20,93
priemer	10,02	priemer	12,36
Tretí pokus (3.12.2012) Počet vzoriek: 21			
mokrú reagenziu:		sušenú reagenziu	
minimum	0,53	minimum	0,86
25% kvantil	1,58	25% kvantil	3,64

Tabuľka 12: Štatistické výsledky hodnoty ΔC_p u všetkých testovaných vzoriek			
medián	12,10	medián	16,07
75% kvantil	18,11	75% kvantil	19,12
maximum	26,12	maximum	23,00
priemer	11,28	priemer	11,92

7. DISKUSIA

Jednou časťou experimentálnej práce bolo stanovenie *BRAF* mutačného statusu vybraných vzoriek DNA, pričom experimentálne získané dáta boli porovnané s dátami medzinárodnej databázy COSMIC (COSMIC, 2012).

Zo 41 testovaných vzoriek DNA bol u 38 stanovený ich mutačný status. Vzorky č. 5404, 5407 a 5419 nebolo možné analyzovať, pretože ani v jednom signáli (u FAM $\lambda = 465 - 510$ nm a u JOE $\lambda = 533 - 580$ nm) nebola detekovaná nijaká hodnota Cp. Absencia Cp bola spôsobená chybou pipetovania, kedy s najväčšou pravdepodobnosťou nebola do vzorky napipetovaná templátová DNA. U daných vzoriek bol ich mutačný status identifikovaný počas ďalších prebiehajúcich experimentov v ÚMTM.

DNA pod číslami 5424 a 5429 bola vzorka identickej nádorovej línie, u ktorej bol však detekovaný rozdielny mutačný status. Po porovnaní s COSMIC databázou bolo jasné, že pri pipetovaní došlo ku chybe, pravdepodobne zámene vzorky 5429 s *BRAF* pozitívnou vzorkou. Správny mutačný status pre *BRAF* u vzoriek 5424 a 5429 je negatívny, čo sa potvrdilo aj následným opakovaním vyšetrenia.

Vzorky DNA označené číslami 6457, 5404, 5407, 5411, 5413, 5415, 5418 a 5419 sa nenachádzali v databáze COSMIC. Bunkové línie, u ktorých mutačný status nebol potvrdený databázou COSMIC, boli následne v ÚMTM analyzované metódou CADMA. Výsledky zvyšných meraní sa zhodovali s databázou COSMIC.

Ďalšia oblasť experimentálnej časti predloženej bakalárskej práce sa zaoberá možnosťou stabilizácie PCR reagensí u molekulárne typizačnej súpravy pre mutáciu V600E génu *BRAF*. Prítomnosť trehalózy v PCR mixe skutočne uchovala aktivitu reagensí i po ich mnohotýždňovom uskladnení a vzorky DNA boli po následnom prídavku *Taq* polymerázy a vody úspešne amplifikované. Test citlivosti vykonaný v ÚMTM preukázal na schopnosť súpravy detekovať zmes wt s 1% mutácií. Po štatistickom porovnaní, vychádzajúcom zo zmeny hodnoty ΔC_p medzi amplifikáciou za použitia mokrého a suchého mixu, bol medzi zvolenými PCR mixami preukázaný signifikantný posun, u suchého mixu v priemere o hodnotu 2,21. Oneskorená hodnota ΔC_p nemenila výsledný mutačný status vzorky pacienta.

Na tento posun je však pri jej detekcii potrebné brať ohľad a v prípade neskorého signálu v JOE kanáli, či v prípade detekcie minoritných mutácií pod 1 % je možné využiť pre overenie hraničných hodnôt i iné komerčne dostupné kity umožňujúce detekciu *BRAF*, napr. Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (Roche), PNA BRAF Mutation Detection Kit (Abnova) či B-Raf Mutation Analysis Kit (EntroGen), ktoré umožňujú detekciu o podobnej alebo vyššej citlivosti.

Je otázne, ktorá zložka mixu po pridaní trehalózy spôsobuje posun Cp. Zatiaľ nejestvuje štúdia o účinkoch trehalózy na zvyšné reagenty okrem *Taq* polymerázy, ktorú sme pridávali až v okamžiku typizácie. Toto zistene bude predmetom ďalších štúdií.

8. ZÁVER

Mutácie génu *BRAF* indukujú v organizme výskyt rakovinového ochorenia, predovšetkým melanómov, rakovinu štítnej žľazy, kolorekta ai. Najčastejšou mutáciou *BRAF* je mutácia V600E, kedy dochádza k substitúcii aminokyseliny valínu za kyselinu glutámovú. Včasná a citlivá detekcia *BRAF* mutácie umožňuje u pacientov cieľiť liečebnú terapiu. Metódy molekulárnej biológie zohrávajú čoraz väčšiu úlohu v medicínskych výskumoch, a modifikáciou a optimalizáciou detekčných metód sa zvyšuje ich efektivita. Modifikáciami PCR je možné zjednodušiť a urýchliť možnosti amplifikácie študovaného vzorku. Jednou z možností zvýšenia efektivity metód PCR je stabilizácia vysoko citlivých reagensí použitých pri amplifikácii. Tvorbou sušeného PCR mixu, obsahujúceho prídavok trehalózy, je možné predísť problémom s opakovaným rozmrazovaním vysoko citlivých reagensí, ktorým dochádza k ich postupne sa znižujúcej kvalite a účinnosti.

Predložené experimenty boli vykonané za účelom možného získania CE značky pre danú typizačnú súpravu. Na základe analyzovaných výsledkov a vplyvu času i sušenia na amplifikáciu vzoriek bude ďalej výskumná práca pracovníkov ÚMTM okrem iného zameraná na spracovanie stabilitných experimentov. Spolu s výsledkami predloženej práce bude na ich základe vytvorený pre-alikvótny kit, ktorý bude komerčne uvedený na trhu. Výsledky experimentálnej časti bakalárskej práce budú tvoriť súčasť dokumentácie potrebnej pre získanie CE-IVD – časti Hodnotenie funkčnej spôsobilosti a SOP.

9. POUŽITÁ LITERATÚRA

Bendlová, B., Dvořáková, Š., Sýkorová, V., Václavíková, E., Hálková, T. (2012): Nádory štítné žlázy – molekulárně genetické příčiny a možnosti cílené léčby. *Časopis lékařů českých* 151: 123 – 127.

Branca, C., Maccarrone, S., Magazu, S., Maisano, G., Bennington SM., Taylor, J. (2005): Tetrahedral order in homologous disaccharide-water mixtures. *The Journal of Chemical Physics* 122(17): 174513.

Brown, GC., Hoek, JB., Kholodenko, BN. (1997): Why do protein kinase cascades have more than one level? *Trends in Biochemical Sciences* 22(8): 288.

Carnici, P., Nishiyama, Y., Westover, A., Itoh, M., Nagaoka, S., Sasaki, N., Okazaki, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y. (1998): Thermostabilization and thermoactivation of thermostable enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(2): 520 – 524.

Chapman, PB., Einhorn, LH., Meyers, ML., Saxman, S., Destro, AN., Panageas, KS., Begg, CB., Aqarwala, SS., Schuchter, LM., Ernstoff, MS., Houghton, AN., Kirkwood, JM. (1999): Phase III Multicenter Randomized Trial of the Darthmouth Regimen Versus Dacarbazine in Patients With Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 17(9): 2745 – 2751.

Chapman, PB., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, JB., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf,

D., Ribas, A., O'Day, SJ., Sosman, JA., Kirkwood, JM., Eggermont, AM., Dreno, B., Nolop, K., Li, J., Nelson, B., Hou, J., Lee, RJ., Flaherty, KT., McArthur, GA. (2011): Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *The New England Journal of Medicine* 364(26): 2507 – 2516.

Chien, W., Koeffler, HP. (2012): Molecular Biology of Thyroid Cancer. *Thyroid Cancer, Endocrine Updates* 30: 35 – 43.

Chong, H., Lee, J., Guan, KL. (2001): Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO Journal* 20: 3716 – 3727.

Ciampi, R., Knauf, JA., Kerler, R., Gandhi, M., Zhu, Z., Nikiforova, NM., Rabes, HM., Fagin, JA., Nikiforov, YE. (2005): Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *Journal of Clinical Investigation* 115: 94 – 101.

Colaco, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S., Roser, B. (1992): Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: Simplified molecular biology. *Biotechnology* 10(9): 1007 – 1011.

Curry, JL., Torres-Cabala, CA., Tetzlaff, MT., Bowman, C., Prieto, VG. (2012): Molecular platforms utilized to detect BRAF V600E mutation in melanoma. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 31(4): 267 – 273.

Davies, H., Bignell, GR., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, MJ., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, BA., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, GJ., Bigner,

DD., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, JW., Leung, SY., Yuen, ST., Weber, BL., Seigler, HF., Darrow, TL., Paterson, H., Marais, R., Marshall, CJ., Wooster, R., Stratton, MR., Futreal, PA. (2002): Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 417: 949 – 954.

Dhillon, AS., Meikle, S., Yazici, Z., Eulitz, M., Kolch, W. (2002): Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO Journal* 21: 64 – 71.

Dhomen, N., Marais, R. (2007): New insight into *BRAF* mutations in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 17: 32 – 39.

Dumaz, N., Heyward, R., Martin, J., Ogilvie, L., Hedley, D., Curtin, JA., Bastian, BC., Springer, C., Marais, R. (2006): In Melanoma, *RAS* Mutations Are Accomplished by Switching Signaling from *BRAF* to *CRAF* and Disrupted Cyclic AMP Signaling. *Cancer Research* 66 (19): 9483 – 9491.

Elisei, R., Ugolini, C., Viola, D., Lupi, C., Biagni, A., Giannini, R., Romei, C., Miccoli, P., Pinchera, A., Basolo, F. (2008): *BRAF*^{V600E} Mutation and Outcome of Patients with Papillary Thyroid Carcinoma: A 15-Year Median Follow-Up Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93(10): 3943 – 3949.

Elisson, G., Donald, E., McWalter, G., Knight, L., Fletcher, L., Sherwood, J., Cantarini, M., Orr, M., Speake, G. (2010): A comparison of ARMS and DNA sequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29: 132.

Frasca, F., Nucera, C., Pellegriti, G., Gangemi, P., Attard, M., Stella, M., Loda, M., Vella, V., Giordano, C., Trimarchi, F., Mazzon, E., Belfiore, A., Vigneri, R. (2008): BRAF^(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer* 15: 191 – 205.

Friedecký, B., Kratochvíla, J. (2005): Směrnice Rady IVD 98/79/ES (Directive 98/79 EC) a kvalita analytických procesů. *Klinická biochemie a metabolismus* 4: 207 – 211.

Grasmeijer, N., Stankovic, M., Waard, H., Frijlink, HW., Hinrichs, WLJ. (2013): Unraveling protein stabilization mechanisms: Vitrification and water replacement in a glass transition temperature controlled system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1834(4): 763 – 769.

Gupta-Abramson, V., Troxel, AB., Nellore, A., Puttaswamy, K., Redlinger, M., Ransone, K., Mandel, SJ., Flaherty, KT., Loevner, LA., O'Dwyer, PJ., Brose, MS. (2008): Phase II Trial of Sorafenib in Advanced Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26(29): 4714 – 4719.

Horáková, H., Polakovičová, I., Shaik, GS., Eitler, J., Bugajev, V., Dráberová, L., Dráber, P. (2011): 1,2-propanediol-trehalose mixture as a potent quantitative real-time PCR enhancer. *BMC Biotechnology* 11(41). doi: 10.1186/1472-6750-11-41.

Johnson, GL., Lapadat, R. (2002): Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* 298: 1911 – 1912.

Kimura, ET., Nikiforova, MN., Zhu, Z., Knauf, JA., Nikiforov, YE., Fagin, JA. (2003): High Prevalence of BRAF Mutations in Thyroid Cancer: Genetic Evidence for Constitutive Activation of the RET/PTC-RAS-BRAF Signalling Pathway in Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancer Research* 63: 1454 – 1457.

Kristensen, LS., Andersen, GB., Hager, H., Hansen, LL. (2012): Competitive Amplification of Differentially Melting Amplicons (CADMA) Enables Sensitive and Direct Detection of All Mutation Types by High-Resolution Melting Analysis, *Human Mutation* 33(1): 264 – 271.

Kyriakis, JM., App, H., Zhang, XF., (1992): Raf-1 Activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358: 417-21.

Lade-Keller, J., Rømer, KM., Guldberg, P., Riber-Hansen, R., Hansen, LL., Steiniche, T., Hager, H., Kristensen, LS. (2013): Evaluation of BRAF Mutation Testing Methodologies in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Cutaneous Melanomas. *The Journal of Molecular Diagnostics* 15(1): 70 – 80.

Landi, MT., Bauer, J., Pfeiffer, RM., Elder, DE., Hulley, B., Minghetti, P., Calista, D., Kanetsky, PA., Pinkel, D., Bastian, BC. (2006): *MC1R* Germline Variants Confer Risk for *BRAF*-Mutant Melanoma. *Science* 313: 521 – 522.

Li, J., Wang, L., Mamon, H., Kulke, MH., Berbeco, R., Makrigiorgos, GM. (2008): Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nature Medicine* 14: 579 – 584.

Liu, Q., Schmidt, RK., Teo, B., Karplus, PA., Bray, JW. (1997): Molecular Dynamics studies of the hydration of α,α -trehalose. *Journal of the American Chemical Society* 119(33): 7851 – 7862.

Lukáš, J., Drábek, J., Dudešek, B., Vazan, P., Stránská, J., Jančík, S., Macková, M., Syruček, M., Lukáš, D., Dušková, J., Dundr, P., Hintnausová, B., Jiskra, J., Astl, J. (2013):

Postoperative analysis of the *BRAF*^{V600E} mutation in the papillary thyroid carcinoma. Nепублиkované výsledky.

Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., Kriegsheim von, A., Kolch, W. (2011): Raf Family Kinases: Old Dogs Have Learned New Tricks. *Genes & Cancer* 2(3): 232-260.

Morrison, DK., Heidecker, G., Rapp, UR., Copeland, TD. (1993): Identification of the Major Phosphorylation Sites of the Raf-1 Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 268: 17309 – 17316.

Murphy, HN., Stewart, GR., Mischenko, VV., Apt, AS., Harris, R., McAlister MS., Driscoll, PC., Young, DB., Robertson, BD. (2005): The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 14524 – 14529.

Namba, H., Nakashima, M., Hayashi, T., Hayashida, N., Maeda, S., Rogounovitch, TI., Ohtsuru, A., Saenko, VA., Kanematsu, T., Yamashita, S. (2003): Clinical Implication of Hot Spot *BRAF* Mutation, V588E, in Papillary Thyroid Cancers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(9): 4393 – 4397.

Newton, CR., Graham, A., Heptinstall, LE., Powel, SJ., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, JC., Markham, AF. (1989): Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acid Research* 17(7): 2503 – 2516.

Niihori, T., Aoki, Y., Narumi, Y., Neri, G. (2006): Germline *KRAS* and *BRAF* mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nature Genetics* 38: 294 – 296.

Nikiforova, MN., Kimura, ET., Gandhi, M., Biddinger, PW., Knauf, JA., Basolo, F., Zhu, Z., Giannini, R., Salvatore, G., Fusco, A., Santoro, M., Fagin, JA., Nikirov, YE. (2003): *BRAF* Mutations in Thyroid Tumors Are Restricted to Papillary Carcinomas and Anaplastic or Poorly Differentiated Carcinomas Arising from Papillary Carcinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(11): 5399 – 5404.

Papin, C., Denouel, A., Calothy, G., Eychene, A. (1996): Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system. *Oncogene* 12: 2213 – 21.

Pratilass, CA., Xing, F., Solit, DB. (2012): Targeting Oncogenic BRAF in Human Cancer. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 355: 83 – 98.

Rapp, UR., Goldsborough, MD., Mark, GE. (1983): Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4218 – 4222.

Reina-Bueno, M., Argandona, M., Salvador, M., Rodríguez-Moya, J., Iglesias-Guerra, F., Csonka, LN., Nieto, JJ., Vargas, C. (2012): Role of trehalose in salinity and temperature tolerance in the model halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Public Library of Science* 7(3): e33587.

Rodríguez-Viciano, P., Sabatier, C., McCormick, F. (2010): Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Molecular and Cell Biology* 24: 4943 – 4954.

Ronaghi, M., Karamohamed, S., Petterson, B., Uhlén, M., Nyrén, P. (1996): Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry* 242(1): 84 – 89.

Roskoski R. (2010): RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399: 313 – 317.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, AR. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12): 5463 – 5467.

Scwab, GM., Staerkel, GA., Shapiro, SE., Fornage, BD., Sherman, SI., Vassilopoulou-Sellin, R., Lee, JE., Evans, DB. (2003): Fine-needle aspiration of the thyroid and correlation with histopathology in a contemporary series of 240 patients. *American Journal of Surgery* 186: 702 – 709.

Smith, S., Morin, PA. (2005): Optimal Storage Conditions for Highly Dilute DNA Samples: A Role for Trehalose as a Preserving Agent. *The Journal of Forensic Sciences* 50(5): 1101 – 1108.

Spiess, AN., Mueller, N., Ivell, R. (2004): Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of *Taq* polymerase by the disaccharide trehalose. *Clinical Chemistry* 50(7): 1256 – 1259.

Spittle, C., Ward, MR., Nathanson, KL., Gimotty, PA., Rappaport, E., Brose, MS., Medina, A., Letrero, R., Herlyn, M., Edwards, RH. (2007): Application of a BRAF Pyrosequencing

Assay for Mutation Detection and Copy Number Analysis in Malignant Melanoma. *The Journal of Molecular Diagnostics* 9(4): 464 – 471.

Tie, J., Desai, J. (2010): BRAFV600E as a Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *European Oncology* 6(1): 60 – 64.

Tran, NH., Wu, X., Frost, JA. (2005): B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 280: 16244 – 16253.

Trovisco, V., Soares, P., Sobrinho-Simoes, M. (2006): B-RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis and prognosis of thyroid carcinomas. *Human Pathology* 37: 781 – 786.

Wan, PTC., Garnett, MJ., Roe, MS., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, VM., Jones, CM., Marshall, CJ., Springer, CJ., Barford, D., Marais, R. (2004): Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 116(6): 855 – 867.

Wellbrock, C., Karasarides, M., Marais, R. (2004a): The RAF proteins take centre stage. *Nature Review Molecular Cell Biology* 5: 875 – 885.

Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hadley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., Springer, CJ., Marais, R. (2004): ^{V599E}B-RAF is an Oncogene in Melanocytes. *Cancer Research* 64: 2338 – 2342.

Wilhelm, SM., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., Cao, Y., Shujath, J., Gawlak, S., Eveleigh, D., Rowley, B., Liu,

L., Adnane, L., Lynch, M., Auclair, D., Taylor, I., Gedrich, R., Voznesensky, A., Riedl, B., Post, LE., Bollag, G., Trail, PA. (2004): BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research* 64: 7099-7109.

Xing, M. (2007): BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine Reviews* 28: 742 – 762.

Xing, M., Westra, WH., Tufano, RP., Cohen, Y., Rosenbaum, E., Rhoden, KJ., Carson, KA., Vasko, V., Larin, A., Tallini, G., Tolaney, S., Holt, EH., Hui, P., Umbricht, CB., Basaria, S., Ewertz, M., Tufaro, AP., Califano, JA., Ringel, MD., Zeiger, MA., Sidransky, D., Ladenson, PW. (2005): BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90: 6373 – 6379.

Zebisch, A., Troppair, J. (2006): Back to the roots: the remarkable RAF oncogene story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 1314 – 1330.

Ziai, J., Hui, P. (2012): BRAF mutation testing in clinical practice. *Expert Review of molecular diagnostics* 12: 127 – 138.

Zhang, Z., Kermekchiev, MB., Barnes, WM. (2010): Direct DNA Amplification from Crude Clinical Samples Using a PCR Enhancer Cocktail nad Novel Mutants of Taq. *Journal of Molecular Diagnostics* 12(2): 152 – 161.

Online elektronické dokumenty

Dušek, L., Mužík, J., Kubásek, M., Koptíková, J., Žaloudík, J., Vyzula, R. (2005): Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice, Masarykova univerzita [Citované 06.03.2013]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.svod.cz>.

COSMIC, Catalogue of somatic mutations in cancer (2012): [Citované 28.3.2013] Dostupné na World Wide Web: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>

National Center for Biotechnology Information (2013): [Citované 19.3.2013] Dostupné na World Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>

Panagene (2009): [Citované 21.3.2013] Dostupné na World Wide Web: http://www.panagene.com/eng/bbs/ndata/pn_bro/pn_bro_1284511404.pdf

Obrázky převzaté z elektronických dokumentov

Genetics Home Reference (2012): *BRAF* [Citované 18. 3. 2013] Dostupné na World Wide Web: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=BRAF>

Wikipedia, The Free Encyclopedia (2006): Sorafenib [Citované 19. 3. 2013] Dostupné na World Wide Web: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Sorafenib.svg>

Wikipedia, The Free Encyclopedia (2007): Trehalose Haworth [Citované 22. 3. 2013] Dostupné na World Wide Web: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trehalose_Haworth.svg

Wikipedia, The Free Encyclopedia (2012): Dacarbazine [Citované 19. 3. 2013] Dostupné na World Wide Web: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dacarbazine_Formula_V.1.svg

Pubchem (2012): PLX4032 - Compound Summary [Citované 19. 3. 2013] Dostupné na World Wide Web: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=42611257#x281>

Physics Forums (2010): How could you chemically detect peptide nucleic acid? [Citované 21. 3. 2013] Dostupné na World Wide Web: <http://www.physicsforums.com/showthread.php?t=111258>

10. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

- A – dusíkatá báza adenín
- AC – adenylát cykláza, enzým katalyzujúci syntézu cAMP (*Adenylate Cyclase*)
- AKAP9 – gén kódujúci AKAP9 gén (*A-Kinase Anchor Protein 9*)
- APC – anaplastický karcinóm štítnej žľazy (*Anaplastic Thyroid Carcinoma*)
- ARMS – Amplifikačný refrakčný mutačný systém (*Amplification Refractory Mutation System*)
- ATP – adenzíntrifosfát, „prenášač“ energie (*Adenosine TriPhosphate*)
- bp – pár bází (*base-pair*)
- BRAF – gén (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*)
- C – dusíkatá báza cytozín
- CADMA – detekčná metóda (*Competitive Amplification of Differentially Melting Amplicons*)
- cAMP – cyklický adenzínmonofosfát, druhý posol (*Cyclic-Adenosine MonoPhosphate*)
- CE - *Conformité Européenne*
- CCD – kamera (*Charge-Coupled Device*)
- Cp (Ct) – bod prekročenia prahovej hodnoty fluorescence (*Crossing Point*)
- CR – konzervatívne regióny (*Conserved Regions*)
- CRAF – gén (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*)
- CRD – doména bohatá na cysteín (*Cystein-Rich Domain*)
- ddNTP – dideoxyribonukleozidtrifosfát (*dideoxyribonucleotide*)
- DNA – deoxyribonukleotidová kyselina (*DeoxyriboNucleic Acid*)
- dNTP – deoxyribonukleotidtrifosfát (*deoxyribonucleotide*)
- E – aminokyselina kyselina glutámová
- EDTA – ethylendiaminetetraoctová kyselina (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- ERK – člen MAPK dráhy (*Extracellular signal-Regulated Kinase*)
- ES – Európska smernica
- FDA – Úrad pre kontrolu potravín a liečiv USA (*Food and Drug Administration*)
- FRET – rezonančný prenos fluorescenčnej energie (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)
- FTC – folikulárny karcinóm štítnej žľazy (*Follicular Thyroid Carcinoma*)

G – dusíkatá báza guanín

GMDN – Globálna nomenklatúra zdravotníckych prostriedkov (*Global Medical Device Nomenclature*)

GDP – guanozín difosfát, nukleotid

GTP – guanozín trifosfát, nukleotid

HRM – analýza kriviek teplôt topenia s vysokým rozlíšením (*High Resolution Melting Temperature*)

IVD – *In-vitro* diagnostika (*In-vitro Diagnostics*)

MAPK – mitogénom aktivovaná proteínkináza (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MC1R – receptor pre melanokortín-1 (*Melanocortin 1 Receptor*)

MEK – člen MAPK dráhy (*Map-Erk Kinase*)

MSH – melanocyt-stimulujúci hormón (*Melanocyte-Stimulating Hormone*)

MTC – medulárny karcinóm štítnej žľazy (*Medullary Thyroid Carcinoma*)

mRNA – mediátorová RNA

NCBI – Národné centrum pre biotechnologické informácie (*National Center for Biotechnology Information*)

NP-40 – detergent (*nonyl phenoxy polyethoxy ethanol*)

p53 – tumorový supresor

PCR – polymerázová reťazová reakcia (*Polymerase-Chain Reaction*)

PKA – proteínkináza A (*Protein Kinase A*)

PNA – peptidová nukleová kyselina (*Peptide Nucleic Acid*)

PPi – pyrofosfát (*pyrophosphate*)

PTC – papilárny karcinóm štítnej žľazy (*Papillary Thyroid Carcinoma*)

RAS – GTPázové prenášače signálu (K-RAS, N-RAS, H-RAS)

RAF – protoonkogén (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)

RBD – RAS-viažuca doména (*RAS-Binding Domain*)

RNA – ribonukleotidová kyselina (*RiboNucleic Acid*)

RTK – tyrozín-kinázový receptor (*Receptor Tyrosine Kinase*)

SOP – pracovný postup (*Standard Operating Procedure*)

T - dusíkatá báza thymín

T₃ – hormón trijódtyronín

T₄ – hormón tyroxín

T_g – teplota skleného prechodu (*glass transition temperature*)

T_m – teplota topenia (*Melting Temperature*)

UMDNS – Univerzálna nomenklatúra zdravotníckych prostriedkov (*Universal Medical Device Nomenclature System*)

UMTM – Ústav molekulárnej a translačnej medicíny

UV – ultrafialové žiarenie (*UltraViolet*)

V – aminokyselina Valín

wt – štandardný nemutovaný typ (wildtype)

11. PRÍLOHY
