

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**OPTIMALIZACE RYCHLÉ MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ
METODY K DETEKCI MUTACÍ V NÁDOROVÉ POPULACI
BUNĚK**

Diplomová práce

Bc. Klára Pížová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: doc. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury a pod odborným vedením doc. Mgr. Jiřího Drábka, PhD.

V Olomouci dne 9.5.2010

.....

(podpis)

Chtěla bych poděkovat svému školiteli panu doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, PhD. za veškerou pomoc při tvorbě práce, trpělivost, odborné i praktické rady a návrh použitých primerů, pracovníkům DNA laboratoře LEMu Veronice Holinkové, DiS., Miroslavě Rabčanové a Mgr. Sylwii Jančík za praktickou pomoc, zvláště izolaci DNA a následnou WGA, a celkově za vytvoření příjemného pracovního prostředí, a Mgr. Janě Fürstové za statistické zpracování výsledků. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu a zázemí, které mi poskytli, a zvláště rodičům za to, že mi umožnili studovat.

Souhrn

Gen *KRAS* (homolog onkogenu Kirsten rat sarcoma viru) kóduje protein p21 zapojený do signálních kaskád v buňce. Protein p21 je tedy jedním z klíčových prvků regulujících buněčné dělení a diferenciaci. Mutace v jeho genu, zejména bodové mutace ve 12. a 13. kodonu 1. exonu, se velmi často vyskytují v souvislosti s nádorovým onemocněním u lidí a mají významný dopad nejen na závažnost onemocnění, ale také na účinnost léčby.

Cílem teoretické části diplomové práce bylo shrnout dostupné poznatky o genu *KRAS*, o významu jeho proteinového produktu, zejména v souvislosti se vznikem nádorového onemocnění, a také o dostupných molekulárně genetických metodách detekce mutací v genu *KRAS*. Cílem experimentální části diplomové práce bylo navrhnout nejvhodnější postup a podmínky PCR metody pro detekci sedmi nejčastějších bodových mutací genu *KRAS* ve 12. a 13. kodonu 1. exonu: Gly12Asp (GGT>GAT), Gly12Ala (GGT>GCT), Gly12Val (GGT>GTT), Gly12Ser (GGT>AGT), Gly12Arg (GGT>CGT), Gly12Cys (GGT>TGT) a Gly13Asp (GGC>GAC).

Summary

KRAS gene (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) codes p21 that is involved in cell signalling cascade and so that is key regulator of cell division and differentiation. Mutations in this gene, especially point mutation in 12th and 13th codon of 1st exon, are frequently associated with human tumour diseases and have significant impact on seriousness of diseases as well as treatment efficiency.

Aim of theoretical part of diploma thesis was to summarize knowledge about *KRAS* gene, importance of its protein product, especially in connection with tumour disease formation and to elucidate use of molecular and genetic methods to detect mutation in *KRAS* gene. Goal of experimental part of diploma thesis was to find the most suitable procedure and conditions for PCR method focused on detection of the seven most frequently point mutation in gene *KRAS* in 12th and 13th codon of 1st exon: Gly12Asp (GGT>GAT), Gly12Ala (GGT>GCT), Gly12Val (GGT>GTT), Gly12Ser (GGT>AGT), Gly12Arg (GGT>CGT), Gly12Cys (GGT>TGT) and Gly13Asp (GGC>GAC).

Obsah

1	Úvod	8
2	Současný stav problematiky	10
2.1	KRAS	10
2.1.1	Protein KRAS	10
2.1.2	Gen <i>KRAS</i>	11
2.1.3	Proč je KRAS tak důležitým cílem studia	12
2.1.4	Gen <i>KRAS</i> při onkogenezi	13
2.2	Metoda ARMS	14
2.2.1	Výhody	16
2.2.2	Komerční kit TheraScreen® DxS	17
2.2.3	Použití modifikovaných oligonukleotidů s uzamčenou konformací	19
2.3	Další detekční metody	20
3	Cíle práce	22
4	Materiál a metodika	23
4.1	Přístroje a pomůcky	23
4.2	Spotřební materiál	23
4.3	Chemikálie	23
4.4	Software	24
4.5	Biologický materiál	24
4.6	Použité statistické metody	25
4.7	Návrh primerů a polynukleotidů	25
4.8	Výběr typu a koncentrace primerů a blokovacího oligonukleotidu	26
4.8.1	Typ a koncentrace primerů specifických k mutaci	26
4.8.2	Funkčnost a koncentrace blokovacího oligonukleotidu	27
4.8.3	Účinnost blokovacího oligonukleotidu	27
4.8.4	Výběr vhodného nespecifického primerového páru	28
4.8.5	Příprava primerových směsí specifických k jednotlivým <i>KRAS</i> mutacím	28
4.9	Určení limitu hodnotitelnosti	29
4.10	Příprava smíšeného standardu	29
4.10.1	Výběr nejvhodnější koncentrace	29
4.10.2	Test smíšeného standardu	31
4.11	Určení optimálního množství templátové DNA	31
4.12	Určení meze detekce	32
4.12.1	Výběr a ředění buněčných linií	32
4.12.2	Určení meze detekce pomocí buněčné linie NCI-H2009	33
4.12.3	Určení limitní ΔC_t pro ostatní <i>KRAS</i> mutace	33
4.13	Analýza reálných vzorků	33
4.13.1	Hodnocení opakovatelnosti metody	34
5	Výsledky	35
5.1	Výběr typu a koncentrace primerů a blokovacího oligonukleotidu	35
5.1.1	Typ a koncentrace primerů specifických k mutaci	35
5.1.2	Funkčnost a koncentrace blokovacího oligonukleotidu	36
5.1.3	Účinnost blokovacího oligonukleotidu	36

5.1.4	Výběr vhodného nespecifického primerového páru.....	37
5.2	Určení limitu hodnotitelnosti.....	38
5.3	Příprava smíšeného standardu.....	38
5.3.1	Výběr nejvhodnější koncentrace.....	38
5.3.2	Test smíšeného standardu.....	41
5.4	Určení optimálního množství templátové DNA.....	41
5.5	Určení meze detekce.....	42
5.5.1	Výběr a ředění buněčných linií.....	42
5.5.2	Určení meze detekce pomocí buněčné linie NCI-H2009.....	43
5.5.3	Určení limitní ΔC_t pro ostatní <i>KRAS</i> mutace.....	44
5.6	Analýza reálných vzorků.....	45
5.6.1	Nespecifické nasedání primerů (zkřížené reakce).....	46
5.6.2	Konečná pravidla pro hodnocení patientských vzorků.....	47
5.6.3	Hodnocení patientských vzorků a srovnání výsledků nového PCR systému s výsledky komerčního kitu TheraScreen DxS.....	48
5.6.4	Hodnocení opakovatelnosti metody.....	50
6	Diskuze.....	54
7	Závěr.....	60
8	Použitá literatura.....	62
9	Seznam použitých zkratk.....	70
10	Přílohy.....	73

Motto: „Všichni pronásledovatelé démona nádoru v minulém století museli být fascinováni předmětem svého pronásledování a zároveň museli cítit frustraci z jeho neuchopitelnosti. Se vstupem do nového milénia máme naději, že démon bude nakonec uchopen a že na základě tohoto uchopení najdeme způsob, jak ho přemoci.“ (Alfred G. Knudson, 2000)

1 Úvod

Rakovina je velmi závažné onemocnění a představuje jednu z hlavních příčin smrti v lidské populaci, především v rozvinutých oblastech světa. Například v Evropě a v Severní Americe umírá na rakovinu každý čtvrtý člověk a v celosvětovém měřítku tomuto zhoubnému onemocnění podléhá ročně 100 – 350 lidí na 100 000 obyvatel. Rakovina je onemocnění způsobené zhoubným nádorem. Nádor je patologický útvar vytvořený v tkáni mnohobuněčného organismu, jehož růst se vymkl kontrole. Dělení buněk v něm není omezováno žádným regulačním mechanismem. Kancerogeneze (proces vzniku a vývoje nádorů) je onemocněním genomu, protože základem jejího vzniku jsou především genetické změny, tzv. mutace. K přeměně normální zdravé buňky v buňku plně maligní nestačí jen jedna samotná mutace, kancerogeneze je vícestupňový proces postupného hromadění několika mutací. Mutace vedoucí ke vzniku nádorů postiženým buňkám neškodí, naopak je zvýhodňují v soutěži o přežití se sousedními buňkami.

Mutace související s transformací buňky v nádorovou vznikají především v genech kódujících proteiny zapojené do buněčných signálních kaskád. Převod signálu z vnějšího prostředí dovnitř buňky je klíčovou součástí homeostázy organismu, který musí být udržován po celý život. Růstové faktory a jejich buněčné receptory jsou čelní senzory, které následně spouštějí aktivaci řady signálních molekul, které umožní přenos signálu. Příjem vnějších signálů, jejich zpracování a přenos do vnitřního prostředí buňky, integrace s jinými signály a indukce buněčné odpovědi jsou velmi komplexními a přísně regulovanými procesy, jejichž případná porucha může představovat značné riziko vzniku rakoviny.

Mutace, které souvisejí s kancerogenezí, nastávají konkrétně ve dvou typech genů: v tzv. protoonkogenech a tumorsupresorech. Translační produkty těchto genů se podílejí na řízení buněčného cyklu, ale funkce těchto genů jsou protichůdné. Protoonkogeny kódují proteiny, které jsou zapojeny do regulačních buněčných procesů tím, že urychlují buněčný cyklus a tak podporují růst nebo zvětšování tkání v důsledku aktivního dělení buněk – tzv.

proliferaci. Nadměrná aktivita těchto genů a jejich produktů je tedy nebezpečná, protože vede k nadměrné buněčné proliferaci i za nepřítomnosti fyziologické hladiny příslušného signálu „zvenci“. Tumorsupresorové geny kódují proteiny, které mají za úkol naopak zpomalovat rychlost proliferace buněk a tak zabraňovat nežádoucímu růstu tkání. Co se týče vzniku rakoviny, jsou tedy nebezpečné takové mutace tumorsupresorových genů, které vedou k inaktivaci jejich proteinových produktů (Šmarda *and* Šmardová, 2005).

Vznik rakoviny však může být způsoben nejen přímou mutací kódující sekvence zmíněných protoonkogenů nebo tumorsupresorových genů, ale také epigenetickými procesy. Epigenetické modifikace (methylace, acetylace a další) regulačních sekvencí a histonů mohou způsobit jednak aktivaci genu, který měl být umlčen (například demethylace regulační oblasti určitého protoonkogenu), nebo naopak umlčení genu, který měl být aktivní (například methylace regulační oblasti určitého tumorsupresorového genu).

Výzkum a možnosti léčby rakoviny jsou jedny z nejdůležitějších medicínských cílů současnosti. Právě mutace v onkogenech a tumorsupresorových genech jsou významným znakem (markerem) malignity; umožňují zjistit nádorové onemocnění už v raném stádiu a zvýšit tak šance na úspěšnou léčbu. Jak bude dále zmíněno, přítomnost konkrétní mutace může mít vliv také na účinnost léčby, takže tyto markery umožňují vybrat vhodný typ léčby pro konkrétního pacienta. Proto je velmi důležité vyvinout spolehlivé, vysoce citlivé a specifické metody detekce těchto mutací.

2 Současný stav problematiky

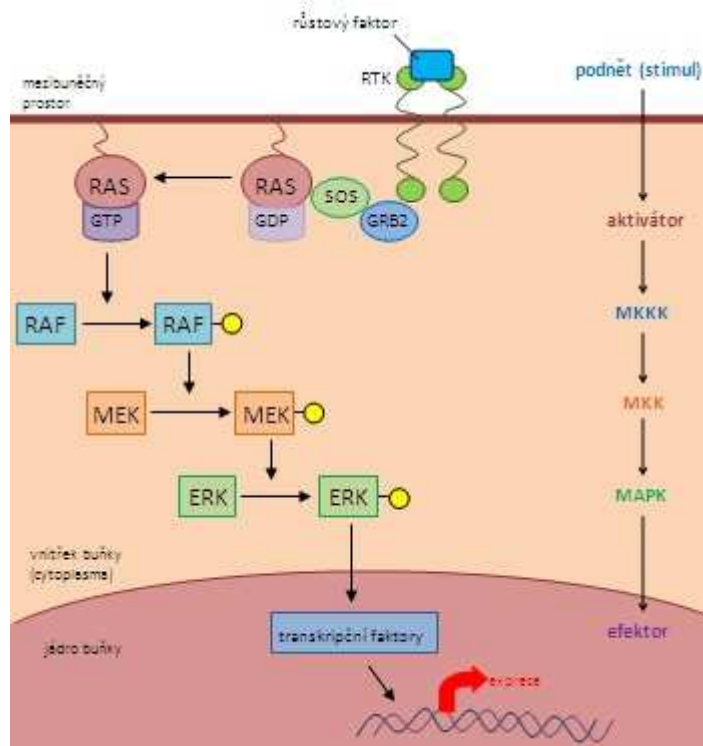
2.1 KRAS

Jedním z klíčových přenašečů signálu zapojených do regulace buněčného dělení a diferenciací je protein KRAS a právě mutace v jeho genu se často vyskytují v souvislosti s nádorovým onemocněním u lidí.

2.1.1 Protein KRAS

Protein KRAS má molekulovou hmotnost 21 kD (jinak se tedy nazývá p21), patří do rodiny GTPáz a funguje jako vnitrobuněčný převaděč signálu. Tento malý protein napojený na vnitřní povrch buněčné membrány převádí signál z povrchu buňky přes cytoplazmu do buněčného jádra. KRAS je GTPáza, takže dokáže vázat molekulu GTP (guanosin trifosfát) a hydrolyzovat ji na GDP (guanosin difosfát). Když má protein navázaný GTP, prodělá změnu konformace do aktivního stavu a přenáší signál aktivací dalších členů signální kaskády. Když pak protein hydrolyzuje GTP na GDP, změní konformaci zpět na původní neaktivní stav a přenos signálu se zastaví.

Aktivace proteinu KRAS je velmi přísně regulována. Tento protein je aktivován různými podněty z vnějšího prostředí, jako jsou hormony nebo růstové faktory. KRAS pak aktivuje metabolickou dráhu tzv. mitogenem aktivovaných protein kináz (MAPKs). Dráha MAPKs (obr. 1) reguluje některé důležité biochemické procesy v buňce tím, že řídí stupeň buněčné diferenciací, rychlost buněčného dělení a zrání. KRAS je tedy jedním z klíčových prvků zapojených do regulace buněčného dělení a diferenciací (Kolch, 2000; Friday *and* Adjei, 2005).



Obr. 1: Schéma signální kaskády MAPKs

RTK – receptorová tyrosinkináza; GRB – protein vázající receptor růstových faktorů; SOS – protein „son of sevenless“; RAF – specifická proteinkináza; MEK - MAP/ERK kináza; ERK – extracelulárním signálem regulovaná kináza; MKKK – kináza aktivující kinázu aktivující MAPK; MKK – kináza aktivující MAPK

2.1.2 Gen *KRAS*

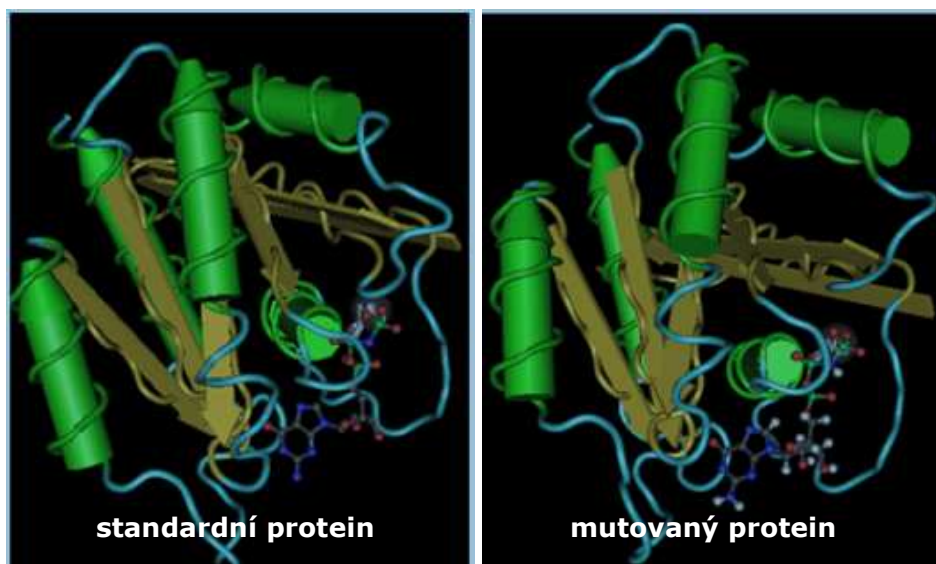
Lidský gen *KRAS* je homolog retrovirových onkogenů Kirsten Rat Sarcoma Viru a Murine Sarcoma Viru (Der *et al.*, 1982; Chang *et al.*, 1982).

V lidském genomu existují dvě kopie genu *KRAS*, označované *KRAS1* a *KRAS2*. Tím podstatným genem je *KRAS2*, *KRAS1* je pseudogen odvozený z *KRAS2* alternativním sestřihem mediátorové RNA (mRNA). mRNA *KRAS2* má 5,5 kb a od transformujícího virového onkogenu se liší pouze v šesti kodonech. McBride *et al.* (1983) lokalizovali protoonkogen *KRAS2* na lidském chromozómu v pozici 12q (na delším rameni chromozómu 12). Popescu *et al.* (1985) později lokus *KRAS2* mapovali metodou *in situ* hybridizace a lokalizovali jej přesněji na pozici 12p11.1-12.1 (na kratším rameni chromozómu 12). Sekvence ukázala, že gen *KRAS2* má šest exonů. Exony 2, 3 a 4 jsou neměnné kódující exony. Při alternativním sestřihu exonu 4 vznikají dvě formy označované 4A a 4B. Exon 5 může být vynechán a prodělává alternativní sestřih, což dává vznik izoformám *KRAS A* a *KRAS B*. Šestý exon kóduje 3'UTR (nepřekládaná oblast na 3' konci) v *KRAS A*

a C-terminální oblast v *KRASB*. *KRASB* je převládající varianta při sestřihu *KRAS2*, stručněji uváděna jako *KRAS* (Wiecek *et al.*).

2.1.3 Proč je KRAS tak důležitým cílem studia

Bylo dokázáno, že v buňkách standardního, divokého typu (wild type - WT) funguje *KRAS* jako nádorový supresor a během vývoje nádoru u mnoha typů rakoviny se často ztrácí. Jak již bylo zmíněno, WT gen *KRAS* kóduje protein, který hraje důležitou roli při regulaci normální buněčné proliferace a diferenciaci. Jakmile gen *KRAS* zmutuje, získá onkogenní vlastnosti a je zapojený do vývoje řady typů rakoviny u lidí. Normální protein *KRAS* přechodně mění svou aktivitu na základě vnějších signálů. Mutovaný protein (obr. 2) zůstává trvale aktivován, trvale v pozici „ON“. Nejčastější onkogenní mutace genu *KRAS* jsou v kodonech 12 a 13 a mají za následek změnu původního glycinu za některou jinou aminokyselinu. Tyto substituce zabraňují hydrolýze GTP na GDP a díky tomu je molekula proteinu *RAS* neustále v aktivním stavu a vede buňku k nekontrolovanému dělení i za nepřítomnosti patřičných signálů. Expresi mutovaného genu *KRAS* také zvyšuje expresi metaloproteinázy 2 v matrix, a tím zvyšuje i invazivnost nádorových buněk. Overexpresi mutované formy *KRAS* rovněž inhibuje glykosylaci β 1-řetězce integrinu což vede ke zvýšené adhezivitě nádorových buněk (Wiecek *et al.*).

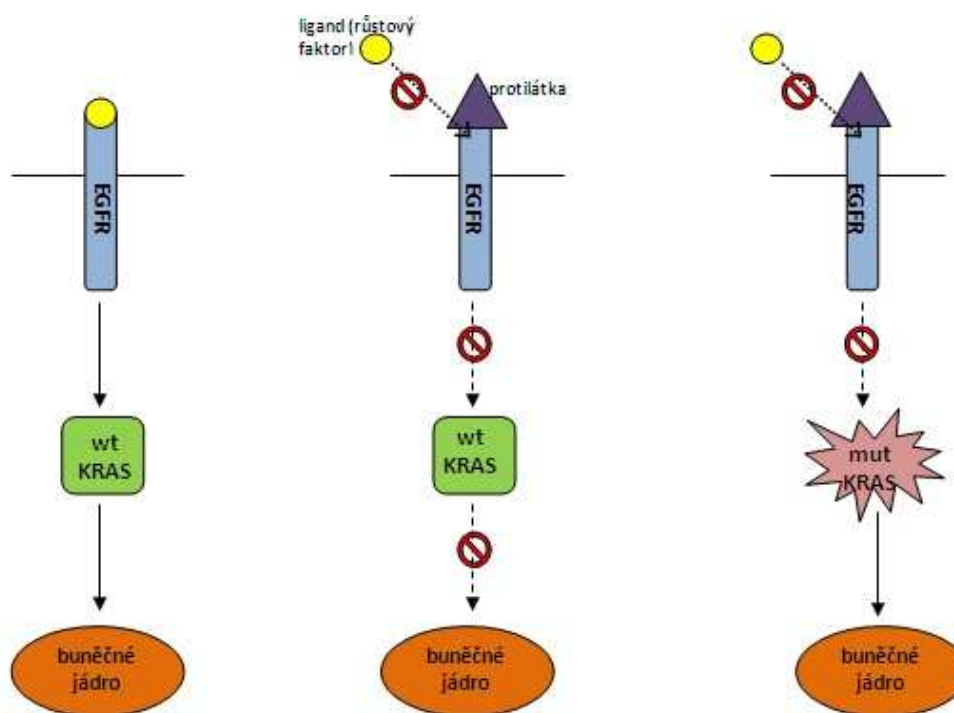


Obr. 2: Standardní protein *KRAS* (vlevo) a mutovaný protein *KRAS* (vpravo) (převzato z prezentace doc. Drábka)

2.1.4 Gen *KRAS* při onkogenezi

Aktivující bodová mutace genu *KRAS* byla prokázána u řady typů lidských nádorů. Tato onkogenní forma genu se vyskytuje především u karcinomu pankreatu (ve více než 80 % případů), karcinomu tlustého střeva (ve 40 - 50 % případů) a karcinomu plic (ve 30 – 50 % případů), ale objevuje se také při zhoubných nádorech žlučových cest, při karcinomu endometria, pochvy, močového měchýře, jater, prsu a u myeloidní leukémie, přičemž záleží také na citlivosti použité detekční metody. Mutace genu *KRAS* má významný dopad na vývoj nádoru, kde záleží na typu buňky a tkáně. Sedm nejčastějších onkogenních mutací genu *KRAS* způsobuje záměny aminokyselin Gly za Ala, Asp, Arg, Ser, Val nebo Cys v kodonu 12 exonu 1 a záměnu Gly za Asp v kodonu 13 exonu 1 (Wiecek *et al.*), tyto mutace tvoří až 94 % všech aktivujících *KRAS* mutací prokázaných v nádorových tkáních (Brink *et al.*, 2003). S menší četností však dochází k mutacím i v kodonech 61, 63, 117, 119 a 146. Zmíněné mutace se vyskytují blízko vazebného místa pro GTP, pozmění vnitřní GTPázovou aktivitu proteinu, což vede k poklesu hydrolýzy GTP a zablokování proteinu v aktivním stavu (Wiecek *et al.*).

Specifické mutace onkogenů (včetně *KRAS*) jsou spojeny s kratší „*time to progression*“ (čas do progresu, čas od diagnózy do zhoršení příznaků) a celkově horším přežíváním. *KRAS* je také jedním z nejdůležitějších markerů rezistence k léčbě protilátkami proti EGFR1 (receptor epidermálního růstového faktoru). Za normálního stavu je totiž EGFR aktivován vazbou ligandu, to vede ke stimulaci intracelulární signální dráhy (jejíž součástí je *KRAS*) a proliferaci buňky. Léčiva na bázi monoklonálních protilátek proti EGFR (cetuximab/Erbitux®, panitumumab/Vectibix® - používané především při léčbě kolorektálního karcinomu) zabraňují aktivaci EGFR, což při nemutovaném (WT) genu *KRAS* zabrání proliferaci nádorových buněk. Naopak aktivující mutace genu *KRAS* má za následek stimulaci buňky k proliferaci i bez aktivace EGFR (obr. 3). Léčba protilátkami proti EGFR je tedy v případě mutace *KRAS* neúčinná (Lievre *et al.*, 2008; Amado *et al.*, 2008).



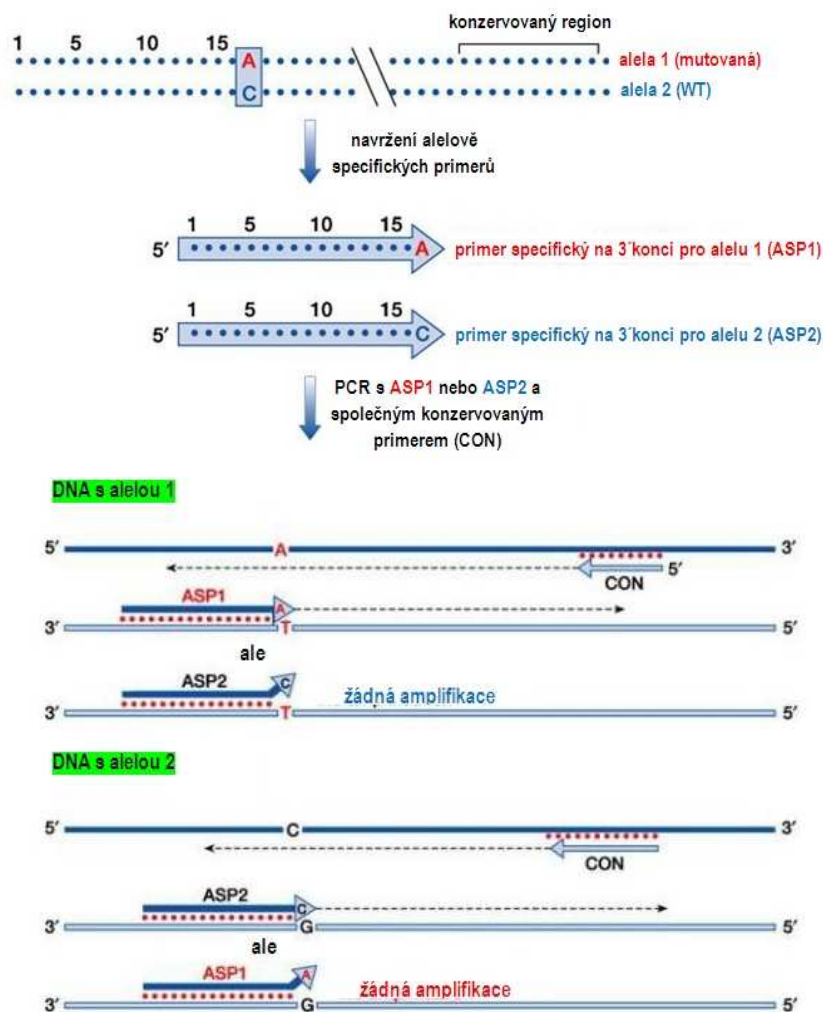
Obr. 3: Vztah mezi stavem proteinu KRAS a účinnosti inhibice EGFR u nádorové buňky

Nepřítomnost či přítomnost mutace genu *KRAS* v buňkách nádoru je velmi důležitým biomarkerem, který pomůže určit správnou prognózu nemoci a vhodnou léčbu pro konkrétní pacienty. V současné době je už detekce mutace *KRAS* u pacientů s kolorektálním karcinomem automaticky vyžadována a na základě výsledků se poté stanovuje nejvhodnější léčba – tedy pouze u pacientů s WT genem *KRAS* se používají zmíněné protilátky proti EGFR (van Cutsem *and* Oliveira, 2009; Kocáková *and* Kiss, 2009).

2.2 Metoda ARMS

Mutace genu *KRAS* jsou velmi významným biomarkerem, a proto je potřeba vyvinout účinné metody detekce těchto mutací. Jednou z takových metod založených na polymerázové řetězové reakci (PCR) je systém, kde mutace/polymorfismus zabrání amplifikaci (amplification refractory mutation system – ARMS, nebo taky Sequence Specific Primers - SSP). Tuto metodu poprvé popsal Newton *et al.* (1989), když ji využil pro detekci bodových změn DNA u pacientů s deficiencí α - 1 antitrypsinu. Tato metoda využívá skutečnosti, že primery mající na 3' konci nukleotid nekomplementární k cílové sekvenci mají mnohem nižší účinnost prodlužování při PCR, než primery plně komplementární k cílové sekvenci. *Taq* DNA polymeráza bez korekturské funkce používaná při PCR prodlužuje primery

s nekomplementárním nukleotidem na 3' konci 40krát až 100krát hůře, než primery s komplementárním nukleotidem. Perfektní komplementarita mezi primerem a templátem vede tedy k amplifikaci, zatímco některé nekomplementarity (nedokonalé spárování, tzv. *mismatch*) mezi templátem a primerem na 3' konci znemožňují amplifikaci (Kitching *and* Seth, 2005). Avšak ne všechny koncové nekomplementarity úplně zabraňují prodlužování primeru a tvorbě amplifikačního produktu, proto jsou primery navrhovány tak, aby měly *mismatch* také na druhé, třetí nebo dokonce čtvrté pozici od 3' konce, což značně zvyšuje specifitu primeru (Old, 2000). Při této metodě je tedy k univerzálnímu (*common*) primeru použit určitý alelově specifický primer (ASP) do páru. V závislosti na přítomnosti mutace v templátu pak proběhne amplifikace buď standardní nebo mutované alely a vznikne produkt očekávané délky (obr. 4). Genotyp vzorku DNA lze určit podle toho, který pár primerů (zda primery pro mutovanou alelu nebo primery pro WT alelu) vytvořil produkt (Kitching *and* Seth, 2005).



Obr. 4: Schéma metody ARMS (upraveno podle: <http://bbs.biogo.net/read.php?tid=38625>)

Technika ARMS obvykle zahrnuje dvě PCR reakce v jedné reakční směsi. Jedna reakce je alelově specifická, s ARMS primerem (specifickým pro určitou mutaci) a dalším (*common*) primerem do páru, aby se vytvořil alelově specifický produkt. Druhá reakce probíhá s párem kontrolních primerů, které vytvoří jiný produkt, nesouvisející s hledanou mutací, aby se zjistilo, zda reakce probíhá správně a není například něčím inhibovaná. Takto lze předejít falešně negativním výsledkům (Old, 2000).

Nejobvyklejším a nejméně složitým způsobem detekce produktu je gelová elektroforéza, při které jsou PCR produkty odděleny od oligonukleotidových primerů a templátu na základě velikosti a detekovány pomocí UV fluorescence interkalačního barviva (Kitching *and* Seth, 2005). V poslední době je však stále více využívána metoda detekce v reálném čase, pomocí tzv. real-time PCR. Detekce a kvantifikace množství amplikonu se v tomto případě provádí pomocí detekce intenzity fluorescenčního signálu ve speciálním zařízení, které kromě cyklického střídání teplot umožňuje také sledovat fluorescenci. Existuje několik různých typů chemismů real-time PCR. Obecně jsou všechny založeny na použití interkalačního barviva vázajícího se na DNA (SYBR Green, EVAGreen), fluorescenčně značených sond vázajících se na střední část amplifikovaného produktu (např. TaqMan, molekulární majáky, dvojice sond využívající FRET - rezonanční přenos fluorescenční energie) nebo fluorescenčně značených primerů (technologie primerů LUX, AmpliFluor, Scorpions), (Šmarda *et al.*, 2005).

2.2.1 Výhody

Metoda ARMS je velmi výhodná v tom, že na rozdíl od některých jiných detekčních metod zjistí nejen přítomnost mutace ale i její typ. Dokáže také rozlišit, zda je zmíněná mutace v homozygotním či heterozygotním stavu. Tato metoda má velmi nízkou mez detekce. Řada studií potvrdila, že dokáže zjistit i pouhé 0,1 % mutovaných alel mezi WT alelami (Neville *et al.*, 1995; Fox *et al.*, 1998; Bezieau *et al.*, 2001). Není však jasné, jaký klinický význam (a zda vůbec nějaký) má tak nízké procento mutovaných alel (Monzon *et al.*, 2009). Komerční kit TheraScreen DxS (využívající tuto techniku ARMS) má stanoven limit detekce na 1 % mutovaných alel ve vzorku, což už je nízké procento s minimálním klinickým významem (TheraScreen® DxS: K-RAS Mutation Kit – Instruction for use).

Obecně má detekce produktů při real-time PCR oproti klasické PCR řadu výhod. Především amplifikace a detekce probíhá najednou a není tedy potřeba po PCR provádět ještě elektroforetickou separaci produktu, což šetří čas, práci i potřebné chemikálie. Celá reakce

probíhá v jedné uzavřené zkumavce (či jamce). Produkty tedy není potřeba pak ještě někde přepipetovávat, což minimalizuje riziko kontaminace předchozím produktem nebo riziko záměny vzorku. Reakce většinou probíhají v 96ti jamkových destičkách, které rovněž usnadňují manipulaci a umožňují analyzovat velké množství vzorků najednou (záleží na počtu mutací, které chceme detekovat – při detekci sedmi nejčastějších mutací genu *KRAS* je na jedné 96ti jamkové destičce možno analyzovat až deset neznámých vzorků). Real-time PCR umožňuje kvantifikaci množství cílové DNA pomocí sledování nárůstu intenzity fluorescence vzorku ve srovnání s nárůstem intenzity fluorescence diluční řady standardu. Oproti tomu u klasické PCR následované elektroforézou lze množství DNA pouze odhadnout na základě intenzity bandu na gelu. Z toho pramení i určitá volnost ohledně množství vstupní DNA (Clayton *et al.*, 2000; van Heek *et al.*, 2005).

Přesné stanovení podílu mutovaných alel ve vzorku (což tato metoda umožňuje) má v případě genu *KRAS* velký význam. Ukázalo se totiž, že pacienti s vyšším procentem mutovaných alel se nacházeli v horším stádiu nemoci a vykazovali kratší dobu přežití (Keohavong *et al.*, 1997).

2.2.2 Komerční kit TheraScreen® DxS

TheraScreen® je komerčně dostupný kit od společnosti DxS Diagnostic Innovations Ltd. (nyní QiaGen) pro detekci sedmi nejčastějších mutací genu *KRAS* (v kodonech 12 a 13 prvního exonu). Využívá právě metody ARMS a real-time detekce PCR produktu chemismem Scorpions (Cross, 2008). Bifunkční molekuly „škorpióny“ jsou oligonukleotidy obsahující PCR primer kovalentně vázaný k hybridizační sondě. Molekula obsahuje na 5' konci fluorofor, který interaguje se zhášečem vázaným na střední část téhož oligonukleotidu. Po dokončení cyklu PCR dojde k intramolekulárnímu přeskupení molekuly v důsledku hybridizace sondy k cílové sekvenci. Fluorofor se tím dostane do dostatečné vzdálenosti od zhášeče a může emitovat fluorescenci (Šmarda *et al.*, 2005).

Pro každý vzorek probíhá osm reakcí: jedna kontrolní reakce (amplifikace oblasti exonu 4 genu *KRAS*) pro stanovení množství DNA ve vzorku, a sedm reakcí pro jednotlivé mutace (amplifikace oblasti exonu 1). V každé reakci je použit jeden Scorpions primer (značený fluoroforem FAM, detekováno při 465 – 510 nm) a jeden ARMS primer pro rozlišení WT a mutované DNA. Každá reakce navíc obsahuje vnitřní kontrolní reakci (Scorpions primery značené fluoroforem HEX, detekováno při 533 – 580 nm). Tato reakce určí, zda PCR zdárně

proběhla (odhalí přítomnost možných inhibitorů, které by mohly způsobit falešně negativní výsledky). Používá se tolik cyklů PCR, aby byl detekován signál mnohem vyšší než šum, který je způsoben signálem templátových molekul a primerů přítomných na začátku reakce. Cyklus, ve kterém hodnota fluorescence překročila prahovou hodnotu (threshold) se nazývá Ct (cycle threshold). ΔCt určitého vzorku se určuje jako rozdíl Ct kontrolní reakce a Ct reakce pro mutaci. Detekční limit je 1 % mutované DNA ve vzorku. U pacienta je prokázána mutace, pokud zároveň:

1. ΔCt (rozdíl Ct kontrolní reakce a Ct reakce pro mutaci) \leq hodnotám v tabulce 1. Pokud je ΔCt rovna limitní hodnotě (ve vzorku je tedy přítomno 1 % mutované DNA), analýza vzorku by se měla opakovat.
2. Ct kontrolní reakce a Ct reakce pro mutaci ≤ 38 (limit hodnotitelnosti je Ct = 38, po 38. cyklu se totiž mohou objevovat falešně pozitivní výsledky)

Je nutné brát v úvahu také nespecifické nasedání primerů (zkřížené reakce). Kit TheraScreen slouží k detekci pouze jedné mutace ve vzorku, pokud některá další mutace dává pozitivní výsledek, jedná se patrně o zkříženou reakci (více různých mutací ve vzorku lze pozorovat velmi vzácně). Pokud charakter výsledku neodpovídá vzoru zkřížené reakce (viz tab. 2), je třeba provést další testování.

Tab. 1: Limitní hodnoty ΔCt pro 1 % mutované DNA na pozadí WT pro kit TheraScreen DxS

Mutace	ΔCt (pro 1 % mutace)
12Ala	6,5
12Asp	8
12Arg	8
12Cys	7
12Ser	9
12Val	6,5
13Asp	9

Tab. 2: Vzor zkřížené reakce pro kit TheraScreen DxS

		Signál (Ct)						
		12Ala	12Asp	12Arg	12Cys	12Ser	12Val	13Asp
Přítomná mutace	12Ala	ano	+9	—	+ 6	+3	+ 6	—
	12Asp	+ 9	ano	—	—	—	—	—
	12Arg	—	—	ano	—	—	—	—
	12Cys	—	+7	+ 4	ano	—	—	—
	12Ser	+9	+ 6	+ 9	—	ano	—	+ 8
	12Val	+ 4	—	—	—	—	ano	—
	13Asp	—	—	—	—	—	—	ano

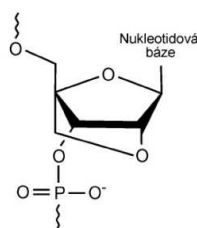
„Ano“ znamená skutečně pravý signál. Čísla udávají přibližný počet cyklů po tomto signálu, kde může být detekován signál zkřížené reakce. Hodnoty více než 9 cyklů nejsou uvedeny, protože tyto signály se již nacházejí v negativní zóně.

Reakce probíhá obvykle v 96ti jamkových destičkách: v osmi řádcích je osm různých reakcí – jedna kontrolní reakce a sedm reakcí pro jednotlivé mutace; ve dvanácti sloupcích jsou různé vzorky (templáty) – jedna negativní kontrola (voda), jedna pozitivní kontrola (směs mutantních DNA – smíšený standard) a deset vzorků vyšetřovaných pacientů.

Jak již bylo zmíněno, tento kit má nízkou mez detekce, dokáže zjistit pouhé 1 % mutované DNA na pozadí WT. Navíc vyžaduje poměrně jednoduchou manipulaci a rychlou analýzu; během osmihodinového pracovního dne lze vyšetřit až třicet pacientů (TheraScreen® DxS: K-RAS Mutation Kit – Instruction for use).

2.2.3 Použití modifikovaných oligonukleotidů s uzamčenou konformací

Detekce mutací v klinických vzorcích je často komplikována přítomností nadbytku normálních (nemutovaných, WT) buněk. Pro usnadnění detekce minoritních mutací v klinických vzorcích byla vyvinuta PCR s blokovací sondou, která zatím není dodávána komerčně ve formě typizační soupravy. Při této technice se používá navíc oligonukleotid nukleové kyseliny s tzv. uzamčenou konformací (locked nucleic acid – LNA), který se pevně váže na WT DNA v místě očekávané mutace a brání její amplifikaci, ale umožňuje amplifikaci mutované DNA. Dochází tedy k selektivní amplifikaci pouze mutovaných alel. LNA (obr. 5) je analog nukleových kyselin s methylenovým můstkem mezi 2'-hydroxylovou skupinou a 4'-uhlíkem furanosového kruhu.



Obr. 5: Schéma nukleotidu s uzamčenou konformací – LNA (zdroj: Beránek *et al.*, 2007)

Oligonukleotidy nahrazené LNA se vážou na přírodní DNA podle standardních pravidel komplementarity bází ale s mnohem vyšší afinitou než klasické. LNA poskytují rovněž vyšší specifitu při detekci mutací a mají větší odolnost vůči nukleázám než klasické DNA oligonukleotidy. Podobně lze použít i jiný typ modifikovaných průb tzv. PNA (peptide nucleic acid), LNA mají ovšem oproti PNA řadu výhod, především vyšší rozpustnost a tedy nižší riziko precipitace během skladování, vyšší teplotu tání a v některých aplikacích též nižší

nespecifické pozadí. S pomocí LNA lze výrazně snížit mez detekce použité PCR metody, přičemž použití LNA není složitější, časově náročnější ani nevyžaduje dodatečné zařízení oproti klasické PCR (Dominguez and Kolodney, 2005; Beránek *et al.*, 2007).

2.3 Další detekční metody

Kromě výše zmíněné metody ARMS, jejíž aplikace je tématem této diplomové práce, existuje celá řada dalších více či méně účinných a citlivých metod, jak je možné detekovat mutace v genu *KRAS*. Zde je jejich stručný přehled:

Tab. 3: Přehled elektroforetických metod použitelných pro detekci mutací *KRAS*

Metoda	Popsal	Pro detekcí mutací <i>KRAS</i> využili například
DGGE	Fischer and Lerman (1983)	Pellegata <i>et al.</i> (1994), Keohavong <i>et al.</i> (1996), Keohavong <i>et al.</i> (2004)
TTGE	Yoshino <i>et al.</i> (1991)	Kressner <i>et al.</i> (1998), Bjørheim <i>et al.</i> (1998)
CDCE	Khrapko <i>et al.</i> (1994)	Bjørheim <i>et al.</i> (1998), Bjørheim <i>et al.</i> (2001), Zhao <i>et al.</i> (2004)
CTCE	Gelfi <i>et al.</i> (1994)	Bjørheim <i>et al.</i> (2003), Kristensen <i>et al.</i> (2008)
ACE	Baba <i>et al.</i> (1992)	Ozaki <i>et al.</i> (1999), Sato <i>et al.</i> (2005)
SSCP	Orita <i>et al.</i> (1989)	Hongyo <i>et al.</i> (1993), Laghi <i>et al.</i> (2002), Dammann <i>et al.</i> (2003), Pan <i>et al.</i> (2004)

DGGE - denaturační gradientová gelová elektroforéza, TTGE - gelová elektroforéza v časovém teplotním gradientu, CDCE - konstantní denaturační kapilární elektroforéza, CTCE - kapilární elektroforéza při cyklické teplotě, ACE - afinitní kapilární elektroforéza, SSCP - jednovláknový konformační polymorfismus

Tab. 4: Přehled PCR metod použitelných pro detekci mutací *KRAS*

Metoda	Popsal	Pro detekcí mutací <i>KRAS</i> využil například
REMS-PCR		Ward <i>et al.</i> (1998)
FLAG		Amicarelli <i>et al.</i> (2007)
PCR/RFLP	Kumar and Dunn (1989)	Urban <i>et al.</i> (2000), Borchers <i>et al.</i> (2002), Dieterle <i>et al.</i> (2004), Kimura <i>et al.</i> (2007)
PCR/LDR	Landegren <i>et al.</i> (1988)	Khanna <i>et al.</i> (1999), Hashimoto <i>et al.</i> (2007)
EndoV/ligázová metoda		Huang <i>et al.</i> (2002)
COLD-PCR	Li <i>et al.</i> (2008)	Zuo <i>et al.</i> (2009)
RCA	Liu <i>et al.</i> (1996)	Li and Zhong (2007)
ACB-PCR	Orou <i>et al.</i> (1995)	McKinzie and Parson (2002), McKinzie <i>et al.</i> (2006)
PNA-PCR clamping	Ørum <i>et al.</i> (1993)	Thiede <i>et al.</i> (1996), Taback <i>et al.</i> (2004), Gilje <i>et al.</i> (2008)
HRM	Wittwer <i>et al.</i> (2003)	Krypuy <i>et al.</i> (2006)

REMS-PCR - selektivní PCR zprostředkovaná restrikčními endonukleázami, FLAG - tvorba fluorescenčně značeného amplikonu, RFLP - délkový polymorfismus restrikčních fragmentů, LDR - ligázová detekční reakce, COLD-PCR - koamplifikace při nižší denaturační teplotě, RCA - amplifikace otáčivou kružnicí, ACB-PCR - PCR s alelově specifickým kompetitivním blokem, HRM - analýza křivek teploty tání s vysokým rozlišením

Tab. 5: Přehled sekvenačních metod použitelných pro detekci mutací *KRAS*

Metoda	Popsal	Pro detekcí mutací <i>KRAS</i> využil například
Enzymatické (Sangerovo) sekvenování	Sanger <i>et al.</i> (1977)	Pellegata <i>et al.</i> (1994), Khanna <i>et al.</i> (1999), Ogino <i>et al.</i> (2005)
Pyrosekvenování	Ronaghi <i>et al.</i> (1996)	Ogino <i>et al.</i> (2005), Dufort <i>et al.</i> (2009)

Tab. 6: Přehled ostatních metod použitelných pro detekci mutací *KRAS*

Metoda	Popsal	Pro detekcí mutací <i>KRAS</i> využil například
LDR spFRET		Wabuyelee <i>et al.</i> (2003)
Southern blotting	Southern (1975)	Nickell-Brady <i>et al.</i> (1994), Graziano <i>et al.</i> (1999)
Elektrochemická detekce na základě povrchové ligační reakce a biometalizace		Zhang <i>et al.</i> (2008)
Dot blotting	Verlaan-de Vries <i>et al.</i> (1986)	Watanabe <i>et al.</i> (1993), Hidaka <i>et al.</i> (2000), van Heek <i>et al.</i> (2005)
SOMA	Laken <i>et al.</i> (1998)	Lleonart <i>et al.</i> (2004)

SOMA – hmotnostní analýza krátkých oligonukleotidů, spFRET – jednobázový rezonanční přenos fluorescenční energie

Kromě již zmíněného TheraScreen® *KRAS* Mutation kit v současné době existují ještě další dva komerčně dostupné systémy pro detekci mutací genu *KRAS* s certifikací CE (Communauté Européene), a to *KRAS* LightMix® kit od firmy TIB MolBiol (na principu PNA-PCR clamping, kdy je amplifikace WT alely zablokována speciální PNA próbou a tak dochází k selektivní amplifikaci mutovaných alel) a *KRAS* StripAssay™ od firmy ViennaLab (na principu alelově specifické oligonukleotidové hybridizace po PCR).

3 Cíle práce

Cílem teoretické části diplomové práce bylo shrnout dostupné poznatky o genu *KRAS*, o významu jeho proteinového produktu, zejména v souvislosti se vznikem nádorového onemocnění, o vlivu mutací v tomto genu na léčbu rakoviny a také o dostupných molekulárně genetických metodách detekce mutací v genu *KRAS*.

Cílem experimentální části diplomové práce bylo navrhnout nejvhodnější postup a podmínky PCR metody (založené na zmíněném principu ARMS s detekcí produktů v reálném čase chemismem interkalačního barviva typu SYBR Green) pro detekci sedmi nejčastějších bodových mutací genu *KRAS* ve 12. a 13. kodonu 1. exonu: Gly12Asp (GGT>GAT), Gly12Ala (GGT>GCT), Gly12Val (GGT>GTT), Gly12Ser (GGT>AGT), Gly12Arg (GGT>CGT), Gly12Cys (GGT>TGT) a Gly13Asp (GGC>GAC). Konkrétně:

1. Výběr vhodných primerů a syntetických standardů (polynukleotidů) pro jednotlivé mutace
2. Optimalizace metody a otestování na vzorcích pacientů
3. Srovnání parametrů s komerčním kitem TheraScreen DxS

4 Materiál a metodika

4.1 Přístroje a pomůcky

Thermocycler pro real-time analýzu - Light Cycler 480II (Roche)

Centrifugy Centrifuge 5430 (Eppendorf)

eppendorf MiniSpin (Eppendorf)

Nanodrop - Spectrofotometer ND 1000 (Biotech)

Vortex (Merci)

Laminární box (Biosan)

Chladnička (Libher)

Mrazící box (LG)

Pipety 0,1 – 2,5 µl; 0,5 – 10 µl; 2 – 20 µl; 10 – 100 µl; 20 – 200 µl; 100 – 1000 µl

(Eppendorf)

Stojánek PCRack s víčkem (P-LAB)

Stojánek pro mikrokumavky „dva v jednom“ s víčkem (P-LAB)

Chladící stojánek na mikrokumavky (Eppendorf)

Chladící stojánek na zkumavky 1,7 ml (P-LAB)

4.2 Spotřební materiál

Zkumavky mikrokumavky pro PCR s plochým víčkem 0,2 ml (P-LAB)

mikrokumavky 1,7 ml (P-LAB)

mikrokumavky se šroubovacím víčkem 0,5 ml (P-LAB)

96ti jamkové destičky LightCycler 480 Multiwell Plate 96 clear + fólie (Roche)

Špičky s dvojitým filtrem 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (Eppendorf)

Ochranné rukavice Digitil N (Hartmann)

4.3 Chemikálie

DEPC-treated water (Ambion)

TRIS - Trizma hydrochloride buffer solution (Sigma-Aldrich) koncentrace 1M

10x PCR pufr (Thermo Scientific)

MgCl₂ solution (Thermo Scientific) koncentrace 25 mM

Thermo Start DNA polymerase (Thermo Scientific) koncentrace 5U/µl

dNTP mix (Thermo Scientific) koncentrace 100 mM

EVAGreen (Biotium)

GoTaq qPCR Mastermix (Promega)

Primery koncentrace 100 μ M

Forward: 63, 322, 334, 336, 338, 339, 341, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 431, 453, 477, 483, 493, 544 (Metabion), 366, 388 (Generi-Biotech), 413 (Pro-Ligo), 422 (Sigma-Aldrich)

Reverse: 64, 323, 335, 337, 432, 454, 478, 484, 494, 546 (Metabion), 340, 367, 389 (Generi-Biotech), 423 (Sigma-Aldrich)

Další primery a sondy: 221 (Metabion), 356 (Sigma-Genosys), 449 (Exiqon)

Syntetické polynukleotidy: 514, 531, 532, 533, 534, 535, 536 (Generi-Biotech)

→ Seznam a sekvence jednotlivých primerů a polynukleotidů viz přílohy, tab. A

4.4 Software

LightCycler 480 SW 1.5

ND – 1000 V3.3.0

FastPCR

STATISTICA v.7

4.5 Biologický materiál

DNA izolovaná z krve či nádorové tkáně pacientů zaslaných na analýzu do Laboratoře experimentální medicíny a DNA izolovaná z buněčných linií.

→ Seznam použitých vzorků DNA viz přílohy, tab. C

DNA byla izolována kitem DNeasy Blood & Tissue Kit 250 (Qiagen) a u některých vzorků byla provedena také celogenomová amplifikace (WGA) pomocí kitu Genome Plex Tissue Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich).

Tuto práci prováděly laborantky z Laboratoře experimentální medicíny.

4.6 Použité statistické metody

V této diplomové práci jsou použity standardní metody jak popisné statistiky, tak testování hypotéz. Spojité proměnné v biomedicínských studiích (jako např. hodnoty Ct) jsou jen zřídka normálně (Gaussovsky) rozdělené. Pokud u prováděných testů bylo zapotřebí předpokládat normalitu dat, testovali jsme nejdříve hypotézu, že data jsou výběrem z Gaussova rozdělení. Data, která nejsou normálně rozdělena, byla analyzována neparametrickými metodami. Pro většinu porovnávání (dvou a více skupin) byl použit Kruskal-Wallisův test. Tento test porovnává mediány jednotlivých skupin a určuje, zda se jedná o výběry ze stejného rozdělení. Kruskal-Wallisův test je neparametrickou obdobou ANOVy s jednoduchým tříděním a je rozšířením Wilcoxonova dvouvýběrového testu na více skupin. Všechny hypotézy jsou testovány na hladině významnosti 95%, tj. p-value menší než 0,05 je považována za statisticky signifikantní. Všechny statistické analýzy byly provedeny v softwaru Statistica, verze 7.

Zpracováno s pomocí Mgr. Jany Fürstové.

4.7 Návrh primerů a polynukleotidů

Bylo navrženo celkem sedm forward (F) primerů specifických k sedmi nejčastějším bodovým mutacím genu *KRAS* (12Arg, 12Ser, 12Cys, 12Val, 12Asp, 12Ala a 13Asp) a jeden primer specifický k nemutovanému (WT) templátu. Tyto primery byly navrženy tak, aby svým 3' koncem zasahovaly do místa očekávané mutace (tak, aby vyhovovaly principu techniky ARMS, viz kap. 2.2). Také bylo navrženo dalších sedm forward primerů, rovněž specifických k sedmi nejčastějším bodovým mutacím genu *KRAS* (se stejnou sekvencí jako ty předchozí), ale tyto další forward primery obsahovaly na svém 3' konci místo obvyklého nukleotidu vylepšený nukleotid s uzamčenou konformací (LNA). Dále byl navržen reverse (R) primer použitelný v kombinaci se všemi sedmi forward primery. Primerový pár amplifikuje oblast prvního exonu genu *KRAS* o délce 93 bp obsahující místo očekávané mutace. Velikost amplikonu je tak malá, aby se zvýšila pravděpodobnost úspěšné amplifikace při částečné degradaci DNA.

Byl navržen blokovací oligonukleotid zasahující do místa očekávané mutace, specifický pro WT templát. Tento oligonukleotid má na svém 5' konci fosforthoát, aby se zabránilo degradaci polymerázou (pokud je použita polymeráza s 5'-3' exonukleázovou aktivitou), a na

3' konci aminoskupinu, aby se zabránilo dalšímu prodlužování (takže tento oligonukleotid nemůže fungovat jako primer). Tento oligonukleotid má zároveň tři z nukleotidů nahrazeny LNA, díky čemuž vytváří pevnější vazbu s templátem (viz kap 2.2.3). Tento blokovací oligonukleotid by měl zabránit nežádoucí amplifikaci z WT templátu.

Primery byly navrženy pomocí počítačového programu FastPCR.

Tuto práci prováděl doc. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

Nakonec bylo navrženo sedm polynukleotidů o délce 99 bp se stejnou sekvencí jako oblast prvního exonu genu *KRAS* amplifikovaná pomocí výše zmíněných primerů. Každý z těchto sedmi polynukleotidů se lišil pouze v jednom nukleotidu (ve dvanáctém či třináctém kodonu, kde byla očekávaná bodová mutace), takže každý představoval templátovou DNA s jednou ze sedmi nejčastějších mutací genu *KRAS* (12Arg, 12Ser, 12Cys, 12Val, 12Asp, 12Ala a 13Asp). Směs těchto sedmi typů polynukleotidů byla použita jako standard pro kontrolu, zda v příslušném reakčním běhu správně fungují všechny specifické primery pro jednotlivé *KRAS* mutace.

→ Seznam a sekvence použitých primerů a polynukleotidů viz přílohy, tab. A

4.8 Výběr typu a koncentrace primerů a blokovacího oligonukleotidu

4.8.1 Typ a koncentrace primerů specifických k mutaci

Byly testovány primery (specifické k mutaci 12Cys) s LNA a bez LNA vždy ve třech různých koncentracích. Jako templátové DNA byly vybrány patientské vzorky 2902, 2598 a 2862 (viz přílohy, tab. C). Nejdříve byly vzorky DNA 4x předředěny v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich). Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μ l GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 2 μ l předředěné templátové DNA nebo 10mM TRIS (jako beztemplátovou kontrolu – NTC) a 0,1 μ M, 0,2 μ M nebo 0,5 μ M příslušného primeru forward (342 nebo 413) a reverse 340 (viz přílohy, tab. A). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μ l. Vždy všechny čtyři templáty byly testovány s oběma typy primerů o všech třech koncentracích. Teplotní podmínky PCR byly následující: úvodní denaturace 2 min 95°C, dále 45 cyklů (15 sec 95°C, 50 sec 65°C a 20 sec 72°C) s měřením fluorescence při 65°C (fluorescence byla měřena při 498 - 580 nm), dále měření T_m (melting temperature) při kontinuálně stoupající teplotě od 72°C do 95°C (měření fluorescence při každém posunu o 0,1°C), nakonec 1 sec 37°C; thermocycler pro real-time analýzu - Light

Cycler 480II (Roche). Výsledky byly analyzovány pomocí počítačového programu LightCycler 480 SW 1.5.

4.8.2 Funkčnost a koncentrace blokovacího oligonukleotidu

Byly opět testovány primery (specifické k mutaci 12Cys) s LNA a bez LNA vždy ve dvou různých koncentracích (zjištěných při předchozím experimentu jako nejlepší) navíc ještě v kombinaci s blokovacím oligonukleotidem ve dvou různých koncentracích nebo bez blokovacího oligonukleotidu. Jako templátové DNA byly vybrány pacientské vzorky 2868, 2865, 2598 a 2862 (viz přílohy, tab. C). Nejdříve byly opět vzorky DNA 4x předředěny v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich). Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μ l GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 2 μ l předředěné templátové DNA nebo 10mM TRIS (NTC), 0,2 μ M nebo 0,5 μ M příslušného primeru forward (342 nebo 413) a reverse 340 a 0,2 μ M nebo 1 μ M blokovacího LNA oligonukleotidu 449 nebo bez něj (viz přílohy, tab. A). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μ l. Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků.

4.8.3 Účinnost blokovacího oligonukleotidu

Byly testovány primery (specifické k WT, bez LNA) vždy samostatně nebo v kombinaci s blokovacím oligonukleotidem. Jako templát byly vybrány vzorky DNA buněčných linií a pacientské DNA (1427, 2953, 2960, 2962, 2976, 3050, 3071, 3088 a 3323; viz přílohy, tab. C). Nejdříve byly opět vzorky DNA 4x předředěny v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich). Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μ l GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 2 μ l předředěné templátové DNA nebo 10mM TRIS (NTC), 0,2 μ M primeru forward 339 a reverse 340 a 0,2 μ M blokovacího LNA oligonukleotidu 449 nebo bez něj (viz přílohy, tab. A). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μ l. Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků.

4.8.4 Výběr vhodného nespecifického primerového páru

Bylo testováno třináct různých primerových směsí (primer mix, PM) – PM 27, 169, 176, 177, 203, 236, 247, 262, 273, 276, 281, 307 a 322 (viz přílohy, tab. B) obsahující vždy určitý F a R primer a případně i nějaký další oligonukleotid či sondu (viz přílohy, tab. A a tab. B). Tyto primerové směsi by měly amplifikovat DNA nezávisle na *KRAS* mutaci. Jako templát byly vybrány patientské vzorky 2814, 2944 a 3047 (viz přílohy, tab. C). Nejdříve byly opět vzorky DNA 4x předředěny v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich). Reakční směs pro PCR obsahovala: 1 μ l PCR pufr, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs, 0,5U Thermo Start DNA polymerase (Thermo Scientific), 0,25 μ l EVAGreen (Biotium), 2 μ l předředěné templátové DNA nebo 10mM TRIS (NTC), 0,04 μ l příslušného PM (PM 27, 169, 176, 177, 203, 236, 247, 262, 273, 276, 281, 307 nebo 322; viz přílohy, tab. B). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μ l. Teplotní podmínky PCR byly následující: úvodní denaturace 15 min 95°C, dále 45 cyklů (15 sec 95°C, 50 sec 65°C a 20 sec 72°C) s měřením fluorescence při 65°C (fluorescence byla měřena při 465 - 510 nm), dále měření T_m při kontinuálně stoupající teplotě od 72°C do 95°C (měření fluorescence při každém posunu o 0,1°C), nakonec 1 sec 37°C. Byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků jako při předchozích experimentech.

4.8.5 Příprava primerových směsí specifických k jednotlivým *KRAS* mutacím

Pro účely zjednodušení manipulace s chemikáliemi a minimalizace kontaminace zásobních roztoků primerů specifických k jednotlivým *KRAS* mutacím, byly také z těchto primerů připraveny primerové směsi (PM) obsahující vždy R primer 340, určitý F primer specifický k jedné ze sedmi *KRAS* mutací (obyčejné primery bez LNA, vybráno na základě předchozích experimentů, viz kap. 5.1.2) a také LNA blokovací oligonukleotid 449, všechny tyto tři komponenty ve stejné koncentraci. Takto bylo připraveno sedm nových PM, každá specifická k určité *KRAS* mutaci (viz tab. 7; viz také přílohy, tab. B).

Do dalších experimentů už budou používány místo jednotlivých primerů tyto připravené PM a to v množství 0,0602 μ l na 10 μ l PCR reakce, díky tomu bude v reakci přítomen F primer, R primer i LNA blokovací oligonukleotid v koncentraci 0,2 μ M (tato koncentrace byla vybrána na základě dřívějších experimentů jako nejvhodnější, viz kap. 5.1.2).

Tab. 7: Nově připravené primerové směsi (PM) specifické k sedmi nejčastějším *KRAS* mutacím

Označení PM	Druh PM	Obsažené komponenty		
		F primer	R primer	Další oligonukleotid
301	<i>KRAS</i> 12Arg s blokem WT	338	340	449
355	<i>KRAS</i> 12Ala s blokem WT	345	340	449
356	<i>KRAS</i> 12Asp s blokem WT	344	340	449
357	<i>KRAS</i> 12Cys s blokem WT	342	340	449
358	<i>KRAS</i> 12Ser s blokem WT	341	340	449
359	<i>KRAS</i> 12Val s blokem WT	343	340	449
360	<i>KRAS</i> 13Asp s blokem WT	346	340	449

4.9 Určení limitu hodnotitelnosti

K určení limitu hodnotitelnosti byly využity výsledky experimentů s různě zpracovávanými vzorky krevní plazmy. Z krevní plazmy bylo izolováno celkem 96 vzorků WT DNA (viz. přílohy, tab. E) a do poloviny těchto vzorků (vzorky 49 – 96) byla přidána DNA 1241 (viz. přílohy, tab. C) obsahující *KRAS* mutaci 12Asp. Pro následnou detekci mutace 12Asp byl použit náš nový PCR systém. Reakční směs pro PCR tedy obsahovala: 5 µl GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 0,5 µl templátové DNA, 0,0602 µl PM 356 (viz přílohy, tab. B). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 µl. Teplotní podmínky PCR byly následující: úvodní denaturace 2 min 95°C, dále 45 cyklů (15 sec 95°C, 50 sec 65°C a 20 sec 72°C) s měřením fluorescence při 65°C (fluorescence byla měřena při 498 - 580 nm), dále měření T_m při kontinuálně stoupající teplotě od 72°C do 95°C (měření fluorescence při každém posunu o 0,1°C), nakonec 1 sec 37°C. Byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků jako při předchozích experimentech.

4.10 Příprava smíšeného standardu

4.10.1 Výběr nejvhodnější koncentrace

První výběr vhodné koncentrace:

Sedm syntetických polynukleotidů 514, 531, 532, 533, 534, 535 a 536 (viz přílohy, tab. A) bylo naředěno ve sterilní DEPC-treated water (Ambion) na koncentraci 0,1 µM, 0,01 µM a 0,001 µM. Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 µl GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 0,02 µM, $2 \cdot 10^{-3}$ µM nebo $2 \cdot 10^{-4}$ µM jednoho ze sedmi syntetických

polynukleotidů (jako templát) nebo 2 μl 10mM TRIS (NTC), 0,0602 μl příslušného PM (PM 301, 355, 356, 357, 358, 359 nebo 360; viz přílohy, tab. B). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μl . Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků.

Kombinace standardu s WT DNA:

Byl testován pouze syntetický polynukleotid 535 (viz přílohy, tab. A) jako samostatný templát nebo v kombinaci s WT DNA. Polynukleotid 535 byl ještě více naředěn v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich) na koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ μM , $1 \cdot 10^{-4}$ μM a $5 \cdot 10^{-5}$ μM . Vzorek DNA 2799 (viz přílohy, tab. C) byl 4x předředěn v 10mM TRIS. Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μl GoTaq qPCR Mastermix (Promega), $1 \cdot 10^{-5}$ μM , $5 \cdot 10^{-6}$ μM nebo $2,5 \cdot 10^{-6}$ μM syntetického polynukleotidu 535 jako samostatný templát nebo $1 \cdot 10^{-5}$ μM , $5 \cdot 10^{-6}$ μM nebo $2,5 \cdot 10^{-6}$ μM syntetického polynukleotidu 535 v kombinaci s 1 μl 4x předředěné WT DNA 2799 (směs standardu a WT DNA jako templát) nebo 2 μl 10mM TRIS (NTC), 0,0602 μl PM 357 (viz přílohy, tab. B). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μl . Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků.

Další výběr vhodné koncentrace všech standardů v kombinaci s WT DNA:

Všech sedm syntetických polynukleotidů 514, 531, 532, 533, 534, 535 a 536 (viz přílohy, tab. A) bylo ještě více naředěno v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich) na koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ μM , $5 \cdot 10^{-6}$ μM a $2,5 \cdot 10^{-6}$ μM . Vzorek DNA 3068 (viz přílohy, tab. C) byl 4x předředěn v 10mM TRIS. Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μl GoTaq qPCR Mastermix (Promega), $5 \cdot 10^{-7}$ μM , $2,5 \cdot 10^{-7}$ μM nebo $1,25 \cdot 10^{-7}$ μM jednoho ze sedmi polynukleotidů v kombinaci s 1 μl 4x předředěné WT DNA 3068 (jako templát) nebo 2 μl 10mM TRIS (NTC), 0,0602 μl příslušného PM (PM 301, 355, 356, 357, 358, 359 nebo 360; viz přílohy, tab. B). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μl . Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků.

4.10.2 Test smíšeného standardu

Syntetický polynukleotid 534 (viz přílohy, tab. A) byl naředěn v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich) na koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ μM . Ostatních šest syntetických polynukleotidů 514, 531, 532, 533, 535 a 536 (viz přílohy, tab. A) bylo naředěno v 10mM TRIS na koncentraci $6,25 \cdot 10^{-7}$ μM . Vzorek DNA 3068 (viz přílohy, tab. C) byl 4x předředěn v 10mM TRIS. Všechna sedm naředěných polynukleotidů a předředěná WT DNA byly smíchány ve stejném poměru, čímž vznikl „smíšený standard“ obsahující nejvhodnější koncentrace jednotlivých syntetických polynukleotidů, jak bylo vybráno na základě předchozích experimentů a WT DNA (viz tab. 8).

Tab. 8: Koncentrace jednotlivých polynukleotidů a WT DNA ve smíšeném standardu

Polynukleotid	Koncentrace [μM]	Výsledné množství polynukleotidu v reakci [μmol]
514	$7,81 \cdot 10^{-8}$	$1,56 \cdot 10^{-13}$
534	$6,25 \cdot 10^{-7}$	$1,25 \cdot 10^{-12}$
535	$7,81 \cdot 10^{-8}$	$1,56 \cdot 10^{-13}$
533	$7,81 \cdot 10^{-8}$	$1,56 \cdot 10^{-13}$
531	$7,81 \cdot 10^{-8}$	$1,56 \cdot 10^{-13}$
532	$7,81 \cdot 10^{-8}$	$1,56 \cdot 10^{-13}$
536	$7,81 \cdot 10^{-8}$	$1,56 \cdot 10^{-13}$
Vzorek WT DNA	Ředění	Výsledné ředění WT DNA v reakci
3068	32x	160x

Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μl GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 2 μl smíšeného standardu (jako templát) nebo 2 μl 10mM TRIS (NTC), 0,0602 μl příslušného PM (PM 301, 355, 356, 357, 358, 359 nebo 360; viz přílohy, tab. B). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μl . Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků.

4.11 Určení optimálního množství templátové DNA

Bylo testováno, jaké vstupní množství templátové DNA je nejvhodnější přidávat do reakce. Jako templát byla vybrána DNA buněčné linie NCI-H1975 (vzorek 3234; viz přílohy, tab. C). Nejprve byla pomocí Nanodropu (Spectrofotometer ND 1000, Biotech) změřena

koncentrace vzorku DNA 3234, která činí 231,68 ng/μl. Poté byla z tohoto vzorku DNA připravena diluční řada v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich), kdy každé následující ředění bylo 4x ředěnější než předchozí. Ředění a jednotlivé koncentrace byly následující (viz tab. 9):

Tab. 9: Koncentrace DNA v diluční řadě vzorku 3234

Ředění	Koncentrace DNA [ng/μl]	Konečné množství DNA v reakci [ng]
neředěné	231,68	115,84
4x	57,92	28,96
16x	14,48	7,24
64x	3,62	1,81
256x	0,905	0,453
1024x	0,226	0,113
4096x	$5,66 \cdot 10^{-2}$	$2,83 \cdot 10^{-2}$

Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μl GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 0,5 μl templátové DNA (jednotlivá ředění diluční řady), 0,2 μM forward primeru 339 a reverse primeru 340 (viz přílohy, tab. A). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μl. Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků.

4.12 Určení meze detekce

4.12.1 Výběr a ředění buněčných linií

Podle databáze COSMIC, článku Mitsudomi *et al.*, 1991 a výsledků dřívějšího testování komerčním kitem TheraScreen DxS byly vybírány vhodné vzorky DNA různých buněčných linií obsahujících jednotlivé *KRAS* mutace a jedna buněčná linie neobsahující žádnou *KRAS* mutaci. Bylo vybíráno ze vzorků 1241, 2961, 2962, 3012, 3021, 3159, 3234, 3250 a 3339 (viz přílohy, tab. C). Nejprve byla pomocí Nanodropu (Spectrofotometer ND 1000, Biotech) změřena koncentrace všech devíti vzorků DNA (viz tab. 17).

Osm vybraných vzorků (sedm buněčných linií s různými *KRAS* mutacemi a jedna buněčná linie bez *KRAS* mutace, viz kapitola 5.5.1) byly poté naředěny v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich) na koncentraci 10 ng/μl a z DNA sedmi buněčných linií obsahujících jednotlivé *KRAS* mutace, byly připraveny diluční řady ve WT DNA 3234. Jednotlivá ředění obsahovala 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 % a 0,125 % mutované DNA na pozadí WT DNA.

4.12.2 Určení meze detekce pomocí buněčné linie NCI-H2009

Bylo testováno, jaké množství mutované DNA na pozadí WT je tento PCR systém schopen zachytit. Jako templát byla použita diluční řada DNA buněčné linie NCI-H2009 (vzorek 3250; viz přílohy, tab. C) obsahující *KRAS* mutaci 12Ala v koncentraci 100%, 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 % a 0,125 % na pozadí WT DNA, jak bylo výše popsáno (kap. 4.12.1). Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μ l GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 0,5 μ l templátové DNA (jednotlivá ředění diluční řady) nebo 10mM TRIS (NTC), 0,0602 μ l příslušného PM (PM 307, 301, 355, 356, 357, 358, 359 nebo 360; viz přílohy, tab. B). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μ l. Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků.

4.12.3 Určení limitní Δ Ct pro ostatní *KRAS* mutace

Podobně jako v předchozím experimentu bylo zjišťováno limitní Δ Ct (na hranici 1 % mutace na pozadí WT) u zbylých šesti buněčných linií (pro zbylých šest *KRAS* mutací). Jako templát byly použity DNA buněčných linií AsPC-1, NCI-H157, NCI-H358, A549, NCI-H620 a NCI-H647 (ředění z dříve připravených dilučních řad, viz kap. 4.12.1) obsahující příslušnou *KRAS* mutaci v koncentraci 100% a 1 %. Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μ l GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 0,5 μ l templátové DNA (jednotlivá ředění diluční řady) nebo 10mM TRIS (NTC), 0,0602 μ l příslušného PM (PM 307, 301, 355, 356, 357, 358, 359 nebo 360; viz přílohy, tab. B). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μ l. Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků.

4.13 Analýza reálných vzorků

Naším kompletním PCR systémem bylo analyzováno dvacet patientských vzorků - vzorky 2814, 3209, 3194, 3047, 2950, 2951, 2782, 2997, 2952, 2944, 2912, 3050, 2953, 3323, 2976, 3071, 3088, 3064, 2977 a 2829 (již dříve otestované kitem TheraScreen, viz přílohy, tab. C). Nejdříve byly vzorky DNA 4x předředěny v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich). Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μ l GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 2 μ l 4x předředěné

templátové DNA, 2 μ l smíšeného standardu (připravený viz tab. 8) nebo 10mM TRIS (NTC), 0,0602 μ l příslušného PM (PM 307, 301, 355, 356, 357, 358, 359 nebo 360; viz přílohy, tab. B). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μ l. Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků. Princip rozložení na 96ti jamkové destičce je stejný jako u kitu TheraScreen DxS, tedy ve dvanácti sloupcích dvanáct různých templátů (smíšený standard, NTC a deset vzorků pacientů) a pro každý templát osm reakcí s různými PM (kontrolní reakce a sedm reakcí pro sedm různých *KRAS* mutací).

4.13.1 Hodnocení opakovatelnosti metody

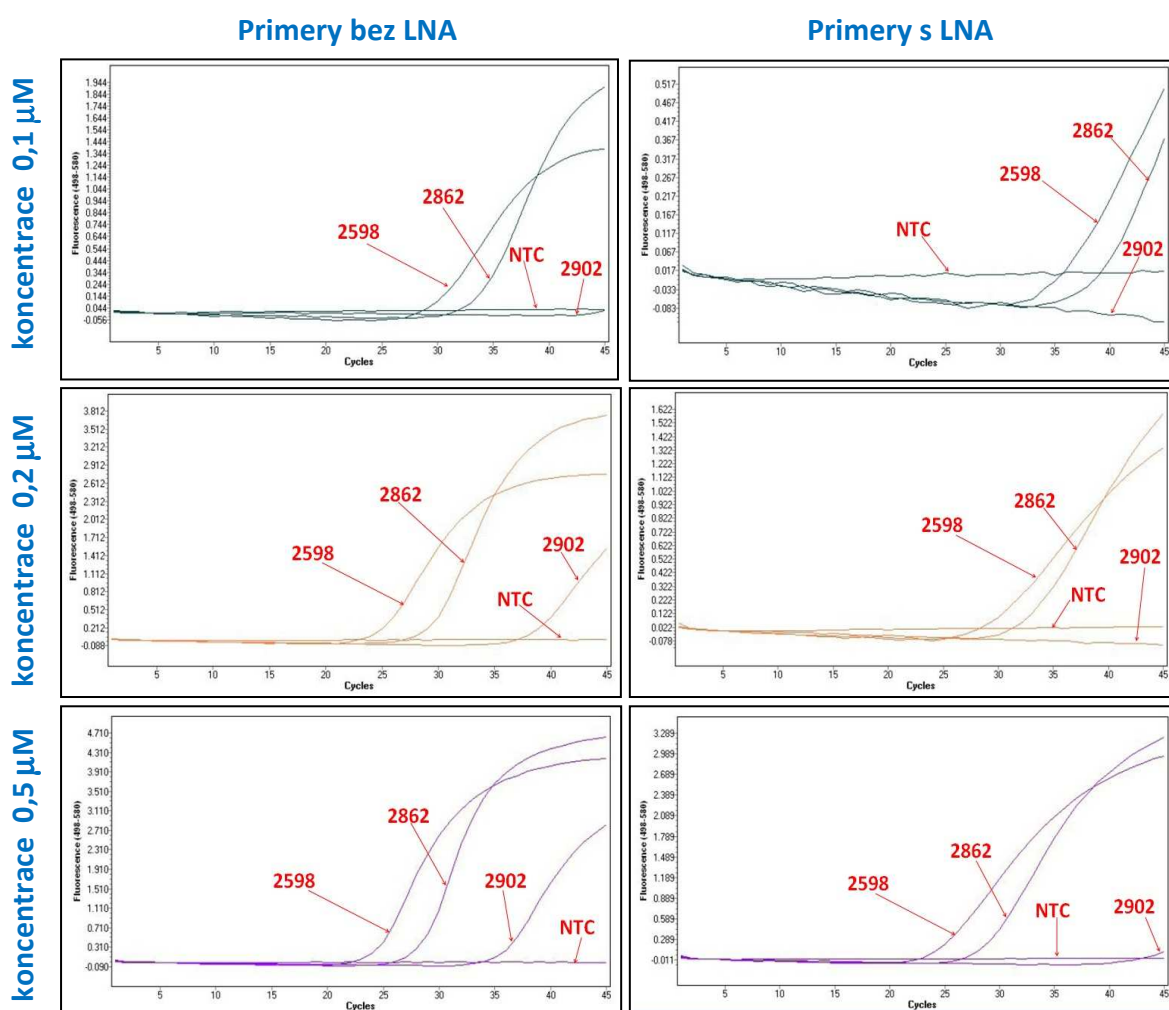
Pro zjištění, zda je náš nový PCR systém schopen dávat opakovaně stejné výsledky, byly celkem 5x analyzovány patientské vzorky 3209, 3194, 3047 a 2950 (viz přílohy, tab. C) Nejdříve byly vzorky DNA 4x předředěny v 10mM TRIS (Sigma-Aldrich). Reakční směs pro PCR obsahovala: 5 μ l GoTaq qPCR Mastermix (Promega), 2 μ l 4x předředěné templátové DNA, 0,0602 μ l příslušného PM (PM 307, 301, 355, 356, 357, 358, 359 nebo 360; viz přílohy, tab. B). Směs byla doplněna sterilní DEPC-treated water (Ambion) do reakčního objemu 10 μ l. Teplotní podmínky reakce byly stejné jako v předchozím experimentu a byl použit stejný přístroj a stejný počítačový software pro analýzu výsledků.

5 Výsledky

5.1 Výběr typu a koncentrace primerů a blokovacího oligonukleotidu

5.1.1 Typ a koncentrace primerů specifických k mutaci

Bylo testováno, jakou koncentraci primeru specifického ke konkrétní *KRAS* mutaci je nejvhodnější přidávat do reakce a také, zda bude lepší používat obyčejné primery nebo vylepšené primery s LNA.



Obr. 6: Amplifikační křivky pro různé koncentrace primerů

2598 a 2862- pozitivní vzorky; 2902 – negativní (WT) vzorek; NTC – beztemplátová kontrola (TRIS)

Výsledky ukázaly, že při koncentraci primerů 0,1 μM (primery jak s LNA tak bez LNA) je amplifikace velmi slabá až nedostatečná. Do dalších experimentů je tedy použitelná koncentrace 0,2 μM nebo 0,5 μM . Co se týče typu primerů, ukázalo se, že primery s LNA jsou

dostatečně specifické (i bez přídavných blokovacích oligonukleotidů), tedy nasedají opravdu pouze na templát s mutací, zatímco obvyčejné primery amplifikují také WT templát (i když o několik cyklů později). Na druhou stranu je ale amplifikace pomocí primerů s LNA slabší a amplifikační křivky nemají příliš standardní (sigmoidní) tvar (viz obr. 6).

5.1.2 Funkčnost a koncentrace blokovacího oligonukleotidu

Bylo testováno, jak obvyčejné a vylepšené primery specifické ke konkrétní *KRAS* mutaci v různých koncentracích fungují v kombinaci s blokovacím oligonukleotidem v různých koncentracích nebo bez něj. Experiment byl prováděn třikrát. Výsledky (viz přílohy, tab. D) nejsou úplně jednoznačné. K amplifikaci templátů se specifickou mutací (vzorky 2598 a 2862) dochází podle očekávání okolo 24. a 29. cyklu, zatímco k amplifikaci WT templátů (vzorky 2868 a 2865) dochází vzácně (i bez přítomnosti blokovacího oligonukleotidu) a pokud ano, tak až velmi pozdě (až po 37. cyklu). Na základě zvážení všech dosud získaných výsledků (dále viz diskuze) bylo nakonec rozhodnuto, že do následujících experimentů bude nejvhodnější používat obvyčejné primery v koncentraci 0,2 μ M v kombinaci s blokovacím oligonukleotidem o stejné koncentraci.

5.1.3 Účinnost blokovacího oligonukleotidu

Tab. 10: Výsledky (hodnoty Ct a Δ Ct) při použití samostatných primerů a primerů v kombinaci s LNA blokovacím oligonukleotidem

Vzorek	Ct		Δ Ct
	při použití pouze primerů pro WT	při použití primerů pro WT v kombinaci s blokovacím oligonukleotidem	
1427	26,58	33,95	7,37
2953	27,33	39,27	11,94
2960	25,66	36,96	11,3
2962	23,48	35,31	11,83
2976	25,24	34,20	8,96
3050	25,89	32,82	6,93
3071	25,29	33,51	8,22
3088	24,96	36,69	11,73
3323	25,35	35,77	10,42

Výsledky (viz tab. 10) ukázaly, že blokovací oligonukleotid (v koncentraci, která byla vybrána na základě předchozích experimentů) je schopen zvýšit hodnoty Ct průměrně o 9,86

cyklů oproti použití samotných primerů pro WT, tedy zabránit nasedání specifického WT primeru na WT templát a blokovat tak amplifikaci.

5.1.4 Výběr vhodného nespecifického primerového páru

Bylo testováno třináct různých primerových směsí (PM 27, 169, 176, 177, 203, 236, 247, 262, 273, 276, 281, 307 a 322; viz přílohy, tab. B), které by měly amplifikovat genomickou DNA nezávisle na *KRAS* mutaci. Z nich bylo potřeba vybrat takové PM, které bude použitelné do reakce jako pozitivní kontrola. Každé z třinácti PM bylo testováno na třech genomických DNA a bylo zjišťováno, zda je schopné při zvolených PCR podmínkách účinně amplifikovat genomickou DNA.

Tab. 11: Výsledky testování nespecifických PM

PM	Vzorky	Ct				Tm [°C]				Poznámky
		2814	3047	2944	NTC	2814	3047	2944	NTC	
27		35,26	37,32	35,39	—	80,94	80,29 82,81	82,46	—	amplifikace pozdě a křivky nemají příliš standardní tvar
169		24,05	24,81	22,82	—	81,90	78,32 81,61	78,34 81,61	—	přítomnost nespecifických Tm píků (primerové dimery)
176		22,72	23,62	21,98	—	80,19 83,98	80,11	80,17	—	přítomnost nespecifických Tm píků
177		24,15	26,46	24,30	30,76	86,96	86,81	86,97	83,47	signál také u NTC
203		23,04	24,38	22,85	—	85,77	85,63	85,75	—	
236		26,04	28,37	24,81	—	86,33	83,01 86,26	82,94 86,84	—	přítomnost nespecifických Tm píků
247		21,84	21,91	21,55	24,21	77,84 82,81	77,80 82,49	77,70 82,58	77,67	přítomnost nespecifických Tm píků a signál také u NTC (primerové dimery)
262		31,78	32,88	31,99	—	84,65	84,48	84,53	—	amplifikace pozdě
273		22,88	23,30	21,89	—	79,61	79,51	79,71	—	
276		22,31	22,99	22,25	40	82,60	82,46	82,68	77,44	signál také u NTC (primerové dimery)
281		23,25	24,54	22,87	38,05	82,34	82,25	82,35	77,85	signál také u NTC (primerové dimery)
307		22,27	23,85	22,39	—	85,40	85,23	85,29	—	
322		29,62	30,14	28,23	—	80,58 84,44	81,15	81,05	—	amplifikační křivky nemají příliš standardní tvar

Podle výsledků (viz tab. 11) lze soudit, že jako pozitivní kontrola do připravovaného PCR systému jsou použitelné PM 203, 273 nebo 307. Každá z těchto tří primerových směsí při použitém množství (0,04 μ l na 10 μ l reakce) a při zvolených podmínkách účinně

amplifikuje genomickou DNA, nevykazuje přítomnost nespecifických produktů ani netvoří primerové dimery. Z těchto tří vhodných PM bylo vybráno PM 307, které se bude používat do reakce jako pozitivní kontrola (podle které se bude hodnotit množství DNA v patientském vzorku a odpočítávat hodnoty ΔC_t podobně jako u komerčního kitu TheraScreen DxS).

5.2 Určení limitu hodnotitelnosti

Na základě výsledků (viz přílohy, tab. E) je zřejmé, že u vzorků, do kterých nebyla přidána DNA s mutací (vzorky 1 – 48), k amplifikaci pomocí specifického PM někdy docházelo, ale pokud se jednalo skutečně o specifický produkt (na základě analýzy $T_m \cong 80$) tak vždy až po 35. cyklu ($C_t > 35$). Pokud u těchto WT vzorků bylo $C_t < 35$, nejednalo se o amplifikaci, ale o dimerizaci primerů ($T_m \cong 77$). Naopak u všech vzorků, do kterých byla přidána DNA s mutací (vzorky 49 – 96), docházelo k amplifikaci před 35. cyklem ($C_t < 35$) a vždy se jednalo o specifický produkt ($T_m \cong 80$). Lze tedy soudit, že v našem PCR systému může po 35. cyklu docházet k falešně pozitivním výsledkům. Limit hodnotitelnosti byl tedy stanoven na $C_t = 35$.

5.3 Příprava smíšeného standardu

5.3.1 Výběr nejvhodnější koncentrace

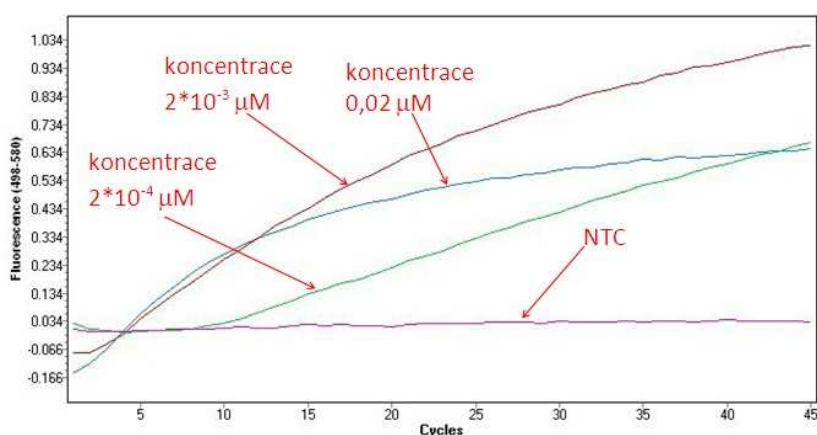
První výběr vhodné koncentrace:

Zmíněných sedm různých typů polynukleotidů (z nichž každý obsahoval jednu ze sedmi nejčastějších mutací *KRAS*) každý ve třech různých koncentracích bylo testováno s použitím primerů specifických k dané mutaci.

Tab. 12: Výsledky (hodnoty C_t) pro různé koncentrace syntetických polynukleotidů

Koncentrace [μM] Polynukleotid	C_t		
	0,02	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$
514	5,00	5,00	9,33
534	31,98	5,00	18,10
535	5,00	5,00	8,24
533	38,45	5,00	8,98
531	38,00	5,00	10,38
532	34,74	5,00	14,54
536	5,00	5,00	----

Ukázalo se, že hodnoty Ct nebyly přímo úměrné koncentraci polynukleotidu, jak by měly být (čím nižší koncentrace tím by mělo být vyšší Ct), (viz tab. 12). Ostatně křivky fluorescence obecně stoupaly velmi brzy (polynukleotidy byly příliš koncentrované, pravděpodobně došlo k přesycení signálu a nebylo tedy možno správně kvantifikovat) a neměly vůbec standardní (sigmoidní) tvar (viz obr. 7) pravděpodobně proto, že jako templát byly použity pouze syntetické polynukleotidy.



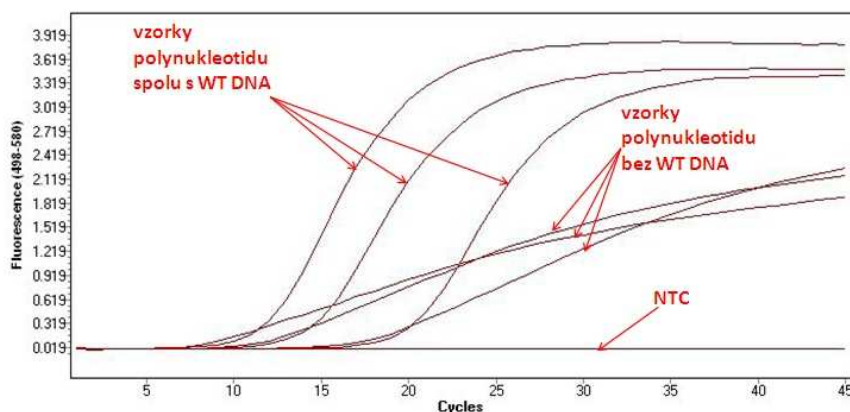
Obr. 7: Amplifikační křivky pro různé koncentrace polynukleotidu 514

Kombinace standardu s WT DNA:

Byl testován pouze syntetický polynukleotid 535 (viz přílohy, tab. A) jako templát v nižších koncentracích než při předešlém experimentu, jednak samostatně, jednak v kombinaci s genomickou WT DNA. Výsledky potvrdily výše zmíněný předpoklad z předchozího experimentu. Díky nižší koncentraci vstupního templátu (syntetického polynukleotidu) jsou hodnoty Ct už přímo úměrné koncentraci polynukleotidu (viz tab. 13) a přítomnost WT genomické DNA v reakci způsobila, že křivky fluorescence mají správný sigmoidní tvar (viz obr. 8).

Tab. 13: Výsledky (hodnoty Ct) pro různé koncentrace polynukleotidu 535

Koncentrace polynukleotidu 535 [μM]	Ct	
	bez WT DNA	s WT DNA
$1 \cdot 10^{-5}$	8,08	11,78
$5 \cdot 10^{-6}$	11,54	14,50
$2,5 \cdot 10^{-6}$	17,59	20,09



Obr. 8: Amplifikační křivky pro různé koncentrace polynukleotidu 535

Další výběr vhodné koncentrace všech standardů v kombinaci s WT DNA:

Opět bylo testováno všech sedm syntetických polynukleotidů (514, 531, 532, 533, 534, 535 a 536, viz přílohy, tab. A) každý ve třech různých koncentracích. Hodnoty Ct byly opět přímo úměrné vstupní koncentraci polynukleotidu (templátu).

Tab. 14: Výsledky (hodnoty Ct) pro různé koncentrace syntetických polynukleotidů v kombinaci s WT DNA

Koncentrace Polynukleotid [μM]	Ct		
	$5 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$1,25 \cdot 10^{-7}$
514	14,51	15,65	18,19
534	18,20	20,10	21,66
535	14,24	15,80	17,37
533	14,30	16,31	17,09
531	15,90	17,96	18,65
532	14,33	16,84	17,67
536	15,96	17,11	18,17

Hodnoty Ct u šesti polynukleotidů (514, 531, 532, 533, 535 a 536) při stejné koncentraci se dokonce pohybovaly v rozmezí maximálně 2 cyklů, což znamená, že těchto šest polynukleotidů má přibližně stejnou účinnost amplifikace a bude je tedy možno použít do připravovaného smíšeného standardu ve stejné koncentraci. Jediný polynukleotid 534 měl Ct v průměru o čtyři cykly vyšší než ostatní (viz tab. 14), bude se tedy do smíšeného standardu používat ve vyšší koncentraci než ostatní. Hodnoty Ct u vstupní koncentrace polynukleotidů $1,25 \cdot 10^{-7} \mu\text{M}$ se pohybují okolo 17. – 18. cyklu, což je pořád dříve, než je potřeba. Do smíšeného standardu bude tedy nutno používat ještě menší koncentraci polynukleotidů (tak, aby hodnoty Ct \cong 20).

5.3.2 Test smíšeného standardu

Smíšený standard (všech sedm syntetických polynukleotidů 514, 531, 532, 533, 534, 535 a 536 obsahujících jednotlivé *KRAS* mutace, obohacené o WT DNA, v takovém vzájemném poměru, který se na základě předchozích experimentů ukázal jako nejvhodnější – viz tab. 8) byl testován s použitím různých primerů specifických k jednotlivým *KRAS* mutacím. Stejný experiment byl proveden dvakrát. Hodnoty Ct při použití různých primerů se pohybovaly v rozmezí maximálně tří cyklů a vždy okolo dvacátého cyklu (viz tab. 15).

Tab. 15: Výsledky (hodnoty Ct) pro smíšený standard

Použité PM specifické k mutaci	Ct	
	experiment 1	experiment 2
PM 301 (12Arg)	20,54	20,28
PM 358 (12Ser)	20,94	21,15
PM 357 (12Cys)	19,69	19,73
PM 359 (12Val)	19,35	19,21
PM 356 (12Asp)	21,21	21,42
PM 355 (12Ala)	19,84	19,94
PM 360 (13Asp)	22,04	21,73

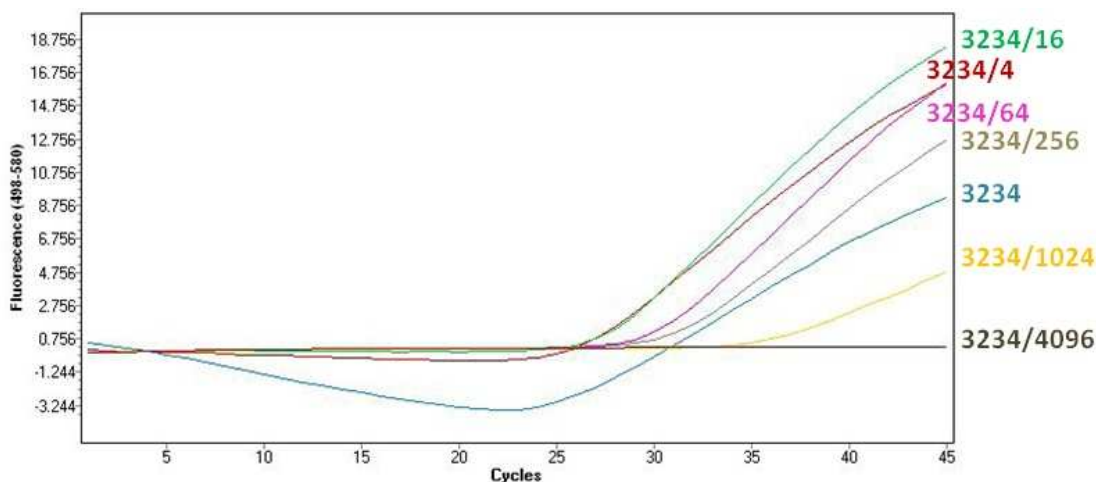
5.4 Určení optimálního množství templátové DNA

Bylo testováno, jaké vstupní množství templátové DNA je nejvhodnější přidávat do reakce. Na základě výsledků (viz tab. 16) lze soudit, že tento PCR systém je schopen amplifikovat i velmi malé vstupní množství templátové DNA (méně než 0,5 ng). Je ale vidět, že při množství menším než 2 ng už hodnoty Ct neodpovídají postupnému stupni ředění a při množství 0,113 ng je hodnota Ct vyšší než 35, což je už za limitem hodnotitelnosti. Minimální vstupní množství templátové DNA by tedy mělo být 2 – 5 ng.

Tab. 16: Výsledky (hodnoty Ct) pro různá ředění DNA 3234

Ředění	Množství DNA v reakci [ng]	Ct
3234	115,84	24,18
3234/4	28,96	25,95
3234/16	7,24	27,34
3234/64	1,81	30,07
3234 /256	0,453	30,99
3234/1024	0,113	35,84
3234/4096	$2,83 \cdot 10^{-2}$	—

Při příliš vysokém množství DNA může naopak dojít k přesycení signálu. Při vstupním množství DNA vyšším než 100 ng amplifikační křivka neměla standardní (sigmoidní) tvar, byla poněkud zkosená (viz obr. 9), což znamená, že už zřejmě došlo k přesycení signálu. Lze tedy soudit, že maximální vstupní množství templátové DNA by mělo být méně než 100 ng.



Obr. 9: Amplifikační křivky jednotlivých ředění DNA 3234

5.5 Určení meze detekce

5.5.1 Výběr a ředění buněčných linií

Byly vybírány vhodné vzorky DNA různých buněčných linií obsahujících jednotlivé *KRAS* mutace a jedna buněčná linie neobsahující žádnou *KRAS* mutaci (která bude použita pro ředění DNA ostatních buněčných linií).

Tab. 17: Koncentrace DNA a přítomné *KRAS* mutace vzorků vybraných buněčných linií

Vzorek DNA	Buněčná linie	Koncentrace [ng/μl]	Přítomná <i>KRAS</i> mutace dle databáze COSMIC	Přítomná <i>KRAS</i> mutace dle Mitsudomi <i>et al.</i> (1991)	Přítomná <i>KRAS</i> mutace podle TheraScreen
1241	AsPC-1	286,91	12Asp	nezjištěno	12Asp
2961	NCI-H620	328,40	nezjištěno	nezjištěno	12Val
2962	NCI-H157	294,46	12Arg	12Arg	12Cys
3012	A549	207,47	12Ser	nezjištěno	12Ser
3021	NCI-H647	225,30	13Asp	13Asp	13Asp
3159	HPAC	486,67	12Asp	nezjištěno	12Ser
3234	NCI-H1975	231,68	neg	nezjištěno	neg
3250	NCI-H2009	103,45	12Ala	12Ala	12Ala
3339	NCI-H358	71,92	12Cys	12Cys	nezjištěno

Na základě výsledků (viz tab. 17) lze soudit, že všechny vzorky měly dostatečnou koncentraci DNA, ale výsledky analýzy *KRAS* mutace komerčním kitem TheraScreen DxS se ne vždy shodovaly s informacemi v internetové databázi COSMIC a publikaci Mitsudomi *et al.* (1991). Konkrétně vzorek DNA buněčné linie HPAC měl podle databáze COSMIC obsahovat mutaci 12Asp, ale podle kitu TheraScreen byl pozitivní na mutaci 12Ser. Naopak vzorek DNA buněčné linie NCI-H157 měl podle databáze COSMIC i publikace Mitsudomi *et al.* (1991) obsahovat mutaci 12Arg, ale podle kitu TheraScreen byl pozitivní na mutaci 12Cys. Buněčná linie HPAC nebude tedy použita do dalších experimentů, protože zřejmě neobsahuje očekávanou *KRAS* mutaci 12Asp, ale mutaci 12Ser, přičemž pro mutace 12Asp i 12Ser jsou dostupné jiné vhodnější buněčné linie. Co se týče buněčné linie NCI-H157, bude ještě dále testována, protože jiná buněčná linie obsahující mutaci 12Arg stejně není dostupná a je možné, že na rozdíl od kitu TheraScreen DxS, se při našem PCR systému bude amplifikovat správně jako 12Arg. Konečný výběr buněčných linií, které budou dále používány pro zjištění limitu detekce (jaké množství mutované DNA na pozadí WT DNA je tento PCR systém schopen zachytit) je tedy následující: pro mutaci 12Ala linie NCI-H2009, pro 12Asp linie AsPC-1, pro 12Arg linie NCI-H157 (je ale potřeba otestovat, jak se bude amplifikovat v tomto PCR systému), pro 12Cys linie NCI-H358, pro 12Ser linie A549, pro 12Val linie NCI-H620 a pro 13Asp linie NCI-H647. Jako WT DNA, kterou budou ostatní buněčné linie ředěny, byla vybrána DNA buněčné linie NCI-H1975. Z těchto sedmi vybraných vzorků DNA buněčných linií (obsahujících různé *KRAS* mutace) bylo tedy připraveno sedm dilučních řad, které obsahovaly 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 % a 0,125 % mutované DNA na pozadí WT DNA linie NCI-H1975 (vzorek 3234). Tyto diluční řady budou následně použity pro zjištění limitu detekce.

5.5.2 Určení meze detekce pomocí buněčné linie NCI-H2009

Pomocí diluční řady DNA buněčné linie NCI-H2009 (vzorek 3250) obsahující *KRAS* mutaci 12Ala v koncentraci 100%, 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 % a 0,125 % mutované DNA na pozadí WT DNA 3234 (viz přílohy, tab. C) bylo testováno, jaké množství mutované DNA na pozadí WT je tento PCR systém schopen zachytit.

Tab. 18: Výsledky (hodnoty Ct a Δ Ct) kontrolní reakce a reakce pro mutaci 12Ala u diluční řady DNA buněčné linie NCI-H2009

Podíl mutace na pozadí WT	Ct kontrolní reakce (PM 307)	Ct reakce 12Ala (PM 355)	Δ Ct
100 %	25,22	26,36	1,13
4 %	24,22	30,91	6,69
2 %	24,48	31,97	7,49
1 %	24,18	32,78	8,6
0,5 %	24,11	34,40	10,29
0,25 %	24,05	36,74	12,69
0,125 %	23,97	35,05	11,08

Výsledky (viz tab. 18) odpovídají očekávání. V kontrolní reakci dochází k amplifikaci vždy okolo 24. cyklu ($Ct_{\text{kontrolní reakce}} \cong 24$), celkové množství DNA se totiž nemění. Naopak hodnoty $Ct_{\text{reakce pro mutaci}}$ se při jednotlivých ředěních postupně zvyšují, jak klesá množství mutované DNA (zvyšuje se tedy postupně i hodnota Δ Ct). Podle výsledků lze tedy soudit, že tento PCR systém má velmi nízký limit detekce, dokáže zachytit i pouhé 0,5 % mutované DNA na pozadí WT DNA (vzorky s nižším podílem mutované DNA se amplifikovaly až po 35. cyklu, což je už za limitem hodnotitelnosti a navíc už hodnoty Ct nejsou přímo úměrné stupni ředění). V praxi ale není jasné jaký (a zda vůbec nějaký) klinický význam má tak malé procento mutace. Pro účely dalších experimentů tedy postačí, když bude limit detekce nastaven na 1 % mutované DNA na pozadí WT. Hodnota Δ Ct (rozdíl $Ct_{\text{kontrolní reakce}}$ a $Ct_{\text{reakce pro mutaci}}$) při 1 % DNA s *KRAS* mutací 12Ala je 8,6; což bude tedy limitní Δ Ct, podle kterého se bude hodnotit patientský vzorek na mutaci 12Ala. Pokud bude Δ Ct_{reakce 12Ala} \leq 8,6; patientský vzorek bude pozitivní na *KRAS* mutaci 12Ala. Pokud bude Δ Ct_{reakce 12Ala} $>$ 8,6; patientský vzorek bude negativní na *KRAS* mutaci 12Ala, nebo podíl mutace je nižší než 1 %, což se také bude hodnotit jako negativní. Samozřejmě bude opět nutné brát v úvahu zároveň limit hodnotitelnosti stanovený na Ct = 35, hodnoty Ct \geq 35 tedy nebudou brány v úvahu. V následujících experimentech bude ještě potřeba zjistit limitní hodnoty Δ Ct pro ostatních šest *KRAS* mutací (pro tyto účely však bude stačit testovat u ostatních buněčných linií pouze ředění 100 % a 1 %).

5.5.3 Určení limitní Δ Ct pro ostatní *KRAS* mutace

Podobně jako v předchozím experimentu bylo testováno limitní Δ Ct (na hranici 1 % mutace na pozadí WT) u zbylých šesti *KRAS* mutací.

Tab. 19: Výsledky (hodnoty Ct a Δ Ct) kontrolní reakce a reakce pro mutaci u vzorků DNA buněčných linií

Testovaná <i>KRAS</i> mutace	Použitá buněčná linie	Podíl mutace	Ct kontrolní reakce (PM 307)	Ct reakce pro mutaci	Δ Ct (při 1 % mutace)	Poznámky
12Asp	AsPC-1	100 %	25,66	28,95	6,47	Δ Ct jako rozdíl mezi Ct reakce pro mutaci při 100 % a 1 % mutace
		1 %	24,00	35,42		
12Arg	NCI-H157	100 %	26,02	—	—	Nešlo hodnotit, buněčná linie skutečně obsahovala jinou mutaci, než bylo publikováno.
		1 %	23,93	—		
12Cys	NCI-H358	100 %	38,03	33,84	—	Nešlo hodnotit, buněčná linie se neamplifikovala podle očekávání.
		1 %	24,03	—		
12Ser	A549	100 %	24,89	33,96	6,04	Δ Ct jako rozdíl mezi Ct reakce pro mutaci při 100 % a 1 % mutace
		1 %	24,20	40		
12Val	NCI-H620	100 %	25,81	25,17	8,08	
		1 %	23,70	31,78		
13Asp	NCI-H647	100 %	25,80	30,75	9,25	Δ Ct jako rozdíl mezi Ct reakce pro mutaci při 100 % a 1 % mutace
		1 %	23,89	40		

Na základě výsledků (viz tab. 19) bylo možné správně vyhodnotit limitní Δ Ct (rozdíl Ct kontrolní reakce a Ct reakce pro mutaci) při 1 % *KRAS* mutace pouze u buněčné linie NCI-H620, tedy pro mutaci 12 Val, limitní Δ Ct je 8,08. U buněčných linií AsPC-1, A549 a NCI-H647 bylo už při 100 % mutace Ct reakce pro mutaci o několik cyklů vyšší než Ct kontrolní reakce (správně by měly stoupat přibližně ve stejném cyklu, Ct kontrolní reakce \cong Ct reakce pro mutaci). U těchto tří buněčných linií bylo určeno limitní Δ Ct jako rozdíl Ct reakce pro mutaci při 100 % mutace a Ct reakce pro mutaci při 1 % mutace. Buněčná linie NCI-H157 nakonec opravdu neobsahovala očekávanou mutaci 12Arg a buněčná linie NCI-H358 s mutací 12Cys se neamplifikovala dostatečně ani v kontrolní reakci, proto u těchto dvou buněčných linií limitní Δ Ct nebylo možno vyhodnotit.

5.6 Analýza reálných vzorků

Naším kompletním PCR systémem bylo analyzováno dvacet patientských vzorků (již dříve diagnostikované kitem TheraScreen DxS). Výsledky byly hodnoceny na základě limitního Δ Ct pro jednotlivé mutace, které byly zjištěny v předchozích dvou experimentech

(viz tab. 21), na základě toho, zda hodnoty Ct nepřekročili práh hodnotitelnosti ($Ct = 35$) a na základě specifických hodnot T_m (T_m kontrolní reakce $\cong 83,5$ a T_m reakce pro mutaci $\cong 80$).

5.6.1 Nespecifické nasedání primerů (zkřížené reakce)

Bylo také zjištěno, že mezi reakcemi detekce mutací může docházet k určité zkřížené reakci (nespecifickému nasedání primerů). Zkřížené reakce primerů v přítomnosti mutace 12Ala byly hodnoceny na základě výsledků analýzy limitu detekce u diluční řady DNA buněčné linie NCI-H2009 (viz přílohy, tab. F) a patientského vzorku 2814 (viz přílohy, tab. H, J a K). Zkřížené reakce primerů v přítomnosti mutace 12Asp byly hodnoceny na základě výsledků analýzy pěti patientských vzorků obsahujících tuto mutaci (vzorky 3209, 3194, 3047, 2950 a 2951; přílohy, tab. H, J a K). Zkřížené reakce primerů v přítomnosti mutace 12Arg nemohly být zjištěny, protože nebyl k dispozici vhodný patientský vzorek nebo buněčná linie s touto mutací. Zkřížené reakce primerů v přítomnosti mutace 12Cys byly hodnoceny na základě výsledků analýzy pouze jednoho patientského vzorku 2782 (viz přílohy, tab. H, J a K). Stejně tak zkřížené reakce primerů v přítomnosti mutace 12Ser byly hodnoceny pouze na základě výsledků analýzy jednoho patientského vzorku 2997 (viz přílohy, tab. H, J a K), více výsledků analýz vzorků s těmito mutacemi nebylo k dispozici. Zkřížené reakce primerů v přítomnosti mutace 12Val byly hodnoceny na základě výsledků analýzy čtyř patientských vzorků obsahujících tuto mutaci (vzorky 2952, 3064, 2977 a 2829; viz přílohy, tab. H, J a K). Zkřížené reakce primerů v přítomnosti mutace 13Asp byly hodnoceny na základě výsledků analýzy dvou patientských vzorků obsahujících tuto mutaci (vzorky 2944 a 2912; viz přílohy, tab. H, J a K). Na základě těchto analýz byl vytvořen vzorec nespecifického nasedání primerů (zkřížené reakce) - viz tab. 20.

Tab. 20: Vzor zkřížené reakce pro nový PCR systém

		Signál (Ct)						
		12Ala	12Asp	12Arg	12Cys	12Ser	12Val	13Asp
Přítomná mutace	12Ala	ano	—	—	—	—	+ 1	+ 7
	12Asp	+ 4	ano	—	—	—	+ 8	—
	12Arg	nezjištěno						
	12Cys	—	—	+ 9	ano	—	+ 4	+ 9
	12Ser	—	—	+ 6	—	ano	+7	+7
	12Val	+ 5	—	—	—	—	ano	—
	13Asp	—	—	—	—	—	—	ano

„Ano“ znamená skutečně pravý signál. Čísla udávají přibližný počet cyklů po tomto signálu, kde může být detekován signál zkřížené reakce. Hodnty více než 9 cyklů nejsou uvedeny, protože tyto signály se již nacházejí v negativní zóně.

5.6.2 Konečná pravidla pro hodnocení patientských vzorků

Na základě předchozích experimentů byla určena pravidla pro hodnocení patientských vzorků.

- NTC: Nemělo by dojít k žádné amplifikaci (žádné hodnoty Ct ani Tm píky).
- smíšený standard: Mělo by dojít k amplifikaci ve všech osmi reakcích (se všemi osmi typy PM), přičemž u reakcí specifických na mutaci by mělo být $Ct \cong 20$ a rozptyl Ct maximálně 3 cykly, $Tm_{\text{kontrolní reakce}} \cong 83,5$ a $Tm_{\text{reakce pro mutaci}} \cong 80$. V tomto případě jsou všechny PM pro mutace funkční a amplifikují správný produkt. Lze tedy hodnotit patientské vzorky.
- patientské vzorky: Detekční limit je nastaven na 1 % mutované DNA ve vzorku. U pacienta je prokázána mutace, pokud zároveň:
 1. ΔCt (rozdíl $Ct_{\text{kontrolní reakce}}$ a $Ct_{\text{reakce pro mutaci}}$) \leq hodnotám v tabulce 21. Pokud je ΔCt rovna limitní hodnotě (ve vzorku je tedy přítomno 1 % mutované DNA), analýza vzorku by se měla opakovat.
 2. $Ct_{\text{kontrolní reakce}}$ a $Ct_{\text{reakce pro mutaci}} \leq 35$ (po 35. cyklu se mohou objevovat falešně pozitivní výsledky, viz kap. 5.2)
 3. $Tm_{\text{kontrolní reakce}} \cong 83,5$ (amplikon kontroly – oblast genu epsin, 130 bp) a $Tm_{\text{reakce pro mutaci}} \cong 80$ (amplikon reakce pro mutaci – oblast 1. exonu genu KRAS, 93 bp)
 4. Je nutné brát v úvahu také nespecifické nasedání primerů (zkřížené reakce). Tento PCR systém slouží k detekci pouze jedné mutace ve vzorku, pokud některá další mutace dává pozitivní výsledek, jedná se patrně o zkříženou reakci (dále viz diskuze). Pokud charakter výsledku neodpovídá vzoru zkřížené reakce (viz tab. 20), je třeba provést další testování.

Tab. 21: Limitní hodnoty ΔCt pro 1 % mutované DNA na pozadí WT pro nový PCR systém

Mutace	ΔCt (pro 1 % mutace)
12Ala	8,6
12Asp	6,47
12Arg	nezjištěno
12Cys	nezjištěno
12Ser	6,04
12Val	8,08
13Asp	9,25

5.6.3 Hodnocení patientských vzorků a srovnání výsledků nového PCR systému s výsledky komerčního kitu TheraScreen DxS

Výsledky analýzy dvaceti patientských vzorků (viz přílohy, tab. H, J a K) byly vyhodnoceny na základě kritérií popsaných v předchozí kapitole (kap. 5.6.2) a závěry byly srovnány se závěry analýzy komerčním kitem TheraScreen DxS. Bylo zjištěno, že v osmnácti případech ze dvaceti byl konečný závěr analýzy pomocí našeho nového PCR systému stejný jako závěr analýzy pomocí kitu TheraScreen a ve dvou případech se závěry lišily (viz tab. 22), což však má s výjimkou vzorku 3050 minimální praktický význam (viz diskuze).

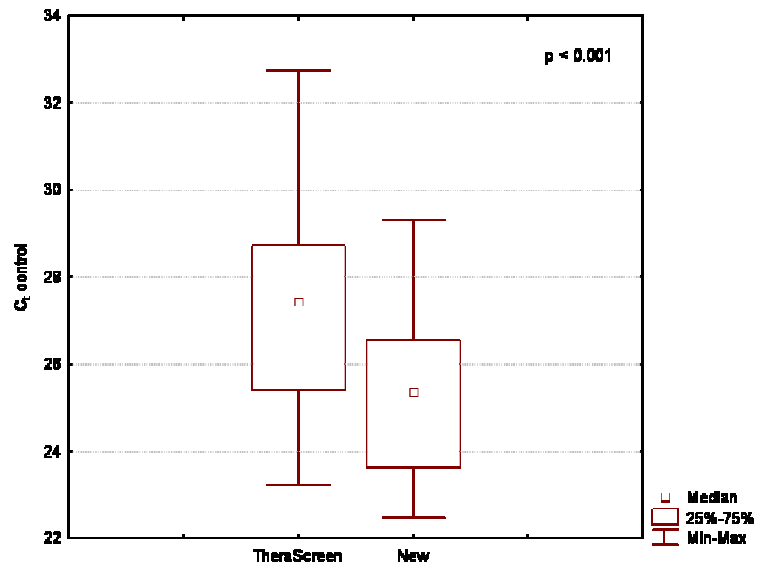
Tab. 22: Výsledky (závěr) nového PCR systému a kitu TheraScreen

Vzorek	Výsledek TheraScreen	Výsledek nového PCR systému
2814	12Ala	12Ala
3209	12Asp	12Asp
3194	12Asp	12Asp
3047	12Asp	12Asp
2950	12Asp	12Asp
2951	12Asp	12Asp
2782	12Cys	12Cys
2997	12Ser	12Ser
2952	12Val	12Val
2944	13Asp	13Asp
2912	13Asp	13Asp
3050	neg	12Val
2953	neg	neg
3323	neg	neg
2976	neg	neg
3071	neg	neg
3088	neg	neg
3064	12Asp, 12Val	12Val
2977	12Val	12Val
2829	12Val	12Val

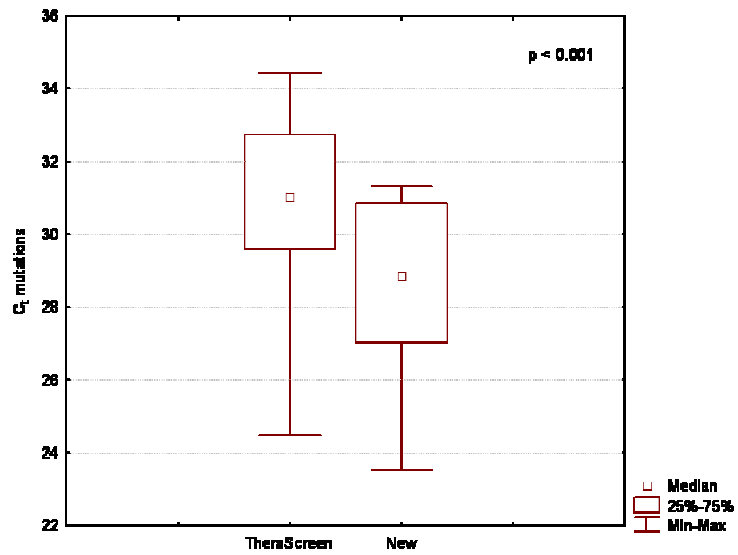
Statistické vyhodnocení:

Byly porovnávány hodnoty získané novým PCR systémem (viz přílohy, tab. H a J) a kitem TheraScreen (viz přílohy, tab. G a I), a to hodnoty: $Ct_{\text{kontrolní reakce}}$, $Ct_{\text{reakce pozitivní mutace}}$ (pokud byly u obou metod závěry stejné) a $\Delta Ct_{\text{reakce pozitivní mutace}}$ (pokud byly u obou metod závěry stejné). Bylo zjištěno, že nový PCR systém dává systematicky nižší hodnoty Ct než kit TheraScreen, v průměru o 2 cykly (viz obr. 10 a 11). Také bylo zjištěno, že mezi hodnotami $\Delta Ct_{\text{reakce pozitivní mutace}}$ nového PCR systému a kitu TheraScreen není statisticky významný rozdíl (viz obr. 12).

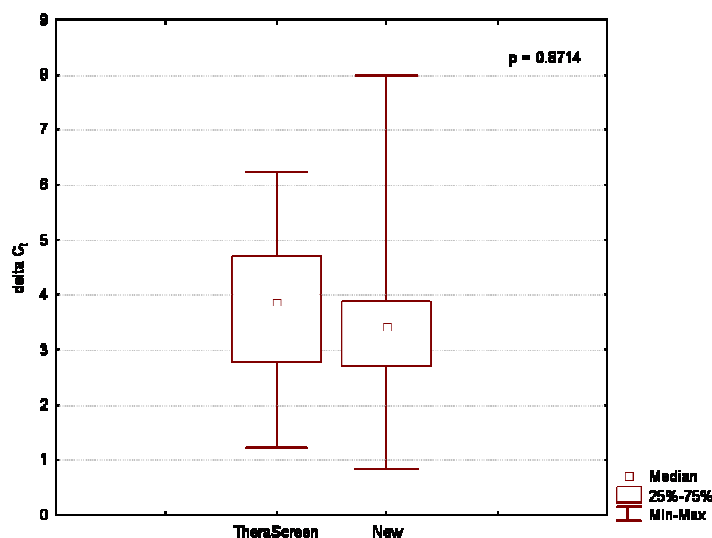
zpracováno s pomocí Mgr. Jany Fürstové



Obr. 10: Srovnání odchylek hodnot C_t kontrolní reakce u kitu TheraScreen a nového PCR systému



Obr. 11: Srovnání odchylek hodnot C_t reakce pozitivní mutace u kitu TheraScreen a nového PCR systému



Obr. 12: Srovnání odchylek hodnot ΔC_t reakce pozitivní mutace u kitu TheraScreen a nového PCR systému

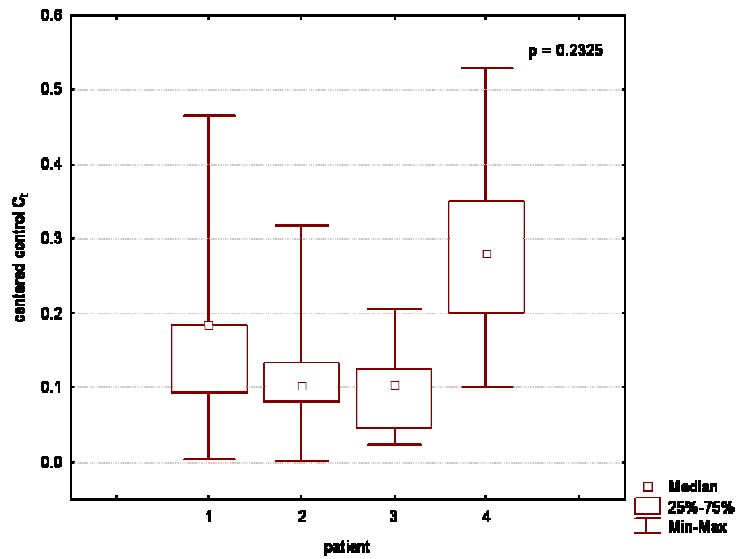
5.6.4 Hodnocení opakovatelnosti metody

Vzorky 3209, 3194, 3047 a 2950 (všechny obsahující mutaci 12Asp) byly analyzovány v pěti opakováních (viz přílohy, tab. L, M a N), aby bylo zjištěno, zda nový PCR systém dokáže při analýze stejného vzorku dávat opakovaně stejné výsledky. Ve všech pěti opakováních u všech čtyřech vzorků byla diagnostikována stejná mutace 12Asp podle očekávání. V případě vzorku 3194 sice byla ve třech z pěti opakování diagnostikována podle nastavených kritérií také mutace 13Asp, ale případná druhá mutace nebude u tohoto vzorku brána v úvahu (viz diskuze).

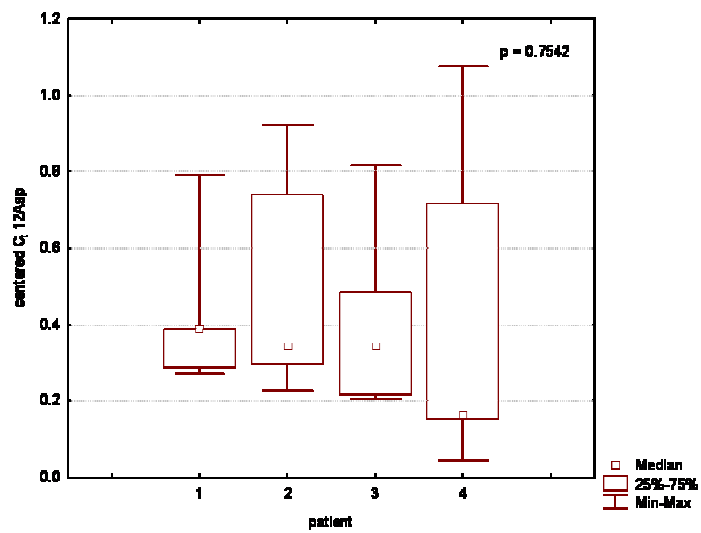
Statistické vyhodnocení:

Byly porovnávány odchylky od průměru hodnot (z jednotlivých opakování) pro jednotlivé vzorky (viz přílohy, tab. L, M a N), a to odchylky hodnot: C_t kontrolní reakce, C_t reakce 12Asp, ΔC_t reakce 12Asp, T_m kontrolní reakce a T_m reakce 12Asp. U odchylek žádné z těchto hodnot nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (viz obr. 13 – 17).

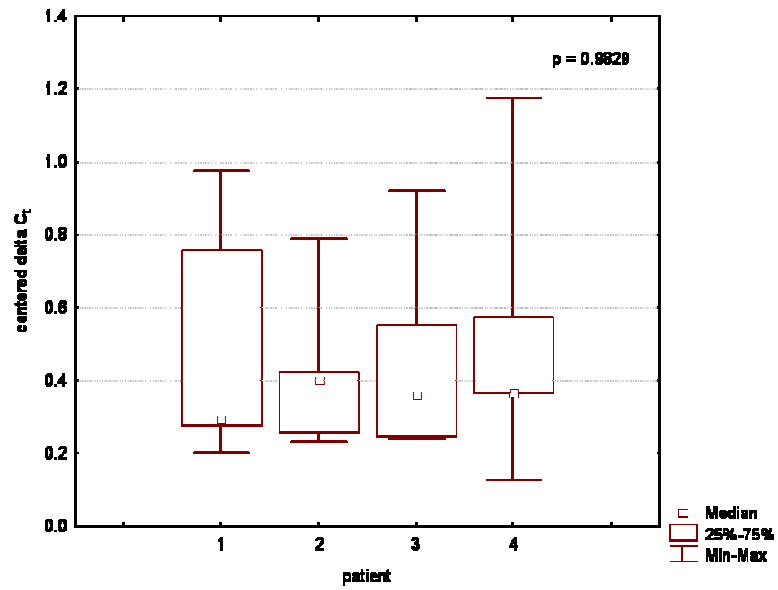
zpracováno s pomocí Mgr. Jany Fürstové



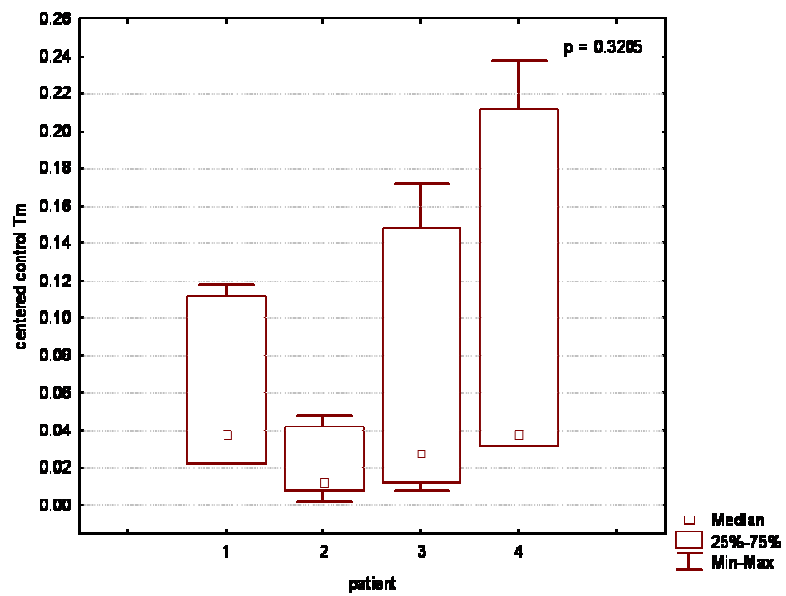
Obr. 13: Srovnání odchylek hodnot Ct_{kontrolní reakce} (z pěti opakování) pro jednotlivé vzorky



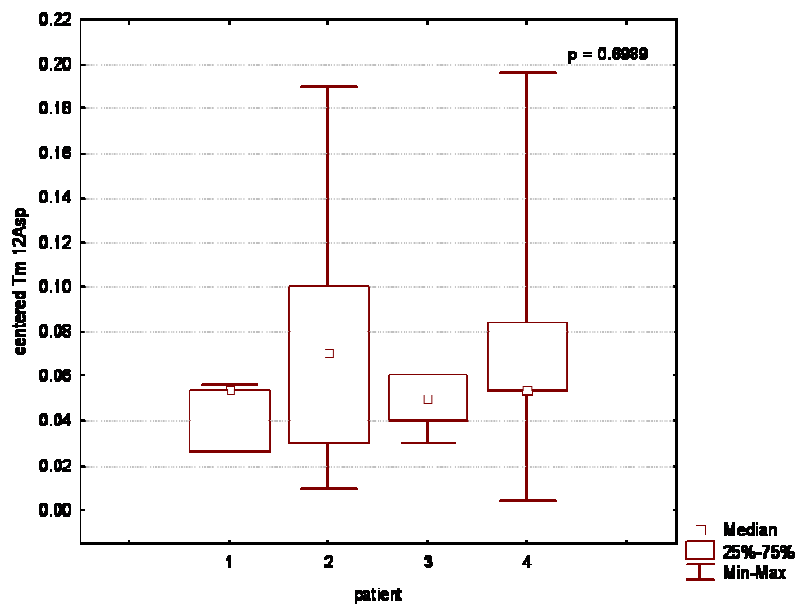
Obr. 14: Srovnání odchylek hodnot Ct_{reakce 12Asp} (z pěti opakování) pro jednotlivé vzorky



Obr. 15: Srovnání odchylek hodnot $\Delta Ct_{\text{reakce 12Asp}}$ (z pěti opakování) pro jednotlivé vzorky



Obr. 16: Srovnání odchylek hodnot $Tm_{\text{kontrolní reakce}}$ (z pěti opakování) pro jednotlivé vzorky



Obr. 17 Srovnání odchylek hodnot T_m reakce 12Asp (z pěti opakování) pro jednotlivé vzorky

6 Diskuze

Předkládaná diplomová práce se zabývá především optimalizací podmínek PCR systému pro detekci sedmi nejčastějších bodových mutací genu *KRAS* (ve 12. a 13. kodonu 1. exonu - 12Ala, 12Asp, 12Arg, 12Cys, 12Ser, 12Val a 13Asp) v populaci nádorových buněk a jeho srovnáním s komerčním kitem TheraScreen DxS. Vyvinutý PCR systém je založen na výše popsané technologii ARMS (viz kap. 2.2).

Byly testovány dvě dostupné sady primerů specifických ke zmíněným mutacím (obyčejné primery a vylepšené primery s LNA) v různých koncentracích. Ukázalo se, že amplifikace pomocí primerů s LNA je slabší a amplifikační křivky nemají příliš standardní (sigmoidní) tvar, jsou přímější a mohly by být zaměnitelné za křivky šumu (viz obr. 6 a kap. 5.1.1). Podle výsledků (viz kap. 5.1.2 a přílohy, tab. D) lze také soudit, že primery (jak obyčejné tak vylepšené LNA) jsou specifické (nasedají přednostně na templát s mutací), přičemž primery s LNA jsou specifičtější než obyčejné primery (slabé náznakové amplifikace WT templátu jsou častější u obyčejných primerů). Dále se ukázalo, že obecně vyšší množství primeru snižuje specifitu – při koncentraci primeru 0,5 μM dochází častěji k slabé náznakové amplifikaci WT templátu než při koncentraci primeru 0,2 μM (pravděpodobně z přebytku primeru). Kromě forward a reverse primeru byl do reakce přidáván také LNA blokovací oligonukleotid, který zabraňuje nežádoucí amplifikaci WT DNA ve vzorku (viz kap. 5.1.3). Rovněž je vidět (viz přílohy, tab. D), že přebytek blokovacího oligonukleotidu dokáže účinně zabránit i oné slabé amplifikaci WT templátu: čím vyšší množství blokovacího oligonukleotidu, tím vzácnější amplifikace WT templátu. Při zvážení výše zmíněných skutečností bylo nakonec rozhodnuto, že do připravovaného PCR systému bude nejvhodnější používat obyčejné primery v koncentraci 0,2 μM v kombinaci s blokovacím oligonukleotidem ve stejné koncentraci. Nejlépe sice dokáže zabránit amplifikaci WT templátu nadbytek blokovacího oligonukleotidu, tedy koncentrace 1 μM , ale při koncentraci 0,2 μM dosáhneme téměř stejných výsledků s použitím menšího množství chemikálií, což je ekonomičtější. Z jednotlivých primerů a oligonukleotidu bylo připraveno sedm primerových směr (PM 301, 355, 356, 357, 358, 359 a 360 – viz tab. 7 a přílohy, tab. B), přičemž každá obsahovala ve stejné koncentraci forward ARMS primer specifický k určité *KRAS* mutaci (primery 338, 341, 342, 343, 344, 345 nebo 346), reverse „common“ primer 340 a LNA blokovací oligonukleotid 449 (viz přílohy, tab. A). Tyto PM byly přidávány v objemu 0,0602 μl na 10 μl reakce, díky tomu je v reakci potřebná koncentrace (0,2 μM) všech tří komponent (F primeru, R primeru

a blokovacího oligonukleotidu). Pro kontrolní reakci (díky které se odhaduje množství DNA ve vzorku a od které se odpočítávají hodnoty ΔCt) bylo z třinácti dostupných PM nespecifických ke *KRAS* mutacím vybráno jako nejvhodnější PM 307. Toto PM při zvolených podmínkách a v objemu 0,04 μ l na 10 μ l reakce (tedy koncentrace F a R primeru v reakci opět 0,2 μ M) účinně amplifikuje genomickou DNA, nevykazuje přítomnost nespecifických produktů ani netvoří primerové dimery (viz kap. 5.1.4). PM 307 obsahuje primerový pár, který amplifikuje oblast genu *epn2* (pro protein Epsin-2) o délce 130 bp (viz přílohy, tab. A a B).

Také byl připraven smíšený standard (směs polynukleotidů s očekávanými *KRAS* mutacemi) který by podobně jako v případě kitu TheraScreen DxS fungoval jako pozitivní kontrola (jestli všech sedm PM specifických pro mutace v daném běhu funguje správně). Složení smíšeného standardu připraveného tak, aby se s pomocí všech specifických PM amplifikoval přibližně se stejnou účinností ($Ct \cong 20$, při těchto koncentracích už nehrozí přesycení signálu) je popsáno v tabulce 8. Během experimentů bylo zjištěno, že je nezbytné do smíšeného standardu přidávat také WT genomickou DNA, samostatné syntetické polynukleotidy nefungují správně. Na správný průběh reakce (a na správný tvar výsledných křivek fluorescence) může mít vliv i pouhá přítomnost genomické DNA (viz obr. 8). Také však bylo zjištěno, že přítomnost WT genomické DNA zvyšuje hodnoty Ct oproti samostatným syntetickým oligonukleotidům (viz tab. 13). Nebylo však zjišťováno přesně, jaký vliv na tento posun Ct mají různé množství genomické WT DNA. Během dílčích experimentů se také ukázalo, že TRIS lépe udržuje stabilitu DNA než sterilní voda (data neukázána), což může být způsobeno kysleou hydrolyzou DNA ve vodě (sterilní voda má pH 5 až 6). Pokud byly polynukleotidy naředěny a skladovány ve vodě, byly při použití stejného ředění naměřeny postupně nižší hodnoty Ct , což znamená, že polynukleotidy byly pravděpodobně ve vodě postupně degradovány. Pro ředění a uchovávání naředěných polynukleotidů byl proto používán TRIS, přičemž k rozkladu DNA už nedocházelo.

Také bylo zjišťováno, jaké množství templátové DNA je vhodné přidávat do reakce. Na základě výsledků (viz kap. 5.4, tab. 16 a obr. 9) bylo stanoveno, že optimální množství templátové DNA přidávané do reakce je přibližně mezi 5 – 50 ng, což jsou podobné hodnoty, jaké platí pro komerční kit TheraScreen, u něho bylo optimální množství DNA stanoveno na 2 – 50 ng (TheraScreen® DxS: K-RAS Mutation Kit – Instruccions for use).

Bylo zjištěno, že vyvinutý PCR systém má velmi nízký limit detekce (ještě nižší než komerční kit TheraScreen), dokáže zachytit i pouhé 0,5 % mutované DNA na pozadí WT

DNA (viz kap. 5.5.2). Jak již ale bylo zmíněno, není jasné jaký (a zda vůbec nějaký) klinický význam tak malé procento mutace má (Monzon *et al.*, 2009), interpretační pravidla byla nastavena pro 1 % mutované DNA na pozadí WT (stejně jako u kitu TheraScreen). Aby mohla být stanovena pravidla pro hodnocení patientských vzorků, byly pomocí vybraných buněčných linií obsahujících jednotlivé *KRAS* mutace zjištěny hodnoty ΔC_t při 1 % mutované DNA na pozadí WT. Na základě výsledků (viz tab. 18 a 19) však bylo možné správně vyhodnotit limitní ΔC_t (rozdíl C_t kontrolní reakce a C_t reakce pro mutaci při 1 % mutace) pouze pro mutace 12Ala a 12Val. U mutací 12Asp, 12Ser a 13Asp byly určeny limitní ΔC_t jako rozdíl C_t reakce pro mutaci při 100 % mutace a C_t reakce pro mutaci při 1 % mutace, protože vybrané buněčné linie se neamplifikovaly podle očekávání. Pro mutace 12Arg a 12Cys nebylo možno limitní ΔC_t určit, protože buněčná linie NCI-H157, která měla podle publikace Mitsudomi *et al.* (1991) a databáze COSMIC obsahovat mutaci 12Arg, obsahovala podle kitu TheraScreen mutaci 12Cys a také pomocí našeho nového PCR systému se amplifikovala jako 12Cys. Je možné, že DNA buněčné linie během pěstování a pasážování mutuje, popřípadě je kontaminována jinou buněčnou linií, která ji přeroste (Markovic *and* Markovic, 1998; MacLeod *et al.*, 1999; Capes-Davis *et al.*, 2010). Buněčná linie NCI-H358 s mutací 12Cys se neamplifikovala dostatečně ani v kontrolní reakci. Je možné, že ve vzorku nebylo dostatečné množství kvalitní amplifikovatelné DNA (viz kap. 5.5.3). Zjištěné limitní ΔC_t jsou shrnuty v tabulce 21.

Také bylo zjištěno, že mezi reakcemi detekce mutací může docházet k určité zkřížené reakci (nespecifickému nasedání primerů). Například, pokud je patrná vysoká úroveň mutace 12Ala, některé z jiných typů mutace mohou vykazovat také pozitivní výsledek. Jak je totiž známo, ne všechny typy *mismatches* mezi templátem a ARMS primerem úplně zabrání amplifikaci. Pro vyšší specifičnost reakce se doporučuje navrhnout primery tak, aby měly určitý *mismatch* také na druhé, třetí nebo dokonce čtvrté pozici od 3' konce (Old, 2000). Naše ARMS primery ovšem obsahují *mismatch* pouze na 3' konci. Podobná situace je pozorována také v případě kitu TheraScreen (viz tab. 2). Náš nový PCR systém slouží tedy k detekci jedné mutace ve vzorku DNA. Pokud některá další mutace dává pozitivní výsledek, jedná se patrně o zkříženou reakci. Více různých mutací ve vzorku lze pozorovat jen velmi vzácně, a pokud se případná další mutace objeví, prakticky nemá klinický význam (TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit – Instructions for use). Nutno zdůraznit, že vzor zkřížené reakce pro tento nový PCR systém (viz tab. 20) byl vytvořen na základě malého počtu analyzovaných vzorků. Pro mutace 12Cys a 12Ser byl hodnocen pouze na základě jednoho vzorku, více analyzovaných vzorků s těmito mutacemi nebylo k dispozici, a pro mutaci 12Arg dokonce nemohl být

vyhodnocen, protože tato mutace je velmi vzácná a žádný vhodný patientský vzorek ani buněčná linie nebyly k dispozici (viz kap. 5.6.1).

Na základě výsledků experimentů s vzorky krevní plazmy bylo zjištěno, že v našem PCR systému může po 35. cyklu docházet k falešně pozitivním výsledkům. Byl tedy stanoven limit hodnotitelnosti ($C_t = 35$) a výsledky, kdy $C_t > 35$, už nebudou brány v úvahu, aby se předešlo případným falešně pozitivním výsledkům (viz kap. 5.2). Tento limit je o tři cykly nižší než u kitu TheraScreen, kde byl limit hodnotitelnosti stanoven na $C_t = 38$ (viz kap. 2.2.2), což je v souladu se zjištěním, že hodnoty C_t naměřené pomocí našeho PCR systému jsou v průměru o 2 cykly nižší než C_t naměřené pomocí kitu TheraScreen (viz kap. 5.6.3).

Díky předchozím experimentům mohla být stanovena pravidla pro hodnocení výsledků analýzy patientských vzorků (viz kap. 5.6.2). Na rozdíl od kitu TheraScreen, kde se pozitivita či negativita vzorku určuje na základě ΔC_t , limitu hodnotitelnosti a vzoru zkřížené reakce (kap. 2.2.2) u našeho PCR systému je nutno navíc sledovat také hodnoty T_m , díky kterým se zjistí, zda se skutečně amplifikoval specifický produkt, případně odhalí přítomnost primerových dimerů. Našemu PCR systému (vzhledem k použitému chemismu interkalačního barviva) na rozdíl od TheraScreenu naopak chybí možnost vnitřní kontrolní reakce značené jiným typem fluoroforu, není tedy možné odhalit v jednotlivých reakcích případnou inhibici PCR a může hrozit nebezpečí falešně negativních výsledků. Prozatím je nutno brát jako pozitivní kontrolu pouze externí, tedy smíšený standard (a spoléhat na to, že pokud fungují všechny reakce se smíšeným standardem, bude daný primer fungovat i s ostatními vzorky) a kontrolní reakci s PM 307 (a spoléhat na to, že pokud vzorek DNA fungují s kontrolním PM, bude kvalitní i v reakcích s ostatními PM). Tuto situaci by bylo možné vyřešit například použitím jiného (sofistikovanějšího) typu chemismu, například TaqMan sond nebo molekulárních majáků. Použití značených sond by navíc zabránilo nežádoucímu vzniku primerových dimerů a nebylo by nutné při analýze výsledků hodnotit také T_m (což by zkrátilo nutnou délku analýzy). Dále by bylo vhodné ještě zjistit, do jaké míry je tento PCR systém reprodukovatelný (analýza na jiném přístroji, jiným člověkem, s jinou šarží chemikálií) a robustní (odchylky v množství přidávaných PCR komponent, reakčních teplot atd.). Vzhledem ke zmíněným skutečnostem je jasné, že tento PCR systém prozatím není komercializovatelný.

Přesto bylo tímto PCR systémem dvacet patientských vzorků vyšetřeno a vyhodnoceno na základě zvolených kritérií (popsaných v kap. 5.6.2) a závěry byly srovnány se závěry analýzy komečním kitem TheraScreen. Jedním z cílů případného dalšího projektu bude

(stejně jako zjištění údajů o případném nespécifickém nasedání primerů v přítomnosti mutace 12Arg) zjištění limitní ΔCt na hranici 1 % mutace pro 12Arg a 12Cys, které prozatím nebylo možné zjistit (viz tab. 21). Pro účely analýzy dvaceti vybraných vzorků však zjištěná kritéria hodnocení stačila. Žádný vzorek s mutací 12Arg nebyl k dispozici (jak již bylo zmíněno, jedná se o vzácnou mutaci) a u vzorku s mutací 12Cys (vzorek 2782) byla naměřena hodnota $\Delta Ct = 2,7$ (viz přílohy, tab. J), což je poměrně nízká hodnota. Vzhledem k limitním ΔCt pro ostatní mutace (které byly v rozmezí od 6,04 do 9,25, viz tab. 21) je velmi pravděpodobné, že limitní ΔCt pro 12Cys bude mnohem vyšší než 2,7 (naměřené u vzorku 2782), a proto lze soudit, že vzorek 2782 danou mutaci opravdu obsahuje (což bylo také potvrzeno i kitem TheraScreen) i když prozatím neznáme limitní ΔCt . Ze všech dvaceti analyzovaných patientských vzorků se ve dvou případech konečný závěr analýzy pomocí našeho nového PCR systému lišil od závěru analýzy pomocí kitu TheraScreen (viz tab. 22). Závěry vyšetření pomocí různých kitů a metod se mohou v některých případech lišit (Clayton *et al.*, 2000; van Heek *et al.*, 2005; Whitehall *et al.*, 2009) a je vidět, že určité rozdíly existují i mezi těmito dvěma systémy, ovšem kromě vzorku 3050 mají minimální praktický význam. Vzorek 3050 kitem TheraScreen diagnostikovaný jako WT byl novým PCR systémem diagnostikován jako 12Val, naměřená hodnota ΔCt (7,82) se však blížila limitní hranici (8,08), lze tedy soudit, že ve vzorku je přítomno malé procento mutace (okolo 1 %). V případě vzorku 3064 TheraScreenem diagnostikovaného jako 12Val a 12Asp, nový PCR systém zachytil pouze mutaci 12Val. Avšak vzhledem ke skutečnosti, že případná přítomnost další mutace ve vzorku nemá klinický význam (rovněž kit TheraScreen je určen pro detekci jedné mutace ve vzorku), je především důležité, že náš PCR systém dokázal zjistit přítomnost mutace 12Val, která byla přítomna v mnohem větším procentu DNA ($\Delta Ct = 2,27$); (viz přílohy, tab J). Rovněž statistické vyhodnocení potvrdilo, že ačkoli nový PCR systém posunuje hodnoty Ct oproti kitu TheraScreen, posunuje stejně jak $Ct_{\text{kontrolní reakce}}$ tak $Ct_{\text{reakce pozitivní mutace}}$, výsledné hodnoty $\Delta Ct_{\text{reakce pozitivní mutace}}$ se tedy statisticky významně neliší (viz obr. 10 - 12). Lze tedy soudit, že nový PCR systém dává obdobné výsledky (zachytí stejný poměr mutované DNA ve vzorku) jako kit TheraScreen.

Rovněž analýza čtyř vzorků v pěti opakováních potvrdila, že nový PCR systém dokáže při analýze stejného vzorku dávat opakovaně stejné výsledky. V případě vzorku 3194 sice byla ve třech z pěti opakování diagnostikována podle nastavených kritérií kromě očekávané mutace 12Asp také mutace 13Asp, ale tato druhá mutace opět nemusí být brána v úvahu vzhledem k výše zmíněným skutečnostem (jako při analýze vzorku 3064). Navíc hodnoty

$Ct_{\text{reakce 13Asp}}$ byly téměř 35 (na hranici hodnotitelnosti), může se tedy jednat opět o falešně pozitivní výsledek, a rovněž hodnoty $\Delta Ct_{\text{reakce 13Asp}}$ se blížily limitní hodnotě (9,25); (viz přílohy, tab M), případně DNA s mutací 13Asp tedy může být okolo 1 %, což je opět velmi malé množství, které má minimální klinický význam. Ani při statistickém porovnání hodnot $Ct_{\text{kontrolní reakce}}$, $Ct_{\text{reakce 12Asp}}$, $\Delta Ct_{\text{reakce 12Asp}}$, $Tm_{\text{kontrolní reakce}}$ a $Tm_{\text{reakce 12Asp}}$ nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi odchylkami hodnot získaných z pěti pozorování (viz obr. 13 – 17), lze tedy soudit, že tento nový PCR systém je při opakované analýze stejného vzorku schopen dávat statisticky významně stejné výsledky.

7 Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývá návrhem nejvhodnějšího postupu a podmínek PCR metody (založené na principu ARMS s detekcí produktů v reálném čase chemismem interkalačního barviva) která by měla sloužit k detekci sedmi nejčastějších bodových mutací genu *KRAS* ve 12. a 13. kodonu 1. exonu: Gly12Asp (GGT>GAT), Gly12Ala (GGT>GCT), Gly12Val (GGT>GTT), Gly12Ser (GGT>AGT), Gly12Arg (GGT>CGT), Gly12Cys (GGT>TGT) a Gly13Asp (GGC>GAC).

Tato diplomová práce byla vypracována v Laboratoři experimentální medicíny při Dětské klinice Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc. Na tomto pracovišti probíhá rutinní diagnostika zmíněných sedmi nejčastějších *KRAS* mutací u pacientů s nádorovým onemocněním a k této diagnostice je zde v současné době využíván komerční kit TheraScreen DxS. U výrobců kitu TheraScreen došlo loňského roku ke změně majitele a k dlouhodobým problémům s dodržáním lhůty dodání soupravy. Je proto navýsost důležité, aby laboratoř měla k dispozici záložní typizační systém, který může v případě potřeby použít.

Náš nový PCR systém byl navržen tak, aby fungoval na podobném principu jako kit TheraScreen. Oba systémy detekují stejných sedm bodových *KRAS* mutací, na stejné hranici detekce 1 % mutované DNA, oba využívají technologie ARMS a real-time detekce PCR produktu, výsledky jsou analyzovány stejným přístrojem a počítačovým softwarem a rovněž princip práce (rozmístění vzorků na 96ti jamkové destičce) a analýzy je podobný. Ovšem nový PCR systém využívá nejjednodušší chemismus interkalačního barviva, zatímco kit TheraScreen poněkud sofistikovanější chemismus Scorpions. Z tohoto důvodu u našeho nového systému není možnost vnitřní kontroly a při analýze musíme brát v úvahu nejen hodnoty ΔC_t , limit hodnotitelnosti a vzor zkřížené reakce, ale navíc také hodnoty T_m . Náš PCR systém také (na rozdíl od TheraScreenu) využívá kromě forward a reverse primeru navíc LNA blokovací oligonukleotid, který zabraňuje případné nežádoucí amplifikaci WT templátu. I když veškeré parametry a možnosti tohoto nového detekčního systému pro získání CE značky ještě nebyly zjištěny, navržená kritéria pro hodnocení výsledků a analýza patientských vzorků ukázala, že tento systém je schopen dávat obdobné výsledky jako kit TheraScreen a rovněž je schopen při analýze stejného vzorku dávat opakovaně stejné výsledky.

I když tento PCR systém ještě není plně validován, aby jej bylo možno použít pro rutinní diagnostiku, je použitelný jako podpůrný prostředek pro ujištění v případě, že výsledky získané pomocí jiné metody nejsou úplně jednoznačné. Nepochybně má však potenciál být dopracován a vylepšen jako projekt případné doktorské práce a do budoucna se může stát velmi efektivním, rychlým a ekonomicky výhodným diagnostickým prostředkem.

8 Použitá literatura

Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., Patterson, S.D., Chang, D.D. (2008): Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 26: 1626-1634

Amicarelli, G., Shehi, E., Makrigrigios, G.M., Adlerstein, D. (2007): FLAG assay as a novel method for real-time signal generation during PCR: application to detection and genotyping of KRAS codon 12 mutations. *Nucleic Acids Res* 35: e131

Baba, Y., Tshako, M., Sawa, T., Akashi, M., Yashima, E. (1992): Specific base recognition of oligodeoxynucleotides by capillary affinity gel electrophoresis using polyacrylamide-poly(9-vinyladenine) conjugated gel. *Anal. Chem* 64: 1920–1925

Beránek, M., Bureš, J., Šácha, M., Sákra, L., Rajman, M., Jandík, P., Rudolf, E., Landt, O. (2007): Detekce bodových mutací v Kirsten RAS 2 genu metodou locked nucleic acid clamped PCR. *Chem Listy* 101: 738–741

Bezieau, S., Devilder, M.C., Avet-Loiseau, H., Mellerin, M.P., Puthier, D., Pennarun, E., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Moisan, J.P., Bataille, R. (2001): High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* 18: 212-224

Bjørheim, J., Lystad, S., Lindblom, A., Kressner, U., Westring, S., Wahlberg, S., Lindmark, G., Gaudernack, G., Ekstrøm, P., Røe, J., Thilly, W.G., Børresen-Dale, A.L. (1998): Mutation analyses of KRAS exon 1 comparing three different techniques: temporal temperature gradient electrophoresis, constant denaturant capillary electrophoresis and allele specific polymerase chain reaction. *Mutat Res* 403: 103-112

Bjørheim, J., Ekstrøm, P.O., Fossberg, E., Børresen-Dale, A.L., Gaudernack, G. (2001): Automated constant denaturant capillary electrophoresis applied for detection of KRAS exon 1 mutations. *Biotechniques.* 30: 972-975

Bjørheim, J., Gaudernack, G., Giercksky, K.E., Ekstrøm, P.O. (2003): Direct identification of all oncogenic mutants in KRAS exon 1 by cycling temperature capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 24: 63-69

Borchers, R., Heinzlmann, M., Zahn, R., Witter, K., Martin, K., Loeschke, K., Folwaczny, C. (2002): K-ras mutations in sera of patients with colorectal neoplasias and long-standing inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 37: 715-718

Brink, M., de Goeij, A.F., Weijenberg, M.P., Roemen, G.M., Lentjes, M.H., Pachen, M.M., Smits, K.M., de Bruine, A.P., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A. (2003): K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 24: 703-710

Capes-Davis, A., Theodosopoulos, G., Atkin, I., Drexler, H.G., Kohara, A., Macleod, R.A., Masters, J.R., Nakamura, Y., Reid, Y.A., Reddel, R.R., Freshney, R.I. (2010): Check

your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer* [Epub ahead of print]

Chang, E.H., Gonda, M.A., Ellis, R.W., Scolnick, E.M., Lowy, D.R. (1982): Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79: 4848-4852

Clayton, S.J., Scott, F.M., Walker, J., Callaghan, K., Haque, K., Liloglou, T., Xinarianos, G., Shawcross, S., Ceuppens, P., Field, J.K., Fox, J.C. (2000): K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification. *Clin Chem* 46: 1929-1938

Cross, J. (2008): *DxS Ltd. Pharmacogenomics* 9: 463–467

Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Liu, L., Otto, N., Gimm, O., Dralle, H., Boehm, B.O., Pfeifer, G.P., Hoang-Vu, C. (2003): Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 22: 3806-3812

Der, C.J., Krontiris, T.G., Cooper, G.M. (1982): Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 3637-3640

Dieterle, C.P., Conzelmann, M., Linnemann, U., Berger, M.R. (2004): Detection of isolated tumor cells by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for K-ras mutations in tissue samples of 199 colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 10: 641-650

Dominguez, P.L., Kolodney, M.S. (2005): Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens. *Oncogene* 24: 6830-6834

Dufort, S., Richard, M.J., de Fraipont, F. (2009): Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues. *Anal Biochem* 391: 166-168

Fisher, S.G., Lerman, L.S. (1983): DNA fragments differing by single base pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1579– 1583

Fox, J.C., England, J., White, P., Ellison, G., Callaghan, K., Charlesworth, N.R., Hehir, J., McCarthy, T.L., Smith-Ravin, J., Talbot, I.C., Snary, D., Northover, J.M., Newton, C.R., Little, S. (1998): The detection of K-ras mutations in colorectal cancer using the amplification-refractory mutation system. *Br J Cancer* 8: 1267-1274

Friday, B.B., Adjei, A.A. (2005): K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1756: 127-144

Gelfi, C., Righetti, P.G., Cremonesi, L., Ferrari, M. (1994): Detection of point mutations by capillary electrophoresis in liquid polymers in temporal thermal gradients. *Electrophoresis* 15: 1506–1511

Gilje, B., Heikkilä, R., Oltedal, S., Tjensvoll, K., Nordgård, O. (2008): High-fidelity DNA polymerase enhances the sensitivity of a peptide nucleic acid clamp PCR assay for K-ras mutations. *J Mol Diagn* 10: 325-331

Graziano, S.L., Gamble, G.P., Newman, N.B., Abbott, L.Z., Rooney, M., Mookherjee, S., Lamb, M.L., Kohman, L.J., Poiesz, B.J. (1999): Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 17: 668-675

Hashimoto, M., Barany, F., Xu, F., Soper, S.A. (2007): Serial processing of biological reactions using flow-through microfluidic devices: coupled PCR/LDR for the detection of low-abundant DNA point mutations. *Analyst* 132: 913-921

Hidaka, E., Yanagisawa, A., Seki, M., Takano, K., Setoguchi, T., Kato, Y. (2000): High frequency of K-ras mutations in biliary duct carcinomas of cases with a long common channel in the papilla of Vater. *Cancer Res* 60: 522-524

Hongyo, T., Buzard, G.S., Calvert, R.J., Weghorst, C.M. (1993): 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res* 21: 3637-3642

Huang, J., Kirk, B., Favis, R., Soussi, T., Paty, P., Cao, W., Barany, F. (2002): An endonuclease/ligase based mutation scanning method especially suited for analysis of neoplastic tissue. *Oncogene* 21: 1909-1921

Keohavong, P., DeMichele, M.A., Melacrinis, A.C., Landreneau, R.J., Weyant, R.J., Siegfried, J.M. (1996): Detection of K-ras mutations in lung carcinomas: relationship to prognosis. *Clin Cancer Res* 2: 411-418

Keohavong, P., Zhu, D., Melacrinis, A.C., DeMichele, M.A., Weyant, R.J., Luketich, J.D., Testa, J.R., Fedder, M., Siegfried, J.M. (1997): Detection of low-fraction K-ras mutations in primary lung tumors using a sensitive method. *Int J Cancer* 74:162-170

Keohavong, P., Gao, W.M., Zheng, K.C., Mady, H., Lan, Q., Melhem, M., Mumford, J. (2004): Detection of K-ras and p53 mutations in sputum samples of lung cancer patients using laser capture microdissection microscope and mutation analysis. *Anal Biochem* 324: 92-99

Khanna, M., Park, P., Zirvi, M., Cao, W., Picon, A., Day, J., Paty, P., Barany, F. (1999): Multiplex PCR/LDR for detection of K-ras mutations in primary colon tumors. *Oncogene* 18: 27-38

Khrapko, K., Hanekamp, J.S., Thilly, W.G., Belenkii, A., Foret, F., Karger, B.L. (1994): Constant denaturant capillary electrophoresis (CDCE): a high resolution approach to mutational analysis. *Nucleic Acid Res* 22: 364-369

Kimura, K., Nagasaka, T., Hoshizima, N., Sasamoto, H., Notohara, K., Takeda, M., Kominami, K., Ishii, T., Tanaka, N., Matsubara, N. (2007): No duplicate KRAS mutation is identified on the same allele in gastric or colorectal cancer cells with multiple KRAS mutations. *J Int Med Res* 35: 450-457

Kitching, R., Seth, A. (2005): Amplification Refractory Mutation System and Molecular Diagnostics. In: Walker, J.M., Rapley, R. (ed.): Medical Biomethods Handbook; Humana Press Inc., Totowa, New Jersey; 155-165

Kocáková, I., Kiss, I. (2009): Kolorektální karcinom. Diagnosticko-léčebné protokoly Masarykova onkologického ústavu

Kolch, W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351: 289-305

Kressner, U., Bjørheim, J., Westring, S., Wahlberg, S.S., Pählman, L., Glimelius, B., Lindmark, G., Lindblom, A., Børresen-Dale, A.L. (1998): Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 34: 518-521

Kristensen, A.T., Wiig, J.N., Larsen, S.G., Giercksky, K.E., Ekstrøm, P.O. (2008): Molecular detection (k-ras) of exfoliated tumour cells in the pelvis is a prognostic factor after resection of rectal cancer? *BMC Cancer* 8: 213

Krypuy, M., Newnham, G.M., Thomas, D.M., Conron, M., Dobrovic, A. (2006): High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: *KRAS* codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 6: 295

Kumar, R., Dunn, L.L. (1989): Designed diagnostic restriction fragment length polymorphisms for the detection of point mutations in ras oncogenes. *Oncogene Res* 4: 235-241

Laghi, L., Orbetegli, O., Bianchi, P., Zerbi, A., Di Carlo, V., Boland, C.R., Malesci, A. (2002): Common occurrence of multiple K-RAS mutations in pancreatic cancers with associated precursor lesions and in biliary cancers. *Oncogene* 21: 4301-4306

Laken, S.J., Jackson, P.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Strickland, P.T., Groopman, J.D., Friesen, M.D. (1998): Genotyping by mass spectrometric analysis of short DNA fragments. *Nat Biotechnol* 16: 1352-1356

Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J., Hood, L. (1988): A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241: 1077-1080

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

Li, J., Zhong, W. (2007): Typing of multiple single-nucleotide polymorphisms by a microsphere-based rolling circle amplification assay. *Anal Chem* 79: 9030-9038

Lievre, A., Bachet, J.B., Boige, V., Cayre, A., Le, C.D., Buc, E., Ychou, M., Bouche, O., Landi, B., Louvet, C., Andre, T., Bibeau, F., Diebold, M.D., Rougier, P., Ducreux, M., Tomasic, G., Emile, J.F., Penault-Llorca, F., Laurent-Puig, P. (2008). KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 26: 374-379

Liu, D., Daubendiek, S.L., Zillman, M.A., Ryan, K., Kool, E.T. (1996): Rolling circle DNA synthesis: Small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases. *J Am Chem Soc* 118: 1587–1594

Lleonart, M.E., Ramón y Cajal, S., Groopman, J.D., Friesen, M.D. (2004): Sensitive and specific detection of K-ras mutations in colon tumors by short oligonucleotide mass analysis. *Nucleic Acids Res* 32: e53

MacLeod, R.A., Dirks, W.G., Matsuo, Y., Kaufmann, M., Milch, H., Drexler, H.G. (1999): Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer* 83: 555-563

Markovic, O., Markovic, N. (1998): Cell cross-contamination in cell cultures: The silent and neglected danger. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34: 1-8

McBride, O.W., Swan, D.C., Tronick, S.R., Gol, R., Klimanis, D., Moore, D.E., Aaronson, S.A. (1983): Regional chromosomal localization of N-ras, K-ras-1, K-ras-2 and myb oncogenes in human cells. *Nucleic Acids Res.* 11: 8221-8236

McKinzie, P.B., Parsons, B.L. (2002): Detection of rare K-ras codon 12 mutations using allele-specific competitive blocker PCR. *Mutat Res* 517: 209-220

McKinzie, P.B., Delongchamp, R.R., Chen, T., Parsons, B.L. (2006): ACB-PCR measurement of K-ras codon 12 mutant fractions in livers of Big Blue rats treated with N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *Mutagenesis* 21: 391-397

Mitsudomi, T., Viallet, J., Mulshine, J.L., Linnoila, I., Minna, J.D., Gazdar, A.F. (1991): Mutation of *ras* genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene* 6: 1353-1362

Monzon, F.A., Ogino, S., Hammond, M.E., Halling, K.C., Bloom, K.J., Nikiforova, M.N. (2009): The role of KRAS mutation testing in the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 133: 1600-1606

Neville, E., Ellison, G., Kiaris, H., Stewart, M., Spandidos, D., Fox, J., Field, J.K. (1995): Detection of *K-ras* mutations in non-small cell lung carcinoma. *International Journal of Oncology* 7: 511-514

Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalshekerl, N., Smith, J.C., Markham, A.F. (1989): Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* 17: 2503-2516

Nickell-Brady, C., Hahn, F.F., Finch, G.L., Belinsky, S.A. (1994): Analysis of K-ras, p53 and c-raf-1 mutations in beryllium-induced rat lung tumors. *Carcinogenesis* 15: 257-262

Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Yan, L., Cantor, M., Namgyal, C., Mino-Kenudson, M., Lauwers, G.Y., Loda, M., Fuchs, C.S. (2005): Sensitive Sequencing Method for KRAS Mutation Detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 7: 413-421

Old, J.M. (2000): The Amplification Refractory Mutation System. In: Rapley, R. (ed.): The Nucleic Acid Protocols Handbook; Humana Press Inc., Totowa, New Jersey; 723-727

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. (1989): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879

Orou, A., Fechner, B., Utermann, G., Menzel, H.J. (1995): Allelespecific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to pool screening, *Hum Mutat* 6: 163–169

Ozaki, Y., Katayama, Y., Ihara, T., Maeda, M. (1999): An Affinity Capillary Electrophoresis for the Detection of Gene Mutation Using Immobilized Oligonucleotides-Polyacrylamide Conjugate. *Analytical Sciences* 15: 389-392

Ørum, H., Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., Buchardt, O., Stanley C. (1993): Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR camping. *Nucleic Acids Res* 21: 5332–5336

Pan, Z.Z., Wan, D.S., Chen, G., Li, L.R., Lu, Z.H., Huang, B.J. (2004): Co-mutation of p53, K-ras genes and accumulation of p53 protein and its correlation to clinicopathological features in rectal cancer. *World J Gastroenterol* 10: 3688-3690

Pellegata, N.S., Sessa, F., Renault, B., Bonato, M., Leone, B.E., Solcia, E., Ranzani, G.N. (1994): K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 54: 1556-1560

Popescu, N.C., Amsbaugh, S.C., DiPaolo, J.A., Tronick, S.R., Aaronson, S.A., Swan, D.C. (1985): Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. *Somat Cell Mol Genet.* 11: 149-155.

Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyrén, P. (1996): Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242: 84-89

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci* 74: 5463–5467

Sato, K., Inoue, A., Hosokawa, K., Maeda, M. (2005): Detection of single-base mutation by affinity capillary electrophoresis using a DNA-polyacrylamide conjugate. *Electrophoresis.* 26: 3076-3080

Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517

Šmarda, J., Doškář, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková, J. (2005): *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita Brno, 1.vydání

Šmarda, J., Šmardová, J. (2005): Jak vznikají nádory? *Universitas Brno, Masarykova univerzita.* 38 (4): 29-37

Taback, B., Bilchik, A.J., Saha, S., Nakayama, T., Wiese, D.A., Turner, R.R., Kuo, C.T., Hoon, D.S. (2004): Peptide nucleic acid clamp PCR: a novel K-ras mutation detection assay for colorectal cancer micrometastases in lymph nodes. *Int J Cancer* 111: 409-414

Thiede, C., Bayerdörffer, E., Blasczyk, R., Wittig, B., Neubauer, A. (1996): Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 24: 983-984

TheraScreen® DxS: K-RAS Mutation Kit – Instructions for use. DxS, Manchester UK, verze DU001g (2009)

Urban, T., Ricci, S., Danel, C., Antoine, M., Kambouchner, M., Godard, V., Lacave, R., Bernaudin, J.F. (2000): Detection of codon 12 K-ras mutations in non-neoplastic mucosa from bronchial carina in patients with lung adenocarcinomas. *Br J Cancer* 82: 412-417

Van Cutsem, E., Oliveira, J. (2009): Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 20 (Supplement 4): 61–63

van Heek, N.T., Clayton, S.J., Sturm, P.D., Walker, J., Gouma, D.J., Noorduynd, L.A., Offerhaus, G.J., Fox, J.C. (2005): Comparison of the novel quantitative ARMS assay and an enriched PCR-ASO assay for K-ras mutations with conventional cytology on endobiliary brush cytology from 312 consecutive extrahepatic biliary stenoses. *J Clin Pathol* 58: 1315-1320

Verlaan-de Vries, M., Bogaard, M.E., van den Elst, H., van Boom, J.H., van der Eb, A.J., Bos, J.L. (1986): A dot-blot screening procedure for mutated ras oncogenes using synthetic oligodeoxynucleotides. *Gene* 50: 313-320

Wabuyele, M.B., Farquar, H., Stryjewski, W., Hammer, R.P., Soper, S.A., Cheng, Y.W., Barany, F. (2003): Approaching real-time molecular diagnostics: single-pair fluorescence resonance energy transfer (spFRET) detection for the analysis of low abundant point mutations in K-ras oncogenes. *J Am Chem Soc* 125: 6937-6945

Ward, R., Hawkins, N., O'Grady, R., Sheehan, C., O'Connor, T., Impey, H., Roberts, N., Fuery, C., Todd, A. (1998): Restriction endonuclease-mediated selective polymerase chain reaction: a novel assay for the detection of K-ras mutations in clinical samples. *Am J Pathol* 153: 373-379

Watanabe, H., Sawabu, N., Ohta, H., Satomura, Y., Yamakawa, O., Motoo, Y., Okai, T., Takahashi, H., Wakabayashi, T. (1993): Identification of K-ras oncogene mutations in the pure pancreatic juice of patients with ductal pancreatic cancers. *Jpn J Cancer Res* 84: 961-965

Whitehall, V., Tran, K., Umaphathy, A., Grieu, F., Hewitt, C., Evans, T.J., Ismail, T., Li, W.Q., Collins, P., Ravetto, P., Leggett, B., Salto-Tellez, M., Soong, R., Fox, S., Scott, R.J., Dobrovic, A., Iacopetta, B. (2009): A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting. *J Mol Diagn* 11: 543-552

Wiecek, S., Drábek, J., Radzioch, D., Hajdúch, M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. JBB/150960 (in press)

Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Pryor, R.J. (2003): High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 49: 853-860

Yoshino, K., Nishigaki, K., Husimi, Y. (1991): Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. *Nucleic Acids Res* 19: 3153

Zhang, P., Chu, X., Xu, X., Shen, G., Yu, R. (2008): Electrochemical detection of point mutation based on surface ligation reaction and biometallization. *Biosens Bioelectron* 23: 1435-1441

Zhao, C., Xu, G., Shi, X., Ma, J., Lu, S., Yang, Q. (2004): Detection of K-ras exon 1 mutations by constant denaturant capillary electrophoresis. *Biomed Chromatogr* 18: 538-541

Zuo, Z., Chen, S.S., Chandra, P.K., Galbincea, J.M., Soape, M., Doan, S., Barkoh, B.A., Koeppen, H., Medeiros, L.J., Luthra, R. (2009): Application of COLD-PCR for improved detection of KRAS mutations in clinical samples. *Mod Pathol* 22: 1023-1031

Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC)
[<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>]. Wellcome Trust Sanger Institute

9 Seznam použitých zkratek

ACE	afinitní kapilární elektroforéza (Affinity Capillary Electrophoresis)
ACB-RCR	PCR s alelově specifickým kompetitivním blokem (Allele-specific Competitive Blocker PCR)
ARMS	system, kde mutace/polymorfismus zabrání amplifikaci (Amplification Refractory Mutation System)
ASP	alelově specifický primer (Allele-Specific Primer)
bp	pár bází (Base Pair)
CDCE	konstantní denaturační kapilární elektroforéza (Constant Denaturant Capillary Electrophoresis)
CE	Communauté Européene
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
COLD-PCR	PCR koamplifikace při nižší denaturační teplotě (CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR)
CON	konzervovaný (společný) primer (CONserved primer)
Ct	cyklus, ve kterém hodnota fluorescence překročila prahovou hodnotu (Cycle threshold)
CTCE	kapilární elektroforéza při cyklující teplotě (Cycling Temperature Capillary Electrophoresis)
ctrl	oligonukleotidová kontrola
D2-PA	typ fluorescenční značky pro sekvencér Beckman
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (DeoxyriboNucleic Acid)
<i>DRB</i>	gen pro HLA-DR β (z třídy II lidských leukocytových antigenů - HLA II)
dNTP	2'- deoxynukleosidtrifosfát (2'- deoxyriboNucleotide TriPhosphate)
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (Epidermal Growth Factor Receptor)
<i>epn2</i>	gen pro Epsin-2
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kináza (Extracellular signal-Regulated Kinase)
F	forward
FLAG	tvorba fluorescenčně značeného ampliconu (FLuorescent Amplicon Generation)

FRA	fragilní místo
FRET	rezonanční přenos fluorescenční energie (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
GDP	guanosin difosfát (Guanosine DiPhosphate)
GIYD2	GIY-YIG domain containing 2
GRB	protein vázající receptor růstových faktorů (Growth factor Receptor-Bound protein)
GTP	guanosin trifosfát (Guanosine TriPhosphate)
HLA	lidský leukocytový antigen (Human Leukocyte Antigen)
HRM	analýza křivek teplot tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melting analysis)
kb	kilobáze – 1000 nukleových bází
KRAS	homolog onkogenu Kirsten rat sarcoma viru (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)
LDR	ligázová detekční reakce (Ligation Detection Reaction)
LNA	nukleová kyselina s tzv. uzamčenou konformací (Locked Nucleic Acid)
MAPKs	mitogenem aktivované protein kinázy (Mitogen-Activating Protein Kinases)
MEK	MAP/ERK kináza
MKK	kináza aktivující MAPK (Mitogen-activated protein Kinase Kinase)
MKKK	kináza aktivující kinázu aktivující MAPK (Mitogen-activated protein Kinase Kinase Kinase)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger RiboNucleic Acid)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (Nicotinamide Adenine Dinucleotide PHosphate)
NQO1	NAD(P)H : quinone oxidoreductase
NTC	beztemplátová kontrola (No Template Control)
p	označení kratšího ramene chromozómu (z francouzského <i>petit</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PM	primerová směs (Primer Mix)
PNA	Peptide Nucleic Acids
q	označení delšího ramene chromozómu (písmeno následující v abecedě po „p“)
R	reverse
RAF	specifická proteinkináza
RCA	amplifikace otáčivou kružnicí (Rolling Circle Amplification)

REMS-PCR	selektivní PCR zprostředkovaná restrikcí endonukleázami (Restriction Endonuclease-Mediated Selective PCR)
RTK	receptorová tyrosinkináza (Receptor Tyrosine Kinase)
RFLP	délkový polymorfismus restrikcí fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
R462Q	alelická varianta genu pro RNaseL
SOMA	hmotnostní analýza krátkých oligonukleotidů (Short Oligonucleotide Mass Analysis)
SOS	protein „Son Of Sevenless“
spFRET	jednobázový FRET (single-pair FRET)
SSCP	jednovláknový konformační polymorfismus (Single-Stranded Conformation Polymorphism)
SSP	sekvenčně specifické primery (Sequence Specific Primers)
SULT1A4	phenol-preferring sulfotransferase
T _m	teplota tání (melting temperature) – teplota, při které dochází k denuraci 50 % ampliconů
TTGE	gelová elektroforéza v časovém teplotním gradientu (Temporal Temperature Gel Electrophoresis)
UTR	nepřekládaná oblast (UnTranslated Region)
UV	ultrafialové záření (UltraViolet radiation)
VMC8G6	mikrosatelitový lokus (marker)
WGA	celogenomová amplifikace (Whole Genome Amplification)
WT	standardní, divoký, nemutovaný typ (Wild Type)

10 Přílohy

Tab. A: Použité primery a polynukleotidy

Označení primeru	Druh primeru	Směr	Sekvence (5'-3')	Speciální modifikace
63	VMC8G6 F	F	TCAgTAATCACgAgCTTCCCg	
64	VMC8G6 R	R	TggAgTggggATATggAAATg	
221	universal		gtttcttcgctcgttgcgtagtg	
322	KRAS externí	F	AAAAggTACTggTggAgTATTTgA	
323	KRAS externí	R	TCATgAAAATggTCAGAgAAACC	
334	CFTR exon IV	F	TATATgTgCCATggggCCTgTgCAAggA Ag	
335	CFTR exon IV	R	CTCCTACACCCAgCCATTTTTggC	
336	alpha 1 antitrypsin exII inIII	F	gggCCTCAgTCCCAACATggCTAAgAgg Tg	
337	alpha 1 antitrypsin exII inIII	R	CCCACCTTCCCCTCTCTCCAggCAAATg gg	
338	KRAS kodon 12Arg	F	AAACTTgTggTAGTTggAgCTC	
339	KRAS kodon 12Gly	F	AAACTTgTggTAGTTggAgCTg	
340	KRAS	R	TgTTggATCATATTCgTCCAC	
341	KRAS kodon 12Ser	F	AAACTTgTggTAGTTggAgCTA	
342	KRAS kodon 12Cys	F	AAACTTgTggTAGTTggAgCTT	
343	KRAS kodon 12Val	F	AACCTTgTggTAGTTggAgCTgT	
344	KRAS kodon 12Asp	F	AACCTTgTggTAGTTggAgCTgA	
345	KRAS kodon 12Ala	F	AACCTTgTggTAGTTggAgCTgC	
346	KRAS kodon 13Asp	F	TgTggTAGTTggAgCTggTgA	
356	D2-PA universal		CACTCACAAGCTCgACgTACAC	D2-PA
366	HLA-DRB	F	TgCCAAgTggAgCACCAA	
367	HLA-DRB	R	gCATCTTgCTCTgTgCAgAT	
388	FRA_ctrl2_SULT1A 4/GIYD2	F	ggAgAggTTTgTTCAACTggTC	
389	FRA_ctrl2_SULT1A 4/GIYD2	R	TCTACCgTAAAAGTCCCTTCCA	
413	KRAS kodon 12Cys (s LNA)	F	AAACTTgTggTAGTTggAgCTT	3'LNA
422	Amelogenin	F	CACTCACAAGCTCgACgTACACCCTggg CTCTgTAAAgAA	D2-PA
423	Amelogenin	R	gtttcttcgctcgttgcgtagtgATCAgA gCTTAAACTgggAAgCTg	
431	epn 2	F	TggTCATTTCTCTCTTTggA	
432	epn 2	R	AgTACCTgCTgCTggACCAC	
449	KRAS LNA blok	F	ggAgCTggTggCgTAgg	5'fosfo 3'amino LNA
453	NQO1 pro restrikci	F	TCCTCAgAgTggCATCTgC	
454	NQO1 pro restrikci	R	TCTCCTCATCCTgTACCTCT	
477	KRAS okolí pro ko pyrosequencing zleva	F	gggCTATTTCAAAGACAAggCgA	
478	KRAS okolí pro ko pyrosequencing zleva	R	ACTTCCATCCCAAgCAGATgAg	
483	FRA3 kontrola p14.1	F	TCACCTCgAATCCTCACATgCA	
484	FRA3 kontrola p14.1	R	AATggCTCACTgTTgTgACCTg	
493	FRA3 kontrola q28	F	TCACAgAgCTTTTTgCCATTTCC	
494	FRA3 kontrola q28	R	TTTCTgAAgggTTTTgggCAA	

Označení primeru	Druh primeru	Směr	Sekvence (5'-3')	Speciální modifikace
514	pozitivní kontrola KRAS 12Arg	F	TATAAACTTgTggTAGTTggAgCTCgTg gCgTAGgCAAgAgTgCCTTgACgATACA gCTAATTCAGAAATCATTgTggACgAA TATgATCCAACAATA	
531	pozitivní kontrola KRAS 12Asp	F	TATAAACTTgTggTAGTTggAgCTgATg gCgTAGgCAAgAgTgCCTTgACgATACA gCTAATTCAGAAATCATTgTggACgAA TATgATCCAACAATA	
532	pozitivní kontrola KRAS 12Ala	F	TATAAACTTgTggTAGTTggAgCTgCTg gCgTAGgCAAgAgTgCCTTgACgATACA gCTAATTCAGAAATCATTgTggACgAA TATgATCCAACAATA	
533	pozitivní kontrola KRAS 12Val	F	TATAAACTTgTggTAGTTggAgCTgTTg gCgTAGgCAAgAgTgCCTTgACgATACA gCTAATTCAGAAATCATTgTggACgAA TATgATCCAACAATA	
534	pozitivní kontrola KRAS 12Ser	F	TATAAACTTgTggTAGTTggAgCTAgTg gCgTAGgCAAgAgTgCCTTgACgATACA gCTAATTCAGAAATCATTgTggACgAA TATgATCCAACAATA	
535	pozitivní kontrola KRAS 12Cys	F	TATAAACTTgTggTAGTTggAgCTTgTg gCgTAGgCAAgAgTgCCTTgACgATACA gCTAATTCAGAAATCATTgTggACgAA TATgATCCAACAATA	
536	pozitivní kontrola KRAS 13Asp	F	TATAAACTTgTggTAGTTggAgCTggTg ACgTAGgCAAgAgTgCCTTgACgATACA gCTAATTCAGAAATCATTgTggACgAA TATgATCCAACAATA	
544	RNaseL primer mutant R462Q (G>A)	F	gAggAAgATgAATTTgCCCA	
546	RNaseL primer common	R	TCATAAACAAAgATCCCACA	

VMC8G6 - mikrosatelitový lokus (marker), CFTR - Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, D2-PA - typ fluorescenční značky pro sekvencér Beckman, DRB - gen pro HLA-DRβ (ze třídy II lidských leukocytových antigenů - HLA II), FRA - fragilní místo, ctrl- oligonukleotidová kontrola, SULT1A4 - phenol-preferring sulfotransferase, GIYD2 - GIY-YIG domain containing 2, NQO1 - NAD(P)H : quinone oxidoreductase, NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, R462Q - alelická varianta genu pro RNaseL

Tab. B: Použité primerové směsi (PM)

Označení PM	Druh PM	F primer	R primer	Další primery či sondy
27	VMC8G6	63	64	
169	KRAS ext	322	323	
176	CFTR exon IV	334	335	
177	alpha 1 antitrypsin exII inIII	336	337	
203	FRA_ctrl2_SULT1A4/GIYD2	388	389	
236	HLA-DRB	366	367	
242	KRAS kodon 12Cys s LNA primerem	413	340	
247	Amelogenin	422	423	356, 221
262	NQO1 pro restrikci	453	454	
273	kras okolí pro ko pyrosequencing zleva	477	478	
276	FRA3 kontrola p14.1	483	484	
281	FRA3 kontrola q28	493	494	
292	KRAS kodon 12Cys s LNA primerem a blokem WT	413	340	449
301	KRAS kodon 12Arg s obyčejným primerem a blokem WT	338	340	449
307	epn 2	431	432	
322	RNaseL standard	544	546	
355	KRAS kodon 12Ala s obyčejným primerem a blokem WT	345	340	449
356	KRAS kodon 12Asp s obyčejným primerem a blokem WT	344	340	449
357	KRAS kodon 12Cys s obyčejným primerem a blokem WT	342	340	449
358	KRAS kodon 12Ser s obyčejným primerem a blokem WT	341	340	449
359	KRAS kodon 12Val s obyčejným primerem a blokem WT	343	340	449
360	KRAS kodon 13Asp s obyčejným primerem a blokem WT	346	340	449

Tab. C: Použité vzorky DNA

Označení vzorku	Typ vzorku	Diagnóza	Výsledek analýzy (mutace genu <i>KRAS</i>) pomocí TheraScreen	Poznámky
1241	DNA buněčné linie AsPC-1	lidský karcinom pankreatu	12Asp	dle databáze COSMIC je 12Asp
1427	DNA buněčné linie HRCP	nezjištěno	13Asp	
2598	pacientská DNA (poWGA)	karcinom jater	12Cys	
2782	pacientská DNA	nezjištěno	12Cys	
2799	pacientská DNA (poWGA)	karcinom tlustého střeva	negativní (WT)	
2814	pacientská DNA (poWGA)	nezjištěno	12Ala	
2829	pacientská DNA (poWGA)	nezjištěno	12Val	
2862	pacientská DNA (poWGA)	karcinom plic	12Cys	
2865	pacientská DNA (poWGA)	karcinom plic	WT	
2868	pacientská DNA (poWGA)	karcinom plic	WT	
2902	pacientská DNA (poWGA)	karcinom konečnicku	WT	
2912	pacientská DNA (poWGA)	karcinom konečnicku	13Asp	
2944	pacientská DNA (poWGA)	karcinom konečnicku	13Asp	
2950	pacientská DNA (poWGA)	karcinom konečnicku	12Asp	
2951	pacientská DNA (poWGA)	karcinom konečnicku	12Asp	
2952	pacientská DNA (poWGA)	karcinom konečnicku	12Val	
2953	pacientská DNA (poWGA)	karcinom tlustého střeva	WT	
2960	DNA buněčné linie NCI-H1975	lidský karcinom plic	WT	dle databáze COSMIC je WT
2961	DNA buněčné linie NCI-H620	lidský karcinom plic	12Val	
2962	DNA buněčné linie NCI-H157	lidský karcinom plic	12Cys	dle databáze COSMIC a článku Mitsudomi <i>et al.</i> (1991) je 12Arg
2976	pacientská DNA (poWGA)	karcinom jater	WT	
2977	pacientská DNA (poWGA)	karcinom konečnicku, prsu a pochvy	12Val	
2997	pacientská DNA (poWGA)	karcinom konečnicku	12Ser	
3012	DNA buněčné linie A549	lidský karcinom plic	12Ser	dle databáze COSMIC je 12Ser
3021	DNA buněčné linie NCI-H647	lidský karcinom plic	13Asp	dle databáze COSMIC a článku Mitsudomi <i>et al.</i> (1991) je 13Asp

Označení vzorku	Typ vzorku	Diagnóza	Výsledek analýzy (mutace genu <i>KRAS</i>) pomocí TheraScreen	Poznámky
3047	pacientská DNA (poWGA)	karcinom tlustého střeva	12Asp	
3050	pacientská DNA (poWGA)	karcinom tlustého střeva	WT	
3064	pacientská DNA (poWGA)	karcinom průdušek a plic	12Val, 12Asp	
3068	pacientská DNA (poWGA)	karcinom tlustého střeva	WT	
3071	pacientská DNA (poWGA)	karcinom tlustého střeva	WT	
3088	pacientská DNA (poWGA)	karcinom konečníku	WT	
3159	DNA buněčné linie HPAC	lidský karcinom pankreatu	12Ser	dle databáze COSMIC je 12Asp
3194	pacientská DNA (poWGA)	karcinom tlustého střeva	12Asp	
3209	pacientská DNA (poWGA)	karcinom průdušek a plic	12Asp	
3234	DNA buněčné linie NCI-H1975	lidský karcinom plic	WT	dle databáze COSMIC je WT
3250	DNA buněčné linie NCI-H2009	lidský karcinom plic	12Ala	dle databáze COSMIC a článku Mitsudomi <i>et al.</i> (1991) je 12Ala
3311	pacientská DNA (poWGA)	karcinom jater	WT	
3323	pacientská DNA (poWGA)	karcinom tlustého střeva	WT	
3339	DNA buněčné linie NCI-H358	lidský karcinom plic	nezjištěno	dle databáze COSMIC a článku Mitsudomi <i>et al.</i> (1991) je 12Cys

Tab. D: Výsledky experimentů – funkčnost a koncentrace blokovacího oligonukleotidu

LNA	Konc. primerů [μM]	Konc. bloku [μM]	Ct					Tm [°C]					
			vzorek 2868	vzorek 2865	vzorek 2598	vzorek 2862	NTC	vzorek 2868	vzorek 2865	vzorek 2598	vzorek 2862	NTC	
ne	0,2	0,2			24,88	29,11				80	80,11		
				40	25,52	29,88			81,36	80,1	80,14		
					26,76	31,03				80,01	80,04		
ne	0,2	1			25,38	29,54				80,02	80,08		
					25,99	30,62				80,14	80,22		
					26,28	31,1				80,21	80,26		
ne	0,2	—			24,75	29				79,88	79,98		
			40	40	25,1	29,53		80,25	80,45	79,98	80,07		
					37,79	24,89	29,58		81,17	80,07	80,02		
ne	0,5	0,2	36	40	24,04	28,25				80,08	80,08		
					23,96	28,67				80,11	80,14		
					24,04	28,36				80,14	80,21		
ne	0,5	1		37,3	24,15	28,75			≅ 75	80,12	80,15		
				36,43	24,03	28,6			80,19	80,22	80,21		
				40	24,04	28,57			80,32	80,23	80,22		
ne	0,5	—	37,04	40	24,01	28,59		≅ 75	81,23	80,04	80,09		
					37,67	23,93	28,27			80,16	80,08	80,13	
			37,23	40	23,95	28,29	35,91	80,18	80,74	80,14	80,24	80,7	
ano	0,2	0,2			26,69	30,89				80,5	80,6		
			40		27,21	31,33		80,54		80,6	80,71		
					27,75	32,42				80,72	80,81		
ano	0,2	1			27,76	32,38				80,42	80,24		
				40	28,73	32,63	37,04		80,4	80,61	80,75	81,19	
					29,39	34,27				80,68	80,32		
ano	0,2	—			26,33	30,17				80,47	80,55		
					26,49	30,41				80,53	80,63		
					26,73	31,27				80,63	80,91		
ano	0,5	0,2			24,01	28,68				80,48	80,51		
					24,2	28,71				80,54	80,61		
				40	24,11	28,75			81,85	80,55	80,71		
ano	0,5	1			24,46	29,26				80,57	80,12		
					24,77	29,31				80,64	80,76		
					24,8	29,58				80,64	80,98		
ano	0,5	—		40	24,22	28,62			81,26	80,29	80,59		
				40	24,08	28,69			81,19	80,59	80,62		
				40	24,12	28,65			81,34	80,58	80,71		

Tab. E: Výsledky experimentů – analýza KRAS mutace 12Asp ve vzorcích DNA izolované z krevní plazmy

Vzorek	Mutace (12Asp)	Ct	Tm [°C]
1	ne		80,19
2	ne	39,4	80,44
3	ne		79,6
4	ne	23,31	77,91
5	ne		79,9
6	ne		79,73
7	ne		80,64
8	ne	40	80,29
9	ne	40	80,29
10	ne		
11	ne		79,91
12	ne		80,32
13	ne	40	80,48
14	ne		80,49
15	ne	35,98	77,05
16	ne		79,56
17	ne	33,11	77,3
18	ne	33,87	77,03
19	ne	40	80,57
20	ne	34,13	
21	ne	35,17	
22	ne	36,18	
23	ne		78,89
24	ne	35,37	
25	ne	40	80,46
26	ne	40	80,43
27	ne	40	80,52
28	ne	40	80,99
29	ne	40	80,37
30	ne		78,46
31	ne	40	80,21
32	ne	34,97	77,11
33	ne	32,85	77,24
34	ne	40	80,34
35	ne	40	80,43
36	ne	38,76	80,79
37	ne	35,32	
38	ne	38,5	80,27
39	ne		80,03
40	ne	37,73	80,21
41	ne	40	80,44
42	ne	36,21	
43	ne	40	80,31
44	ne	40	80,22
45	ne	36,49	80,23
46	ne	40	80,35
47	ne		78,18
48	ne	40	80,36

Vzorek	Mutace (12Asp)	Ct	Tm [°C]
49	ano	30,36	77,29 80,1
50	ano	31,19	80,08
51	ano	30,9	79,41
52	ano	30,12	80,46
53	ano	32,22	79,55
54	ano	33,56	80,16
55	ano	33,01	80,04
56	ano	31,37	79,97
57	ano	33,19	79,59
58	ano	32,72	80,16
59	ano	33,61	80,18
60	ano	31,16	80,29
61	ano	31,16	80,1
62	ano	32,07	79,9
63	ano	31,53	80,12
64	ano	32,5	80,05
65	ano	31,89	79,69
66	ano	30,96	80,26
67	ano	32,64	80,09
68	ano	30,14	80,47
69	ano	31,52	79,61
70	ano	33,09	79,68
71	ano	32,88	80,12
72	ano	31,33	80,05
73	ano	32,98	80,42
74	ano	32,28	80,21
75	ano	33,29	80,28
76	ano	31,07	79,94
77	ano	32,81	80,48
78	ano	34,11	80,19
79	ano	31,88	80,08
80	ano	31,95	80,19
81	ano	33,4	80,12
82	ano	32,96	80,12
83	ano	32,44	80,14
84	ano	30,29	80,59
85	ano	33,08	80,13
86	ano	32,12	80,06
87	ano	32,01	80,04
88	ano	31,31	80,02
89	ano	32,51	80,23
90	ano	33,06	80,21
91	ano	32,64	80,2
92	ano	30,56	80,5
93	ano	32,03	80,23
94	ano	31,79	80,27
95	ano	32,32	80,01
96	ano	32,63	80,11

Tab. F: Hodnoty Ct – analýza diluční řady DNA buněčné linie NCI-H2009

Primery \ Mutace	100 %	4 %	2 %	1 %	0,5 %	0,25 %	0,125 %
kontrola	25,22	24,22	24,48	24,18	24,11	24,05	23,97
12Ala	26,36	30,91	31,97	32,78	34,40	36,74	35,05
12Asp	40	40		40		40	40
12Arg				40			
12Cys	38,33						
12Ser	39,48	40	40			40	
12Val	27,84	32,03	32,85	34,03	34,29		33,94
13Asp	40	37,46	37,22	37,86	37,87	37,53	39,04

Tab. G: Hodnoty Ct - výsledky analýzy reálných vzorků komerčním kitem TheraScreen

Vzorky Průběhy	Hodnoty Ct																			
	2814	3209	3194	3047	2950	2951	2782	2997	2952	2944	2912	3050	2953	3323	2976	3071	3088	3064	2977	2829
kontrola	23,47	29,51	24,9	26,8	26,08	25,87	32,73	26,9	28,77	24,93	28,66	26,42	29,47	24,97	28,27	28,14	27,94	29,63	28,49	23,23
12Ala	29,7		33,82	36,72	39,01	37,21		41	37,22	35,82		37,44	41	34,5	40,64	38,47	37,84	31,87	34,86	26,12
12Asp	35,91	32,75	28,64	29,59	31,12	29,85	41	39,06	41	37,61	38,01	35,3	41	34,64	38,02	37,38	36,82	34,51	41	32,58
12Arg	36,32		36,83	36,34	41	39,03	41	38,86		38,21	38,84	37,93		35,96	39,33	38,65	39,66		41	33,56
12Cys	35,13		38,23	39,26	36,37	41	34,43	41	41	41	41	38,57		37,26		41	41		41	33,25
12Ser	35,02		38,88	41	41	41	41	31,73		39,61	41	37,58	38,9		41	41	41			33,67
12Val	36,94	40	40,31	37,41	41	39,69	41	41	32,94	37,09	41	39,03	41	36,46	41	41	41	30,87	31,31	24,47
13Asp	37,22	39,13	36,34	37,42	41	39,83		41		29,29	33,35	38,27		37,11	41		41		41	34,55

Tab. H: Hodnoty Ct - výsledky analýzy reálných vzorků novým PCR systémem

Vzorky Průběhy	Hodnoty Ct																			
	2814	3209	3194	3047	2950	2951	2782	2997	2952	2944	2912	3050	2953	3323	2976	3071	3088	3064	2977	2829
kontrola	22,86	27,71	25,5	23,75	24,51	23,48	28,62	25,18	27,92	22,47	25,21	23,52	26,5	26,57	25,68	25,96	25,49	29,3	24,98	22,7
12Ala	30,85	34,83	32,61	31,34	32,81	30,83	35,57	40	35,61	39,56	33,81					40		32,15	32,35	28,37
12Asp	37,16	30,99	29,13	27,64	28,67	27,04		40	40	32,56	31,61	39,05	40		40	40	40	40	39,36	37,61
12Arg				40		40	40	35,94		40	32,06	36,76	40		40	38,63	40	40		
12Cys	39,36		40	40	36,46	35,12	31,32	40		34,47	40			40	40	36,74	40	40	37,8	40
12Ser	40		40	37,19	38,38	34,06		29,99	40	33,79	40	40				40	40	40	40	36,54
12Val	32,28	40	36,48	36,17	37,03	34,01	35,12	37,2	30,92	33,75	37,84	31,34	36,5	40	40	40	40	27,03	27,48	23,55
13Asp	36,27		34,9	34,49	35,74	35,05	40	36,79		25,5	29,03	36,59	40	38,43	40	37,44	39,16	38,95	40	36,63

Tab. I: Hodnoty ΔCt - analýza reálných vzorků komerčním kitem TheraScreen

Primery	Hodnoty ΔCt																			
	2814	3209	3194	3047	2950	2951	2782	2997	2952	2944	2912	3050	2953	3323	2976	3071	3088	3064	2977	2829
12Ala	6,23	---	8,92	9,92	---	11,34	---	---	8,45	10,89	---	11,02	---	9,53	---	---	9,9	2,24	6,37	2,89
12Asp	12,44	3,24	3,74	2,79	5,04	3,98	---	---	---	12,68	---	8,88	---	9,67	---	9,24	8,88	4,88	---	9,35
12Arg	12,85	---	11,93	9,54	---	---	---	---	---	---	---	11,51	---	10,99	---	---	---	---	---	10,33
12Cys	11,66	---	---	---	10,29	---	1,7	---	---	---	---	---	---	12,29	---	---	---	---	---	10,02
12Ser	11,55	---	---	---	---	---	---	4,83	---	---	---	11,16	---	---	---	---	---	---	---	10,44
12Val	13,47	---	---	10,61	---	---	---	---	4,17	12,16	---	---	---	11,46	---	---	---	1,24	---	1,24
13Asp	13,75	---	11,44	10,62	---	---	---	---	---	4,36	4,69	---	---	12,14	---	---	---	---	---	11,32

Zeleně zvýrazněné hodnoty ΔCt odpovídají parametrům, podle kterých lze hodnotit jako pozitivní pro danou mutaci
 Volné kolonky (---) odpovídají případům, kdy hodnoty Ct vůbec nebyly naměřeny (žádná amplifikace) nebo už byly mimo stanovený limit hodnotitelnosti ($Ct > 38$)

Tab. J: Hodnoty ΔCt - analýza reálných vzorků novým PCR systémem

Primery	Hodnoty ΔCt																			
	2814	3209	3194	3047	2950	2951	2782	2997	2952	2944	2912	3050	2953	3323	2976	3071	3088	3064	2977	2829
12Ala	7,99	7,12	7,11	7,59	8,3	7,35	---	---	---	---	8,6	---	---	---	---	---	---	2,85	7,37	5,67
12Asp	---	3,28	3,63	3,89	4,16	3,56	---	---	---	10,09	6,4	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12Arg	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	6,85	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12Cys	---	---	---	---	---	---	2,7	---	---	12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12Ser	---	---	---	---	---	10,58	---	4,81	---	11,32	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12Val	9,42	---	---	---	---	10,53	---	---	3	11,28	---	7,82	---	---	---	---	---	2,27	2,5	0,85
13Asp	---	---	9,4	10,74	---	---	---	---	---	3,03	3,82	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Zeleně zvýrazněné hodnoty ΔCt odpovídají parametrům, podle kterých lze hodnotit jako pozitivní pro danou mutaci
 Volné kolonky (---) odpovídají případům, kdy hodnoty Ct vůbec nebyly naměřeny (žádná amplifikace) nebo už byly mimo stanovený limit hodnotitelnosti ($Ct > 35$)

Tab. K: Hodnoty T_m – výsledky analýzy reálných vzorků novým PCR systémem

Vzorky Primery	Hodnoty T _m [°C]																			
	2814	3209	3194	3047	2950	2951	2782	2997	2952	2944	2912	3050	2953	3323	2976	3071	3088	3064	2977	2829
kontrola	83,59	83,62	83,72	83,55	83,45	83,49	83,83	83,50	83,57	83,54	83,62	83,65	83,59	83,86	83,64	83,64	83,66	83,56	83,72	83,69
12Ala	80,10	80,29	80,25	80,19	80,24	80,21		77,98 81,03	80,16	79,92		79,58	78,13 82,55	80,33	79,60		79,36	80,07	80,24	80,21
12Asp	79,51	79,72	79,54	79,73	79,58	79,70		79,57	79,95	79,45		79,72		79,69	79,74	80,01	79,99	79,83	79,83	79,89
12Arg	80,24	80,63	79,77	78,98	79,66	80,49	80,69	80,29	83,09	79,99		80,26	78,36		79,20	79,88	79,90	79,51 86,91	80,21	80,23
12Cys	79,82	80,10	80,16	79,61	79,94	79,71	80,16	80,24	79,67	79,53	79,63	79,53	78,64 84,52		79,98	79,92	80,04	79,80		80,01
12Ser	79,69	80,67	79,66	79,45	79,76	79,20		79,61	79,55	79,44	79,22	79,60	78,94		79,58	79,38	79,92	79,54	79,53	79,48
12Val	79,71	80,30	79,94	79,69	79,82	79,54	80,38	79,87	79,78	79,24	79,73	79,83			79,91	79,62	79,99	79,75	79,86	79,81
13Asp	79,46		79,70	79,51	79,10	79,69	80,12	79,77	78,98 84,73	79,79	79,61	79,62	79,73		79,70	79,33	79,75	79,36	79,80	79,69

Volné kolonky odpovídají případům, kdy hodnoty T_m vůbec nebyly naměřeny (žádný amplifikovaný produkt), nebo už byly pod limitem hodnotitelnosti a software je nezaznamenal (T_m ≡ 74°C) což znamená přítomnost primerových dimerů

Tab. L: Hodnoty Ct – výsledky analýzy opakovatelnosti

Opakování Primery	vzorek 3209					vzorek 3194					vzorek 3047					vzorek 2950				
	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
kontrola	27,71	27,53	27,62	27,71	27,06	25,5	25,92	25,82	25,95	25,9	23,75	23,67	23,6	23,77	23,44	24,51	24,69	24,21	24,76	23,88
12Ala	34,83	34,99	36,1	35,32	34,77	32,61	33,54	33,3	32,93	33,53	31,34	31,9	32,05	31,54	31,96	32,81	34,16	33,78	34,15	33,5
12Asp	30,99	31,51	32,17	32,17	32,07	29,13	29,57	29,64	30,79	30,21	27,64	28,24	28,66	28,94	28,8	28,67	29,9	29,91	30,46	29,79
12Arg											40	37,91					38,56	40		37,26
12Cys						40					40	40	40	40	40	36,46	36,52	38,1	40	37,17
12Ser						40	40	40	38,73	40	37,19	40	37,85	37,74	39,08	38,38	40	40	40	40
12Val	40	40	38,43	37,62	40	36,48	39,24	35,74	40	39,08	36,17	36,31	35,89	36,92	36,76	37,03	36,75	38	38,25	38,23
13Asp						34,9	34,69	34,84	38,74	34,82	34,49	35,76	35,44	40	35,73	35,74	36,51	37,33	40	36,49

Tab. M: Hodnoty ΔC_t - analýza opakovatelnosti

Opakování Primery	vzorek 3209					vzorek 3194					vzorek 3047					vzorek 2950				
	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
12Ala	7,12	7,46	8,48	7,61	7,71	7,11	7,62	7,48	6,98	7,63	7,59	8,23	8,45	7,77	8,52	8,3	9,47	9,57	9,39	9,62
12Asp	3,28	3,98	4,55	4,46	5,01	3,63	3,65	3,82	4,84	4,31	3,89	4,57	5,06	5,17	5,36	4,16	5,21	5,7	5,7	5,91
12Arg	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12Cys	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12Ser	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12Val	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
13Asp	---	---	---	---	---	9,4	8,77	9,02	---	8,92	10,74	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Zeleně zvýrazněné hodnoty ΔC_t odpovídají parametrům, podle kterých lze hodnotit jako pozitivní pro danou mutaci

Volné kolonky (---) odpovídají případům, kdy hodnoty C_t vůbec nebyly naměřeny (žádná amplifikace) nebo už byly mimo stanovený limit hodnotitelnosti ($C_t > 35$)

Tab. N: Hodnoty T_m – výsledky analýzy opakovatelnosti

Opakování Primery	vzorek 3209					vzorek 3194					vzorek 3047					vzorek 2950				
	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
kontrola	83,62	83,77	83,71	83,71	83,85	83,72	83,69	83,67	83,63	83,68	83,55	83,75	83,73	83,71	83,87	83,45	83,63	83,7	83,63	83,9
12Ala	80,29	80,25	80,22	80,19	80,31	80,25	80,01	80,05	80,01	79,93	80,19	80,28	80,22	80,27	80,33	80,24	80,12	80,23	80,12	80,35
12Asp	79,72	79,8	79,72	79,69	79,8	79,54	79,28	79,36	79,25	79,32	79,73	79,84	79,75	79,74	79,84	79,58	79,5	79,55	79,3	79,55
12Arg	80,63	79,32	80,04	80,09	80,14	79,77	80,04	79,96	80,1	79,87	78,98	80,45	80,01	79,99	80,09	79,66	80,31	80,39	79,93	---
12Cys	80,1	80,47	80,25	80,18	80,09	80,16	79,7	79,67	79,48	79,63	79,61	79,17	80,11	80,1	80,15	79,94	79,91	79,98	79,64	80,09
12Ser	80,67	80,17	79,88	79,6	80,3	79,66	79,71	79,6	79,4	79,48	79,45	79,68	79,35	79,49	79,66	79,76	79,48	79,81	79,79	79,87
12Val	80,3	80,18	79,85	79,9	80,18	79,94	79,83	79,56	79,77	79,86	79,69	79,75	79,87	79,84	79,94	79,82	79,69	79,89	79,75	80,02
13Asp	---	80,06	79,85	80,09	79,39	79,7	79,75	79,69	79,29	79,67	79,51	79,8	79,7	79,69	79,79	79,1	79,5	79,79	79,45	79,81

Volné kolonky odpovídají případům, kdy hodnoty T_m vůbec nebyly naměřeny (žádný amplifikovaný produkt), nebo už byly pod limitem hodnotitelnosti a software je neznamenal ($T_m \equiv 74^\circ C$) což znamená přítomnost primerových dimerů