

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2015

Bc. Gabriela Gabčová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Detekcia prediktívnych genetických onkomarkerov na
signálnej dráhe EGFR využitím sekvenačných
technológií**

Diplomová práca

Bc. Gabriela Gabčová

Študijný program: Biologie
Študijný obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma štúdia: Prezenčná

Olomouc 2015

Vedúci práce: doc. Mgr. Jiří Drábek, PhD.
Odborný konzultant: Mgr. Jana Stránská, PhD.

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

V Olomouci dňa.....

.....

(podpis)

Práca bola vypracovaná za pomoci grantov: CZ.1.05/3.1.00/14.0307, CZ.1.07/2.3.00/30.0060, CZ.1.07/2.3.00/30.0041, IGA_LF_2015_010, LO1304

Pod'akovanie:

Rada by som poďakovala vedúcemu diplomovej práce doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, PhD. za možnosť vypracovať diplomovú prácu pod jeho vedením, za odborné rady, pripomienky a čas, ktorý venoval tejto práci a za pomoc pri spracovaní teoretickej i praktickej časti práce. Ďalej by som chcela poďakovať Mgr. Jane Stránskej, PhD. a RNDr. Lucii Navrátilovej, ktoré mi pomáhali pri vypracovaní a analýze výsledkov experimentálnej časti práce. Rovnako ďakujem kolektívu ÚMTM, predovšetkým pani Miroslave Rabčanovej a Veronike Holinkovej, DiS. za ich ochotu a pomoc pri vykonávaní laboratórnej práci.

Súhrn

Predložená diplomová práca sa zaoberá štúdiom prediktívnych biomarkerov u kolorektálneho karcinómu a možnosťami detekcie vybraných mutácií génov *RAS*.

Protoonkogén *RAS* je člen MAPK signálnej dráhy a reguluje bunkový rast, diferenciáciu a proliferáciu. Gény *KRAS* a *NRAS* sú často mutované u pacientov s kolorektálnym karcinómom. Pri nasadení cielenej liečby kolorektálneho karcinómu slúžia gény *KRAS* a *NRAS* ako prediktívne biomarkery. Podľa Zásad liečby zhoubných onemocnění cytostatiky a súhrnu charakteristických vlastností liekov je pre nastavenie biologickej liečby kolorektálneho karcinómu nutná znalosť mutačného statusu exónov 2, 3 a 4 génov *NRAS* a *KRAS*. Stanoviť mutačný status je možné prostredníctvom širokého spektra detekčných súprav a techník, pričom novodobé sekvenačné technológie umožňujú rýchle paralelné sekvenovanie produkujúce veľké množstvo dát za nízku cenu.

Experimentálna časť diplomovej práce sa zaoberá návrhom, optimalizáciou a zavedením pyrosekvenačnej analýzy vybraných kodónov génov *KRAS* a *NRAS* na Ústave molekulárnej a translačnej medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Kľúčové slová: *KRAS*, *NRAS*, pyrosekvenácia, prediktívny biomarker

Summary

This diploma thesis summarizes knowledge about predictive biomarkers in colorectal carcinoma, and detection possibilities of selected *RAS* gene mutations.

RAS protooncogene is a member of MAPK signalling pathway and regulates cellular growth, differentiation and proliferation. *KRAS* and *NRAS* genes are often mutated in colorectal carcinoma. *KRAS* and *NRAS* genes serve as predictive biomarkers for prescribing the correct medication for colorectal cancer. Following the Principles of treatment of malignant diseases with cytostatics and summary of drug characteristics, the knowledge of *KRAS* and *NRAS* mutational status in exons 2, 3 and 4 is necessary for biological treatment prescription. Mutational status can be diagnosed using wide spectrum of detection techniques, along with new sequencing technologies, which allow rapid parallel sequencing and production of quantity data for low price.

Experimental part of diploma thesis focuses on design, optimalization, and implementation of pyrosequencing technology for selected *KRAS* and *NRAS* codons in the Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University.

Key words: *KRAS*, *NRAS*, pyrosequencing, predictive biomarker

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Ciele práce.....	9
3. Súčasný stav riešenej problematiky.....	10
3.1 Signálna dráha EGFR v onkogenézii	10
3.2 Liečba kolorektálneho karcinómu	11
3.2.1 Cielená biologická liečba	13
3.3 Prediktívne biomarkery	15
3.3.1 Rodina génov <i>RAS</i>	15
3.4 Metódy používané k detekcii mutácií génov <i>KRAS</i> a <i>NRAS</i>	18
3.4.1 High resolution melting (HRM).....	18
3.4.2 theascreen® RGQ	19
3.4.3 cobas®.....	20
3.4.4 KRAS StripAssay®, NRAS StripAssay®	20
3.4.5 Infiniti® KRAS-BRAF Assay.....	20
3.4.6 LightMix® Kit KRAS-NRAS.....	21
3.4.7 Sangerovo sekvenovanie	23
3.4.8 Pyrosekvenovanie.....	24
3.4.9 NGS.....	26
4. Materiál.....	34
4.1 Prístroje a pomôcky.....	34
4.2 Software a programy	35
4.3 Spotrebný materiál	35
4.4 Chemikálie a reagenty	35
4.4.1 Chemikálie a reagenty pre PCR.....	35
4.4.2 Chemikálie a reagenty pre pyrosekvenovanie	36
4.5 Biologické vzorky	37
5. Metódy.....	38
5.1 Návrh primerov pre PCR amplifikáciu	38
5.2 Príprava PCR mixu.....	40
5.2.1 Príprava PCR master mixu pomocou PyroMark PCR Kitu	40
5.2.2 Príprava PCR master mixu pomocou HotStartTaq <i>Plus</i> Master Mix Kitu.....	41
5.2.3 Príprava PCR master mixu Thermo Scientific	42

5.2.4	Príprava PCR mixu pre porovnanie účinku Coral Load a Q roztoku	43
5.3	Nastavenie PCR programu LC 480	44
5.4	Optimalizácia pyrosekvenačnej analýzy	45
5.4.1	Imobilizácia PCR produktov na guľičky Streptavidin Sepharose® High Performance	45
5.4.2	Príprava vzoriek pred pyrosekvenačnou analýzou	46
6.	Výsledky	47
6.1	Amplifikácia DNA pomocou HotStartTaq <i>Plus</i> Master Mix Kitu a Thermo Scientific master mixu	47
6.2	Amplifikácia DNA pomocou HotStartTaq <i>Plus</i> Master Mix Kitu a PyroMark PCR Kitu ..	48
6.3	Porovnanie vplyvu rozdielnej koncentrácie MgCl ₂ na amplifikáciu DNA	50
6.4	Optimalizácia pyrosekvenačných analýz	51
6.4.1	Nastavenie dispensation order	51
6.4.2	Vplyv objemu amplikonu na pyrosekvenačnú analýzu	55
6.4.3	Stanovenie citlivosti pyrosekvenačnej analýzy	55
6.5	Diagnostika mutácií patientskych vzorkov	60
7.	Diskusia	63
8.	Záver	69
9.	Použitá literatúra	70
10.	Zoznam použitých skratiek a symbolov	78
11.	Prílohy	81

1. Úvod

Pod pojmom prediktívny biomarker (onkomarker) označujeme gén alebo proteín, ktorý predpovedá odpoveď na zvolenú liečebnú terapiu. V súčasnosti sa o prediktívnych biomarkeroch hovorí predovšetkým v spojitosti s rozvíjajúcimi sa možnosťami personalizovanej medicíny. Pri nastavení správnej personalizovanej liečby je u vybraných ochorení nutná znalosť mutačného statusu konkrétnych génov.

RAS kódujú malé GTPázové proteíny, regulujúce MAPK a PI3K signálnu dráhu. Mutáciami *RAS* génov vznikajú onkoproteíny, ktoré v hyperaktivovanom stave regulujú bunkovú proliferáciu, diferenciáciu atď. Mutácie génov *RAS* boli identifikované v širokom spektre rakovín, ako napr. pri rakovine kolorekta, štítnej žľazy, močového mechúra, či kože.

U pacientov s kolorektálnym karcinómom je pre voľbu liečebného postupu potrebná znalosť mutačného statusu génov *RAS*. Zásady liečby zhoubných onemocnení cytostatiky a súhrn charakteristických vlastností liekov (SPC) udávajú potrebu poznať mutačný status génov *KRAS* a *NRAS* pred nastavením liečebnej terapie panitumumabom a cetuximabom. Mutácie *KRAS* a *NRAS* je nutné identifikovať u oboch génov v oblastiach exónu 2 (kodón 12 a 13), exónu 3 (kodón 59 a 61), a exónu 4 (kodón 117 a 146).

V súčasnosti je dostupné široké spektrum mutačných testov detekujúcich špecifické mutácie *KRAS* a *NRAS*. Často využívané sú detekčné súpravy, označené CE-IVD značkou, založené na PCR metóde. Tieto metódy sú však často limitované neschopnosťou identifikovať všetky možné mutácie, prípadne konkrétny typ mutácie analyzovaného génu. So súčasným rozvojom sekvenačných metód a ich zvyšujúcou sa dostupnosťou laboratóriám je možné využiť i sekvenačné technológie, ktoré identifikujú konkrétne poradie nukleotidov v testovanej sekvencii DNA.

2. Ciele práce

Cieľom teoretickej časti diplomovej práce bolo spracovať informácie o génoch *KRAS* a *NRAS* a ich význame v liečbe kolorektálneho karcinómu. Časť teoretickej práce sa zároveň venuje i možnostiam detekcie mutácií vybraných génov so zameraním na využívané komerčne dostupné kity, založené na identifikácii mutácií pomocou PCR techniky, rovnako ako aj sekvenačné techniky, so zameraním na Sangerovo sekvenovanie, pyrosekvenovanie a sekvenovanie novej generácie.

Cieľom praktickej časti diplomovej práce bolo zavedenie pyrosekvenačnej analýzy v DNA laboratóriu na Ústave molekulárnej a translačnej medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Súčasťou experimentálnej časti bol design primerov pre PCR reakciu, optimalizácia PCR podmienok, návrh a optimalizácia pyrosekvenačných analýz a identifikácia mutácií *KRAS* a *NRAS* v patientských vzorkách prostredníctvom pyrosekvenačnej analýzy. Analyzované boli mutácie génov *KRAS* a *NRAS*:

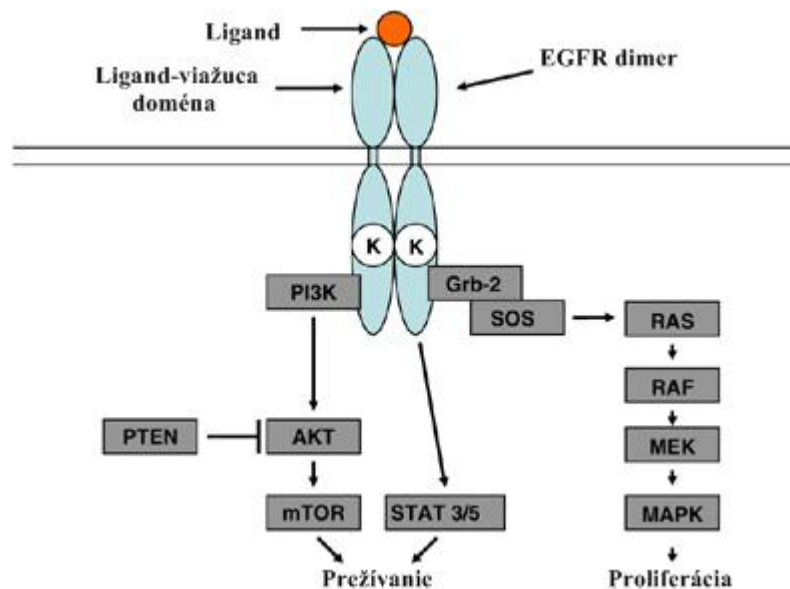
- *KRAS* exón 2 (kodóny 12 a 13)
- *KRAS* exón 3 (kodóny 59 a 61)
- *KRAS* exón 4 (kodóny 117 a 146)
- *NRAS* exón 2 (kodóny 12 a 13)
- *NRAS* exón 3 (kodóny 59 a 61)
- *NRAS* exón 4 (kodóny 117 a 146)

3. Súčasný stav riešenej problematiky

3.1 Signálna dráha EGFR v onkogenézii

Jednou z dráh regulujúcich bunkový rast, diferenciáciu a proliferáciu je signálna dráha EGFR. Signál je na jednotlivých členov signálnej dráhy prenášaný kaskádovito fosforyláciou. Signálna dráha je aktivovaná naviazaním ligandu na receptor lokalizovaný na vonkajšom povrchu plazmatickej membrány. Ligandom môže byť EGF, TGF α , amfiredulin, betacellulin ai. (Linggi a kol., 2006). Mutácie členov EGFR signálnej dráhy spôsobujú kvalitatívne alebo kvantitatívne zmeny génovej expresie, následkom čoho môže v organizme dochádzať ku kancerogénzii.

Medzi najlepšie preštudované dráhy EGFR patrí dráha MAPK (mitogénom-aktivovaná proteinkináza) a PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza) (viz Obr. 1).



Obr. 1: Schéma signálnej dráhy EGFR (upravené podľa Ladanyi a kol., 2008)

EGF (epidermálny rastový faktor) svojou väzbou na receptor EGFR aktivuje daný transmembránový proteín. EGFR obsahuje extracelulárnu receptorovú časť, transmembránovú hydrofóbnu doménu a cytoplazmatickú doménu s Tyr-kinázovou aktivitou. Väzbou EGF na receptor dochádza ku zmene konformácie a odkrytiu dimerizačnej domény. Po dimerizácii receptoru sa následne priblížia intracelulárne časti EGFR s kinázovou doménou a dochádza k autofosforylácii Tyr. Ako následok fosforylácie sa na EGFR naviažu substrátové proteíny GRB2 a SOS. GRB2 sa na receptor viaže prostredníctvom SH2 domény, pričom SOS následne viaže svojou SH3 doménou. Po väzbe SOS na GRB2 sa proteíny RAS

aktivujú konverziou z inaktívneho (GDP) stavu na aktívny (GTP) stav. Aktivovaný RAS prenáša signál na proteín Raf (MAPKKK), z ktorého sa signálnou kaskádou prenáša signál na ďalších členov MAPK signálnej dráhy, MEK (MAPKK) a ERK (MAPK). Aktivované ERK je transportované do bunkového jadra, kde väzbou na transkripčné faktory reguluje bunkovú proliferáciu, diferenciáciu, tumorigenézu atď. Po aktivácii je RAS proteín inaktivovaný hydrolýzou GTP na GDP prostredníctvom GAP proteínov (GTPase activating protein). V tumorových bunkách dochádza v spojitosti s mutáciami RAS génov ku konštitutívnej hyperfosforylácii danej dráhy.

Aktivovaný RAS sa okrem aktivácie Raf podieľa i na fosforylácii PI3K signálnej dráhy. Lipidová kináza PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza) aktivuje na membránu naviazaný proteín fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2), ktorý pôsobí na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP3). PIP3 pôsobí ako druhý posol aktivuje PIP3-dependentnú kinázu-1 (PDK1) a proteinkinázu B (PBK/Akt). PDK1 aktivuje Akt kinázu, ktorá prostredníctvom NF- κ B aktiváciou transkripčných faktorov, ako sú AP-1, E2F a Myc, reguluje génovú expresiu (Cox a kol., 2002).

3.2 Liečba kolorektálneho karcinómu

Kolorektálny karcinóm (CRC) je zhubné nádorové ochorenie postihujúce hrubé črevo (kolón) a konečník (rektum).

Podľa dát GLOBOCAN (Ferlay a kol., 2012) dosiahla svetová incidencia CRC v roku 2012 počet 1 360 602 prípadov. Jedná sa o tretí najčastejšie sa vyskytujúci zhubný nádor, spôsobujúci 693 881 úmrtí v roku 2012. V Európe v rovnakom roku dosiahla incidencia CRC 447 136 prípadov a mortalita 214 814 (Ferlay a kol., 2012).

Česká republika patrí medzi krajiny s najvyšším množstvom pacientov trpiacich CRC. Ročne je v Českej republike identifikovaných približne 8000 nových prípadov CRC (Dušek a kol., 2014). V incidencii kolorektálneho karcinómu u mužov stojí Česká republika na treťom mieste pomyselného európskeho rebríčka (Ferlay a kol., 2012).

CRC je možné diagnostikovať i v bezpríznakovom štádiu počas skreeningového vyšetrenia. Od 1. januára 2014 sa v Českej republike spustil projekt adresného pozývania občanov (mužov i žien vo veku 50 – 70 rokov) ku skreeningu karcinómu kolorekta. Projekt má, okrem iného, za cieľ zvýšiť množstvo úspešne identifikovaných pacientov, zlepšiť kvalitu

skreeningu, aktualizáciu epidemiologických dát a zvýšiť informovanosť širokej verejnosti o danej problematike (Dušek a kol., 2014).

Kolorektálny karcinóm je v prípade skorej diagnostiky dobre liečiteľné ochorenie s vysokou šancou na vyliečenie. Liečba CRC závisí od mnohých faktorov, vrátane umiestnenia a veľkosti nádoru, prítomnosti a typu metastáz, zdravotného stavu pacienta atď. Medzi základné postupy liečby CRC patrí jeho chirurgické odstránenie, rádioterapia a chemoterapia. V súčasnosti sa ako súčasť liečby CRC využíva i cieľená liečba, špecificky namierená proti molekulárnym dráham podieľajúcim sa na kancerogenézi. Podľa Zásad liečby zhoubných onemocnění cytostatiky (tzv. Modrej knihy Českej onkologickej spoločnosti) stanovujúcej liečebný postup nádorových ochorení, a súhrnu charakteristických vlastností liekov (SPC), je pre nastavenie liečby kolorektálneho karcinómu pomocou liečiv panitumumab a cetuximab nutná znalosť mutačného statusu exónov 2, 3 a 4 génov *RAS* (*KRAS* a *NRAS*) (Vyzula a kol., 2014).

Na základe štádia progresie ochorenia sa pacienti trpiaci zhubným novotvarom kolorekta radia do 4 skupín s charakteristickým postupom liečby (Vyzula a kol., 2014):

- Štádium 0

Pacienti identifikovaní v tomto štádiu sú liečení chirurgickým odstránením lézie a polypov, bez indikácie chemoterapie.

- Štádium I

U pacientov štádia I kolorektálneho karcinómu dochádza k širokej excízii ložísk a následnej anastomóze (vzájomnom prepojení ciev), bez liečby chemoterapiou.

- Štádium II

Pri liečbe štádia II kolorektálneho karcinómu je okrem širokej excízie a anastomózy nasadená i adjuvantná (po chirurgickom odobraní ložiska), prípadne neoadjuvantná (pred chirurgickým zákrokom) chemoterapia.

- Štádium III

Liečba III. štádia zahŕňa širokú chirurgickú excíziu, anastomózu a adjuvantnú, prípadne neoadjuvantnú chemoterapiu.

- Štádium IV

Liečba IV. štádia kolorektálneho karcinómu klasifikuje pacientov s pokročilým stupňom ochorenia, vytvorenými metastázami a inoperabilnými ochoreniami. Pred nasadením správneho liečebného procesu je nutné poznať mutačný status členov *RAS* rodiny. Spoločnosť českých patológov a ČOS stanovila požiadavku na identifikáciu *RAS* mutačného statusu referenčným laboratóriám u pacientov III. a IV. štádia pred nasadením liečby. U zvyšných štádií sa *RAS* mutačný status vyšetruje na žiadosť onkológa. Medzi najčastejšie nasadzované chemoterapeutiká patria kombinácie FOLFOX (leukovorin, oxaliplatin, 5-FU) a FOLFIRI (leukovorin, irinotekan, 5-FU).

V prípade liečby 1. línie sa nasadzuje monoterapia alebo kombinovaná liečba s využitím 5-FU, irinotekanu, kapecitabínu, oxaliplatinu a biologickej liečby. Úspešnosť liečby sa hodnotí po 2 – 3 mesiacoch. Liečba 2. línie je posudzovaná individuálne s následným prešetrením po 2 – 3 mesiacoch (Vyzula a kol., 2014).

3.2.1 Cielená biologická liečba

V Českej republike sa podľa Modrej knihy Českej onkologickej spoločnosti v rámci biologickej liečby kolorektálneho karcinómu v súčasnosti využíva bevacizumab, cetuximab, panitumumab a aflibercept. U pacientov, ktorí už boli liečení chemoterapeuticky s látkami cieleňmi na anti-EGFR/VEGF, sa ako monoterapeutická liečba môže nasadzovať i regorafenib.

3.2.1.1 Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin) je monoklonálna humanizovaná protilátka produkovaná z bunkovej línie derivovanej z buniek vaječníka čínskeho škrečka *Cricetulus griseus* (tzv. CHO bunky). Slúži ako inhibítor angiogenézy, inhibuje aktivitu vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru. Indikácia liečiva doposiaľ nie je viazaná na identifikované molekulárne biomarkery. Bevacizumab bol schválený FDA v roku 2004 a okrem iného sa nasadzuje pri liečbe metastázujúceho kolorektálneho karcinómu v kombinácii s chemoterapeutickou liečbou 5-FU. Medzi možné vedľajšie účinky liečby patrí hypertenzia a arteriálna a žilná tromboembólia (Vyzula a kol., 2014).

3.2.1.2 Cetuximab

Cetuximab (Erbix) je monoklonálna chimérická protilátka IgG1, inhibujúca EGFR. Liečivo bolo schválené v roku 2003 FDA a nasadzuje sa okrem iného pri liečbe metastázujúceho kolorektálneho karcinómu exprimujúceho *EGFR* a *RAS* štandardného typu (Vyzula a kol., 2014). Cetuximab sa využíva v liečbe prvej línie v kombinácii s FOLFOX, FOLFIRI, druhej línie s chemoterapiou založenou na irinotekane, prípadne ako monoterapia v prípade zlyhania liečby irinotekanom a ďalších líniach ako monoterapia. Medzi najčastejšie uvádzané vedľajšie účinky liečby patria kožné reakcie, suchá koža, zvýšené riziko anafylaktoidnej reakcie. Liečebným účinkom cetuximabu sa zaoberali klinické štúdie FIRE-3 a OPUS (prvá línia liečby), CRYSTAL (prvá a druhá línia liečby), ASPECCT (monoterapia cetuximabom) ai. (Vyzula a kol., 2014). Bokemeyer a kol., (2014) porovnávali účinnosť liečby cetuximabom v kombinácii s FOLFOX4 verzus liečbu FOLFOX4 bez nasadenia cetuximabu u pacientov bez mutácie *KRAS* (exón 2). Odpoveď pacientov na liečbu cetuximabom s FOLFOX4 dosahovala 57,9 %, u pacientov liečených FOLFOX4 odpovedalo na liečbu 28,6 %. U pacientov s mutáciou *KRAS* odpovedalo na liečbu cetuximabu s FOLFOX4 37 %, pričom na liečbu bez cetuximabu reagovalo 50,7 % pacientov. Klinická štúdia CRYSTAL (Cutsem a kol., 2007) uvádza u pacientov liečených cetuximabom s FOLFIRI zníženie rizika progresie tumoru CRC o 15 % v porovnaní s pacientmi liečenými samotným FOLFIRI.

3.2.1.3 Panitumumab

Panitumumab (Vectibix) je monoklonálna humánna anti-EGFR IgG2 protilátka, schválená FDA v roku 2006 (Vyzula a kol., 2014). Jednou z aplikácií panitumumabu je liečba metastázujúceho kolorektálneho karcinómu s *RAS* štandardného typu, v 1. línii v kombinácii s FOLFOX, 2. línii s FOLFIRI, a ako monoterapia po zlyhaní chemoterapie na bázi 5-FU, oxaliplatiny a irinotekanu. Možné vedľajšie účinky liečby zahŕňajú mimo iné kožné reakcie, únavu, dehydratáciu a hypokalcémiu (Vyzula a kol., 2014). Malik a kol. (2005) uvádzajú kožné reakcie ako vedľajšiu odpoveď monoterapie panitumumabom u 95 % liečených pacientov. Jedny z klinických štúdií, ktoré sa zaoberali liečebným účinkom panitumumabu sa v prvej línii liečby sú PRIME a PEAK, druhú líniu liečby popisuje štúdia 20050181, a účinky monoterapie panitumumabom uvádza štúdia ASPECCT (Vyzula a kol., 2014). Štúdia Douillard a kol., (2013) porovnáva prežitie pacientov bez progresie tumoru (progression-free survival, PFS) pri nasadení panitumumabu spoločne s FOLFOX4. U pacientov s mutáciou

RAS bolo zaznamenané PFS 7,3 mesiacov, v porovnaní s pacientmi bez *RAS* mutácie, u ktorých bolo PFS 10,1 mesiacov. Douillard a kol., (2013) zároveň sledovali celkové prežitie (overall survival, OS) pacientov liečených panitumumabom a FOLFOX4, pričom pacienti bez *RAS* mutácie mali celkové prežitie 26 mesiacov. Celkové prežitie u pacientov s *RAS* mutáciou bolo pri rovnakej liečbe 15,6 mesiacov.

3.2.1.4 Aflibercept

Aflibercept (Zaltrap) je rekombinantný fúzny glykoproteín produkovaný CHO blokujúci aktiváciu VEGF receptorov a proliferáciu endoteliálnych buniek. Bol schválený FDA v roku 2012 a v súčasnosti je predpisovaný pri liečbe kolorektálneho karcinómu s chemoterapiou FOLFIRI u pacientov s rezistenciou, prípadne progresiou na oxaliplatinu. Medzi nežiadúce účinky afliberceptu patrí zhoršené hojenie rán, hypertenzia a gastrointestinálna perforácia (Vyzula a kol., 2014).

3.2.1.5 Regorafenib

Regorafenib (Stivarga) je multikinázový inhibítor, schválený FDA v roku 2012, ktorý je využívaný predovšetkým v liečbe kolorektálneho karcinómu u pacientov po neúspešnej chemoterapeutickej liečbe s 5-FU, a anti-VEGF, anti-EGFR liečbe. Predikcia regorafenibu nie je v súčasnosti viazaná na detekciu biologického markeru. Možnými vedľajšími účinkami liečby je únava, hypertenzia, kožná reakcia ruka-noha ai (Vyzula a kol., 2012).

3.3 Prediktívne biomarkery

Pojmom prediktívny biomarker označujeme „ukazovateľ“ pre cielenú liečbu, napomáhajúci zvoleniu vhodnej liečebnej terapie. Štúdium a diagnostika prediktívnych biomarkerov, umožňujúcich cielenú liečbu ochorení, je jedným zo základov personalizovanej medicíny. Medzi často študované prediktívne biomarkery patria gény nachádzajúce sa v rodine *RAS* génov. V Českej republike je pre nastavenie liečebného postupu CRC povinná detekcia *RAS* mutačného stavu (Vyzula a kol., 2014). V prípade mutácie génov *RAS* dochádza ku konštitutívnej aktivácii EGFR signálnej dráhy i bez aktivovaného EGFR, proti ktorému sú prepisované tzv. anti-EGFR mAb (cetuximab a panitumumab).

3.3.1 Rodina génov *RAS*

V *RAS* nadrodine malých proteínov s GTPázovou aktivitou sa nachádza približne 150 členov identifikovaných v ľudskom organizme. Na základe funkcie a sekvencie jednotlivých členov je daná nadrodina rozdeľovaná do piatich hlavných vetiev: *RAS*, *RHO*, *RAB*, *RAN*

a ARF (Wennerberg a kol, 2005). Jedny z najlepšie preštudovaných onkoproteínov RAS nadrodiny, i v súvislosti s ich postavením prediktívnych biomarkerov, sú RAS (Rat sarcoma) onkoproteíny, zohrávajúce úlohu v regulácii bunkovej signalizácie, proliferácie, diferenciácie a v bunkovom prežívaní. Gény, ktoré kódujú dané onkoproteíny, tvoria rodinu RAS génov.

V ľudských typoch rakovín medzi najčastejšie sa vyskytujúce onkogény patria tri RAS gény. Prvé dva RAS gény, pomenované ako KRAS (Kirsten sarcoma virus) a HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog), boli v ľudskom genóme objavené v roku 1982 (Chang a kol., 1982). Gén NRAS (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) bol v ľudskom genóme identifikovaný v roku 1983 (Hall a kol., 1983). Približne 99 % všetkých mutácií génov RAS sú substitúcie so zmenou zmyslu (COSMIC, 2014).

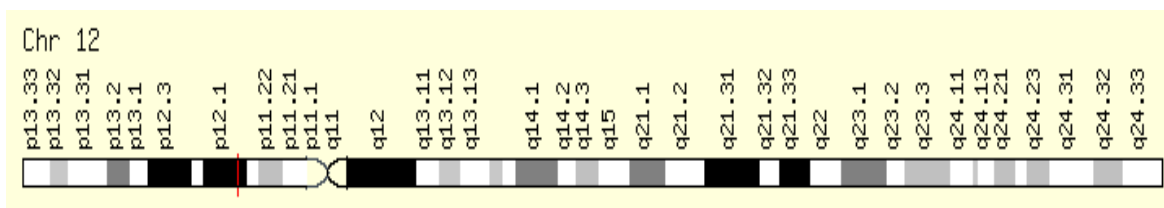
RAS proteíny, syntetizované v cytosole, sú lokalizované na vnútornej strane plazmatickej membrány a prechádzajú posttranslačnými modifikáciami, predovšetkým v oblasti C-terminálneho konca. S výnimkou C-terminálneho konca je štruktúra všetkých proteínov, patriacich do rodiny RAS, charakteristická vysokou homológiou. RAS proteíny obsahujú na aminokyselinovej pozícii 186 – 189 C-terminálneho konca tzv. CAAX motív, pričom symbol C označuje aminokyselinu cystein, A označuje alifatické aminokyseliny, a X označuje akúkoľvek aminokyselinu (Macalusco a kol., 2002). CAAX motív je rozpoznávaný farnezyltransferázou, geranylgeranyltransferázou I, palmitoylázou ai., ktoré modifikáciou proteínu umožňujú jeho asociáciu s plazmatickou membránou. U izoformy KRAS 4A dochádza pomocou palmitoyltransferázy k modifikácii a následnému uchyteniu danej izoformy na plazmatickú membránu bunky. Palmitoylácia nie je typická pre izoformu KRAS 4B, u ktorej dochádza k lokalizácii na plazmatickú membránu pomocou systému mikrotubulov (Hancock a kol., 1989, Thissen a kol., 1997). Modifikácia štruktúry RAS proteínov a väzba špecifických efektorov reguluje EGFR signálnu dráhu.

3.3.1.1 Gén KRAS

Gén Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, skrátene značený ako KRAS, je lokalizovaný na krátkom ramienku chromozómu 12, na pozícii 12p12.1 (viz Obr. 2). KRAS gén, dlhý 52 675 bp, je tvorený 6 exónmi (NCBI, 2014a).

Gén KRAS kóduje 188 aminokyselín veľký KRAS proteín o veľkosti približne 21 kDa (McGrath a kol., 1983). Alternatívnym zostrihom vznikajú z génu KRAS dve izoformy mRNA, označované ako KRAS 4A a KRAS 4B, líšiac sa C-terminálnym koncom. Dĺžka

mRNA izoformy A génu *KRAS* je 5889 bp. Mediátorová RNA izoformy B je dlhá 5765 bp. Izoforma *KRAS* 4B sa v ľudských bunkách vyskytuje vo vyššej miere než izoforma *KRAS* 4A (Pells a kol., 1997).

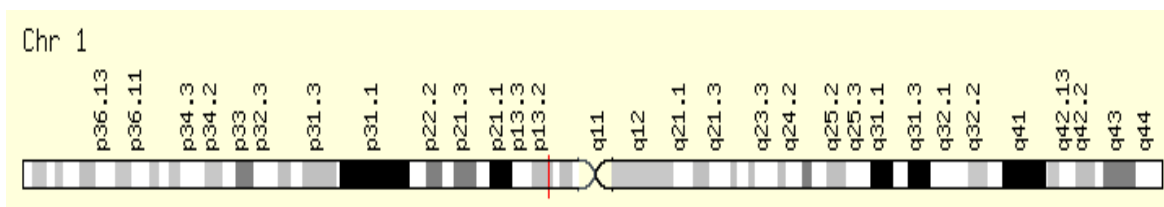


Obr. 2: Lokalizácia génu *KRAS* génu na chromozóme 12, označená červenou čiarou (GeneCards, 2014a)

Napriek rozdielom medzi mutáciami jednotlivých nádorov, miesta s najväčšou frekvenciou mutácií génu *KRAS* sa vyskytujú na kodónoch 12, 13 (exón 2) a v okolí kodónu 61 (exón 3), nasledované kodónmi 117 (exón 4) a 146 (exón 4). V kodóne 12 (Gly) bolo zaznamenaných až 86 % všetkých prípadov. V kodóne 13 (Gly) bolo detekovaných približne 13 % všetkých mutácií. Kodón 61 (Glu) a 146 (Ala) nesie približne 1 % mutácií (Medrare a kol., 2011). V ľudskom genóme sa mutácie génu *KRAS* vyskytujú približne v 22 % rakovín (Prior a kol., 2012). Onkogénna mutácia génu *KRAS* sa vyskytuje predovšetkým v pankreatických adenokarcinómoch, karcinómoch kolorekta a pľúc, pričom sa objavuje najmä v skorých štádiách rakoviny. Mutácie génu *KRAS* sa vyskytujú i u pacientov trpiacich Noonanovým či Costellovým syndrómom (Medrare a kol., 2011).

3.3.1.2 Gén *NRAS*

Ľudská varianta génu Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog, označovaného ako *NRAS* sa nachádza na krátkom ramienku chromozómu 1. Pozícia je označovaná ako 1p13.2 (viz Obr. 3) a gén obsahuje 7 exónov. Dĺžka génu *NRAS* je 19 438 bp (NCBI, 2014b).



Obr. 3: Lokalizácia génu *NRAS* na chromozóme 1, označená červenou čiarou (GeneCards, 2014b)

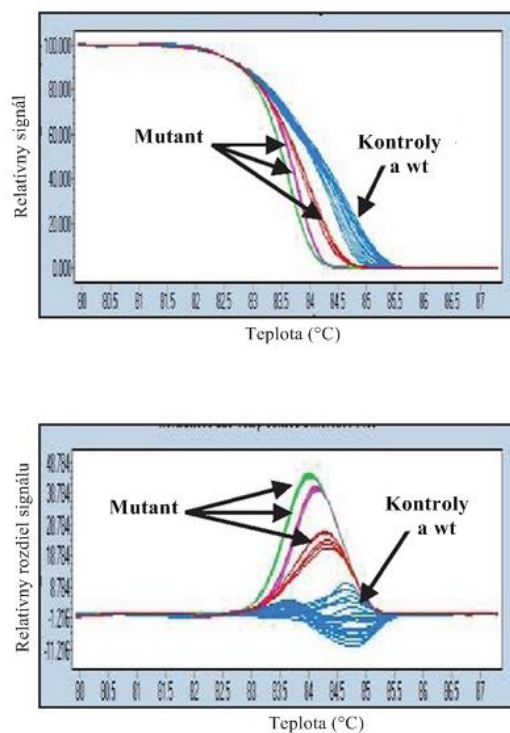
Frekvencia onkogénnych mutácií génu *NRAS* je približne 8 % (Prior a kol., 2012). Najviac mutácií (približne 60 %) sa nachádza v kodóne 61 (Gln), nasledované kodónmi 12 (Gly – 24,4 %) a 13 (Gly – 12,7 %) Mutácie génu *NRAS* sa vyskytujú predovšetkým u hematopoetických tumorov a malígnych melanómov (Medrara a kol., 2011). Mimo rakovinových ochorení sa mutovaná forma génu *NRAS* vyskytuje u pacientov trpiacich Noonanovým syndrómom a autoimúnnym lymfoproliferatívnym syndrómom.

3.4 Metódy používané k detekcii mutácií génov *KRAS* a *NRAS*

Na detekciu mutácií génov *KRAS* a *NRAS* je možné využiť široké spektrum detekčných súprav. Súpravy sa okrem mechanizmu pôsobenia líšia i v množstve a type detekovaných *KRAS* a *NRAS* mutácií, citlivosti či špecificite. Všetky súpravy majú zároveň rozdielne nároky na kvalitu a kvantitu analyzovanej DNA a prítomnosť tumorových buniek

3.4.1 High resolution melting (HRM)

Pri detekcii mutácií HRM metódou dochádza ku post-PCR analýze ampliconov. Pri zahriatí DNA sa oddeľujú jednoreťazcové vlákna, pričom celý proces je monitorovaný saturovaným fluorescenčným farbivom viažucim sa na dsDNA. Analýza prebieha v reálnom čase a zachytáva akékoľvek variácie v sekvencii DNA podľa teplotného profilu topenia amplifikovaného produktu. Na základe rozdielnej krivky topenia sa porovnáva mutovaná a štandardná (wildtype, wt) DNA (Malapelle a kol., 2014) (viz Obr. 4). HRM umožňuje lacnú a rýchlu analýzu DNA, pričom zachytí vzorky s 10 % mutácie (Tsiatis a kol., 2010). Výsledok HRM je však potrebné overiť i inou metódou, pretože abnormálnu krivku topenia spôsobuje akákoľvek zmena v štruktúre DNA, a metóda má teda tendenciu tvoriť falošne pozitívne výsledky. Interpretácia HRM profilu navyše neumožňuje identifikáciu špecifických miest mutácie v DNA.



Obr. 4: Ukážka HRM analýzy znázorňujúca analýzu krivky topenia a HRM teplotný profil pred a po normalizácii fluorescenčného signálu (upravené podľa Liu a kol., 2014)

3.4.2 theascreen® RGQ

CE-IVD značená detekčná súprava theascreen® umožňuje analýzu siedmich mutácií génu *KRAS* v kodónoch 12 a 13 (viz Tabuľka 1) (Bolton a kol., 2015). Detekcia mutácií kombinuje ARMS (Amplification-Refractory Mutation System) a Scorpion techniky. Pomocou špecifických ARMS primerov je *Taq* DNA polymerázou, rozpoznávajúcou zhodu, resp. nezhodu na 3' konci primeru, selektívne amplifikovaná mutovaná sekvencia. Amplifikácia DNA je detekovaná bifunkčnými Scorpion molekulami obsahujúcimi kovalentne naviazaný primer ku próbe. Po hybridizácii próby ku ampliconu, sa zo Scorpion molekuly oddelí zhášač fluorescenčného signálu od fluoroforu (FAMTM), a následkom ich separácie sa zvýši fluorescenčný signál. theascreen® porovnáva amplifikáciu mutovanej DNA a štandardnej (wild-type) DNA pomocou C_p hodnoty, pričom výsledný status je určený na základe rozdielu ich C_p (ΔC_p). C_p (crossing point) udáva bod, resp. cyklus v ktorom dochádza k prekonaniu minimálnej hraničnej hodnoty fluorescence, a dostatočnému nahromadeniu ampliconov, ktoré sú detekovateľné od fluorescenčného pozadia. Software hodnotí vzorky s hodnotou ΔC_p v rozmedzí 21,92 – 32,0, pričom ako pozitívne vyhodnotí vzorky s hodnotou ΔC_p menšou alebo rovnou hraničnej, tzv. cut-off hodnote (theascreen®

KRAS RGQ PCR Kit Handbook, 2012). Súprava zachytí približne 1 až 5 % mutácií, v závislosti na testovanej mutácii a kvalite DNA (Kotoula a kol., 2009; Malapelle a kol., 2014).

3.4.3 cobas®

CE-IVD značený cobas® KRAS mutačný test firmy Roche umožňuje rýchlu detekciu 19 mutácií génu *KRAS* v kodónoch 12, 13 a 61 (viz Tabuľka 1). cobas® test detekuje mutácie v DNA izolovanej z FFPE tkanív pomocou tzv. Taq-Melt real-time PCR. PCR prebieha pomocou páru primerov a dvoch fluorescenčne značených oligonukleotidových sond. Jedna sonda detekujúca mutáciu génu stanovuje oblasť o veľkosti 85 bp (mutácie *KRAS* kodónov 12 a 13), a druhá detekuje 75 bp veľký úsek *KRAS* génu kodónu 61. Prítomnosť mutácie je stanovená pomocou analýzy krivky topenia, v programe s cyklicky sa zvyšujúcou a klesajúcou teplotou. Sonda pre wt vzorku sa viaže pri nízkej teplote na wt i mutovanú sekvenciu. Pri postupnom zvyšovaní teploty sa sonda uvoľňuje od amplikonu, čo sa prejaví poklesom fluorescenčného signálu. Amplikony presne naviazané so sondou pre wt oblasť sa topia pri vyššej teplote, než u oblasti s mutáciami. Pri každom zvýšení teploty sa stanoví fluorescenčný signál a teplota topenia. cobas® umožňuje rýchlu detekciu do 8 hod. Limit detekcie cobas® je približne 5 % (Gonzales deCastro a kol., 2012, Lee a kol., 2012).

3.4.4 KRAS StripAssay®, NRAS StripAssay®

KRAS StripAssay®, NRAS StripAssay® (ViennaLab) sú metódy označené CE-IVD značkou a umožňujú detekciu mutácií génu *KRAS* v kodónoch 12, 13, 61 a mutácie *NRAS* v kodónoch 12, 13 a 61 (viz Tabuľka 1) (StripAssay® Evaluator, 2013a; StripAssay® Evaluator, 2013b). Analyzovaná DNA je amplifikovaná tzv. mutant-enriched PCR a následne hybridizovaná na nitrocelulóзовé stripy so špecifickými próbmami, ktoré sú imobilizované v paralelných líniach. Sekvencie naviazané s farebnými próbmami sú vizualizované skenerom a príslušným softwarom. Citlivosť metódy je 1 %. Analýza prebieha do 6 hod (s výnimkou izolácie DNA) (Malapelle a kol., 2014).

3.4.5 Infiniti® KRAS-BRAF Assay

Infiniti® KRAS-BRAF Assay (AutoGenomics) je CE-IVD značený kit, umožňujúci detekciu mutácií génu *KRAS* v kodóne 12 (7 mutácií), 13 (6 mutácií), 61 (7 mutácií) a v géne *BRAF* 5 mutácií (viz Tabuľka 1) (Infiniti® KRAS-BRAF Assay, 2013). Detekcia je založená na multiplexnej PCR amplifikácii a značení amplikonov fluorescenčnou značkou pomocou

predlžovania primerov, tzv. ASPE (Analyte Specific Primer Extension). ASPE primery sú hybridizované na Biofilm Chip Microarray, ktorá obsahuje polyesterom obalené guľičky. Na jednu microarray pripadá jedna vzorka, ktorá je následne premytá od zostatkového substrátu a skenovaná Infiniti analyzér. Jeden zásobník obsahuje 12 microarrayí. 48 vzoriek je analyzovaných za približne 5,5 hod. (Altamari a kol., 2013; Infiniti® KRAS-BRAF Assay, 2013). Detekčný limit Infiniti® technológie je 10 % (French a kol., 2011).

3.4.6 LightMix® Kit KRAS-NRAS

LightMix® Kit KRAS-NRAS je CE-IVD detekčná súprava umožňujúca *in vitro* detekciu mutácií v génoch *KRAS* a *NRAS* (viz Tabuľka 1) (LightMix Kit KRAS-NRAS, 2013). Pomocou primerov je amplifikovaných 6 rozdielnych PCR produktov, ktoré sa líšia vo svojej veľkosti. Amplifikácia wt DNA je redukovaná pomocou tzv. uzamknutej LNA (Locked-Nucleic Acid competitor). Po hybridizácii PCR produktov s próbami je následne porovnaný pík kriviek topenia, ktorý sa zobrazí iba v prípade amplifikácie mutovanej DNA. Píky s veľkosťou o 20 % menšou než píky kontroly značia mutáciu, pričom u rozdielu menšieho než 5 % sa uvádza výsledný stav ako wt. V prípade nedostatku DNA nemusí byť prítomný žiaden pík, a naopak, pri väčšom množstve DNA sa môže vytvoriť viacero píkov, ktoré však neznamenajú väčšie množstvo mutácií. LightMix detekuje do 300 kópií mutácie na 100 ng DNA – 1 % (LightMix Kit KRAS-NRAS, 2013).

Tabuľka 1: Prehľad zachytiteľných mutácií génov *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* pomocou komerčných detekčných súprav (Infiniti® KRAS-BRAF Assay, 2013; StripAssay® Evaluator, 2013; LightMix Kit KRAS-NRAS, 2013; Bolton a kol., 2015)

Gén	Kodón	Mutácia	Detekčná súprava				
KRAS	12	G12A	cobas®		therascreen	Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
		G12C	cobas®		therascreen	Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
		G12D	cobas®		therascreen	Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
		G12F	cobas®			Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		G12R	cobas®		therascreen	Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
		G12S	cobas®		therascreen	Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
		G12V	cobas®		therascreen	Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
		G12I					KRAS StripAssay®

Pokračovanie – Tabuľka 1								
Gén	Kodón	Mutácia	Detekčná súprava					
KRAS	12	G12L					KRAS StripAssay®	
	13	G13A	cobas®				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		G13C	cobas®				Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
		G13D	cobas®		therascreen		Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
		G13R	cobas®				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		G13S	cobas®				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		G13V	cobas®				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		G13I	cobas®					
	61	Q61E	cobas®				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		Q61H	cobas®**				Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
		Q61K	cobas®				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		Q61L	cobas®				Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
		Q61P	cobas®				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		Q61R	cobas®				Infiniti® KRAS-BRAF assay	KRAS StripAssay®
	117	K117E			LightMix®			
		K117N			LightMix®			
	146	A146T			LightMix®			
		A146P			LightMix®			
		A146G			LightMix®			
		A146V			LightMix®			
		A146A			LightMix®			
	NRAS	12	G12A		LightMix®			NRAS StripAssay®
			G12C		LightMix®			NRAS StripAssay®
G12D				LightMix®			NRAS StripAssay®	
G12R				LightMix®				
G12S				LightMix®			NRAS StripAssay®	
G12V				LightMix®			NRAS StripAssay®	
G12N				LightMix®				
G12P				LightMix®				
G12Y				LightMix®				
G12G			LightMix®					
13		G13A			LightMix®			
		G13C			LightMix®			
		G13D			LightMix®			NRAS StripAssay®

Pokračovanie – Tabuľka 1							
Gén	Kodón	Mutácia	Detekčná súprava				
NRAS	13	G13R		LightMix®			NRAS StripAssay®
		G13S		LightMix®			
		G13V		LightMix®			NRAS StripAssay®
		G13N		LightMix®			
		G13Y		LightMix®			
		G13G		LightMix®			
	59	A59T		LightMix®			
		A59D		LightMix®			
	60	G60R		LightMix®			
		G60E		LightMix®			
	61	Q61K		LightMix®			NRAS StripAssay®
		Q61E		LightMix®			
		Q61R		LightMix®			NRAS StripAssay®
		Q61L		LightMix®			NRAS StripAssay®
		Q61P		LightMix®			
		Q61H		LightMix®			NRAS StripAssay®
	146	Q61Q		LightMix®			
A146T			LightMix®				
BRAF	600	V600A				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		V600D				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		V600E1				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		V600E2				Infiniti® KRAS-BRAF assay	
		V600KRM				Infiniti® KRAS-BRAF assay	

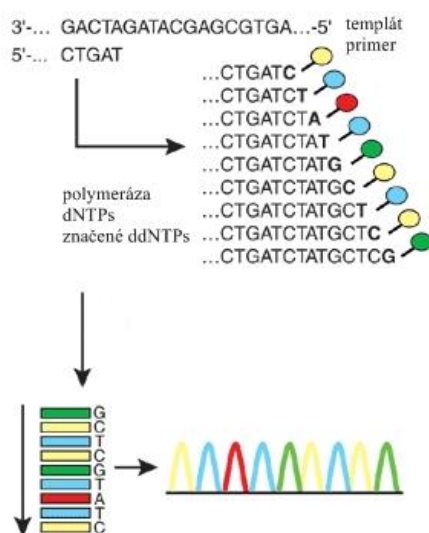
**dve Q61H mutácie (CAG a CAC)

3.4.7 Sangerovo sekvenovanie

Sangerovo sekvenovanie (Sanger a kol., 1977) patrí do prvej generácie sekvenačných techník. Princíp spočíva v elongácii DNA reťazca DNA polymerázou, pričom v reakčnom mixe sa nachádzajú primery, dNTP a ddNTP. ddNTP (dideoxynukleotidy) sú modifikované nukleotidy, ktoré neobsahujú -OH skupinu na 2' a 3'uhlíku sacharidovej zložky nukleotidu. ddNTP sú fluorescenčne značené a emitujú svetlo v rôznych vlnových dĺžkach. Po inkorporácii značeného ddNTP DNA polymeráza nedokáže pridať ďalší nukleotid do reakcie, a syntéza komplementárneho reťazca je ukončená. DNA je následne rozdelená podľa svojej

veľkosti na kapilárnej elektroforéze. Sekvenátor následne chromatogramom zobrazí sekvenované báze vo forme píkov rozdielných farieb (viz Obr. 5).

Sangerovo sekvenovanie umožňuje sekvenáciu úsekov o veľkosti 400 – 1000 bp s presnosťou 99,9 % (chybovosť sekvenácie nepresahuje 1/10000). Medzi hlavné nevýhody techniky patrí slabá kvalita prvých a posledných sekvenovaných báz, možné proporcionálne rozdiely medzi zobrazenými píkmi a pomerne nízka citlivosť (pomer testovaných pozitívnych vzoriek k celkovým testovaným, pozitívnym, vzorkám) – 15 – 20 %. (Altimari a kol., 2013; Shendure a kol., 2008).



Obr. 5: Princíp Sangerovej sekvenačnej technológie (upravené podľa Shendure a kol., 2008)

3.4.8 Pyrosekvenovanie

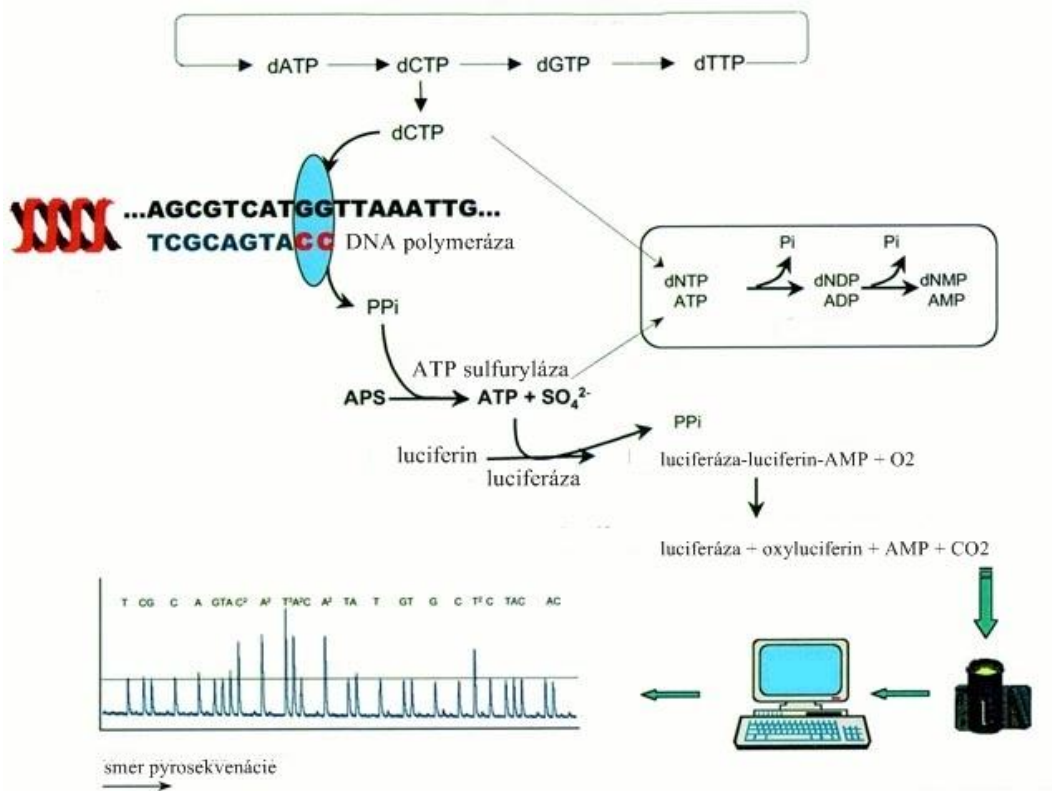
U pyrosekvenovania dochádza k sekvenácii DNA syntézou, ktorá je meraná v reálnom čase. Sekvenovaný produkt je najskôr amplifikovaný párom primerov, z ktorých jeden primer je biotinylovaný, čo umožňuje, aby sa amplifikovaný produkt pevne imobilizoval na magnetické guľičky obalené streptavidinom. Biotinylláciou na magnetických guľičkách je po denaturácii a premytí vlákna oddelené od zvyšku amplifikovaných úsekov. Prichytené vlákno následne slúži ako templát pre sekvenačný primer, ktorým DNA polymeráza, Klenow fragment, syntetizuje vlákno v priamom smere 5' → 3' (viz Obr. 6). Nukleotid, ktorý nie je inkorporovaný do reťazca, je degradovaný apyrázou. Po inkorporácii nukleotidu do predlžujúceho sa vlákna dochádza k sérii chemických reakcií, počas ktorých sa uvoľňuje pyrofosfát. Pyrofosfát je následne sulfurylázou premenený na ATP, z ktorého je luciferázou generovaný svetelný signál. Svetelný signál sa prejaví ako pík vo výslednom pyrograme,

pričom výška píku je proporcionálne zhodná s množstvom nukleotidov inkorporovaných do predlžujúceho sa reťazca.

Keďže dATP slúži ako substrát pre luciferázu, môže produkovať falošný signál, miesto dATP sa do reťazca pridáva dATP- α -S. Inkorporácia dATP- α -S však produkuje vyššie píky než zvyšné nukleotidy, čo je potrebné brať v úvahu pri interpretácii pyrogramov.

Tvar pyrogramu ovplyvňuje i tzv. dispensation order (D.O.), poradie, v ktorom sú jednotlivé nukleotidy vkladané do komory so sekvenačnými reakciami. Pri cyklickom D.O. sú nukleotidy vkladané do sekvenačnej komory v cyklickom nemennom poradí. Cyklické D.O. sa odporúča využívať pri sekvenovaní neznámych sekvencií, pričom ich hlavnou nevýhodou je generovanie ťažšie čitateľných pyrogramov s nadbytočnými, prípadne žiadnymi píkmami. Optimalizované D.O. umožňuje rýchlejšie a efektívnejšie analýzy známych mutácií, preto sa pri sekvenovaní známych sekvencií odporúča využiť práve optimalizovaný D.O (Harrington a kol., 2013).

Pyrosekvenovaním je možné zachytiť vzorku s 5 % mutácií (Malapelle a kol., 2014; Ogino a kol., 2005).



Obr. 6: Princíp pyrosekvenačnej technológie (upravené podľa Gharizadeh a kol, 2001)

3.4.9 NGS

Novšie sekvenačné technológie sú označované ako sekvenačné technológie novej generácie (next generation sequencing, NGS), prípadne ako multiparalelné sekvenovanie. NGS zahŕňajú široké spektrum sekvenačných platforiem s rozdielnymi princípmi prípravy DNA knižníc, sekvenácie, zobrazovania a analýzy dát. Paralelne produkujú veľké množstvo sekvencií, čím vytvárajú väčšie množstvo dát za nižšiu cenu, umožňujú sekvenáciu celých genómov organizmov i resekvenáciu veľkých genómov, ako napr. ľudského genómu (Kothari a kol., 2014; Metzker, 2010). Technické špecifikácie vybraných sekvenačných platforiem (454 Roche pyrosekvenovanie, Illumina Solexa, SOLiDTM, Ion Torrent, Pacific Biosciences, MinIONTM) sú zobrazené v Tabuľke 2.

3.4.9.1 454 Roche pyrosekvenovanie

Sekvenačná technológia 454 firmy Roche funguje na princípe masívne paralelného sekvenovania prostredníctvom pyrosekvenačnej technológie. Sekvenačná platforma zahŕňa 3 kroky (viz Obr. 7) (Liu a kol., 2012):

1.) Príprava knižnice

Vyizolovaná DNA je pomocou sonifikátoru alebo nebulizátoru fragmentovaná na úseky o veľkosti 300 – 800 bp. Na konce fragmentov sú nalogované adaptory označené ako adaptor A a adaptor B. Fragmenty s nalogovaným B adaptorom, obsahujúcim 5' biotin, sú prichytené na streptavidin. Po imobilizácii na streptavidin dochádza k denaturácii fragmentov a uvoľneniu nebiotinylovaného reťazca, ktorý následne slúži ako ssDNA pre tvorbu DNA knižnice.

2.) emPCR

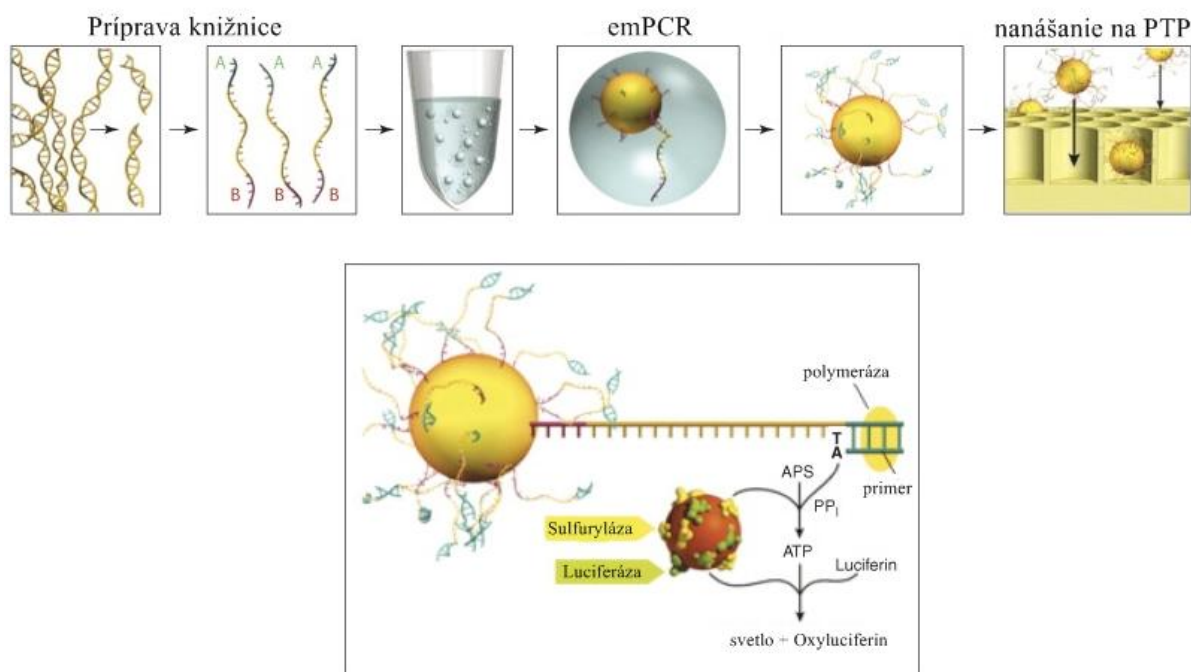
Jednoreťazcová knižnica je naviazaná na agarózové guľičky obsahujúce oligonukleotidy komplementárne ku adaptorom. Jeden fragment DNA sa naviaže na jednu agarózovú guľičku. Pridaním reagensí pre PCR a oleja sú vytvorené emulzie, v ktorých je každá guľička s DNA zachytená v kvapke roztoku obaleného olejom. Vo vytvorených mikroreaktoroch obklopených vrstvou oleja prebieha klonálna amplifikácia DNA. Po PCR sú mikroreaktory rozbité a obohatené o guľičky s amplifikovanou DNA.

3.) Pyrosekvenovanie

Sekvenácia DNA prebieha na pikotitračnej doštičke (PTP) z optických mikrovláskien a je založená na masívne paralelnom pyrosekvenovaní, počas ktorého sa po inkorporácii

komplementárneho nukleotidu do predlžujúceho sa reťazca uvoľňuje pyrofosfát (viz Pyrosekvenovanie). Sekvenátor obsahuje zariadenie pre mikrofluidiku, prietokovú komoru s pikotitračnou doštičkou, CCD kameru a PC.

454 Roche sekvenačná platforma poskytuje pomerne rýchle jednoduché čítania sekvencií, a *de novo* identifikáciu nekomplikovaných genómov. Zároveň vyžaduje krátky čas nutný na prácu s analyzovanými vzorkami (tzv. hands-on time) – približne 4 hodiny. Medzi hlavné nevýhody techniky patrí vysoká chybovosť identifikácii homopolymerných sekvencií, a vysoký pomer cena/bp (Liu a kol., 2012). V roku 2013 firma Roche oznámila plánované ukončenie podpory 454 pyrosekvenačnej platformy v priebehu roku 2016 (Seven Days: 18–24 October 2013, 2013).



Obr. 7: Princíp 454 Roche pyrosekvenačnej platformy (upravené podľa Mardis, 2008)

3.4.9.2 Illumina

Sekvenačná platforma firmy Illumina je založená na sekvenovaní syntézou. Princíp technológie spočíva v 3 mechanizmoch (viz Obr. 8).

1.) Príprava knižnice

Príprava knižnice začína mechanickým rozbitím DNA na fragmenty o veľkosti 800 bp a vytvorení tupých koncov. Následne sú na oba konce pridané niekoľko-nukleotidové presahy a ligované adaptory.

2.) Mostíková amplifikácia a tvorba klasterov

a.) Naviazanie vzorku na povrch prietokovej komory

Primery, komplementárne ku adaptorom, sú 5' koncami kovalentne naviazané na prietokovú komoru. Nahybridizovaná ssDNA je dosyntetizovaná DNA polymerázou a vzniknutý ds reťazec je denaturovaný, za následného odmytia pôvodného templátového reťazca. Novo nasyntetizovaný reťazec zostáva kovalentne naviazaný na povrch prietokovej komory.

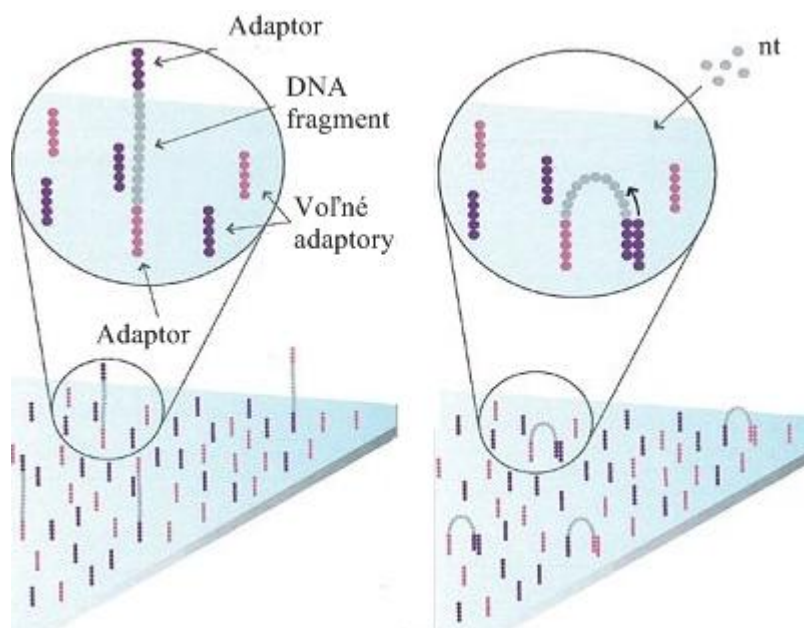
b.) Tvorba mostíkov

Jednovláknový reťazec DNA sa ohne a nahybridizuje sa k susednému primeru komplementárnemu ku koncu ohnutého fragmentu DNA. Predĺžením nahybridizovaného primeru DNA polymerázou je vytvorený tvar dvojvláknového mostíka. Mostík je následne denaturovaný, čím vznikajú 2 kópie ss templátu, ktoré sa opäť ohýbajú a celý proces je opakovaný. Mnohopočetné mostíky vytvárajú charakter klasterov rovnakých sekvencií, pričom pri následnej denaturácii vlákien a odmytí reťazcov v reverznom smere pretrvávajú iba klastre s reťazcami v priamom smere. 3' konce reťazcov sa zablokujú reverzným terminátorom.

3.) Sekvenovanie syntézou

Na adaptérovú sekvenciu je nahybridizovaný sekvenačný primer, ktorým začína sekvenácia priameho reťazca. Do sekvenujúceho sa reťazca sú pridávané 4 fluorescenčne značené nukleotidy, a uvoľnený fluorescenčný signál je zachytený skenerom. Fluorescenčný signál je prevedený na sekvenciu nukleotidov, ktorá je následne odčítaná.

Illumina je v súčasnosti najpoužívanejšou sekvenačnou technológiou so širokým rozsahom, malou chybovosťou a vysokou presnosťou sekvenovaných dát. Čas strávený prípravou vzoriek je približne 4 hodiny. Medzi najväčšie nevýhody Illuminy patrí pomerne vysoká cena analýz a prístrojov, a priveľké množstvo generovaných dát, ktoré môže komplikovať analýzu sekvencií (Liu a kol., 2012; Quail a kol., 2012).



Obr. 8: Princíp mostíkovej amplifikácie technológie Solexa Illumina (upravené podľa Tech Summary: Illumina's Solexa Sequencing Technology, 2007)

3.4.9.3 SOLiD™

Sekvenačná platforma SOLiD™ (Sequencing by Oligonucleotide Ligation Detection) firmy Applied Biosystems pozostáva zo 4 krokov (Liu a kol., 2012):

1.) Príprava DNA knižnice

SOLiD™ technológia umožňuje využitie DNA knižnice buď vo forme fragmentov o veľkosti 60 bp – 110 bp, alebo ako tzv. mate-pair knižnica veľkosti 600 bp – 6 kbp. K úsekom DNA sú pripojené adaptory označené ako P1 a P2.

2.) emPCR

Fragmenty DNA sú s adaptormi naviazané na guľičky s následnou emPCR. Guľičky sú modifikované na 3' konci, vďaka čomu sa kovalentne naviažu na sklenú dosku. Sklená doska môže byť rozdelená na 1, 4 alebo 8 častí, v ktorých je možno analyzovať až 256 vzoriek súčasne.

3.) Sekvenácia ligáciou

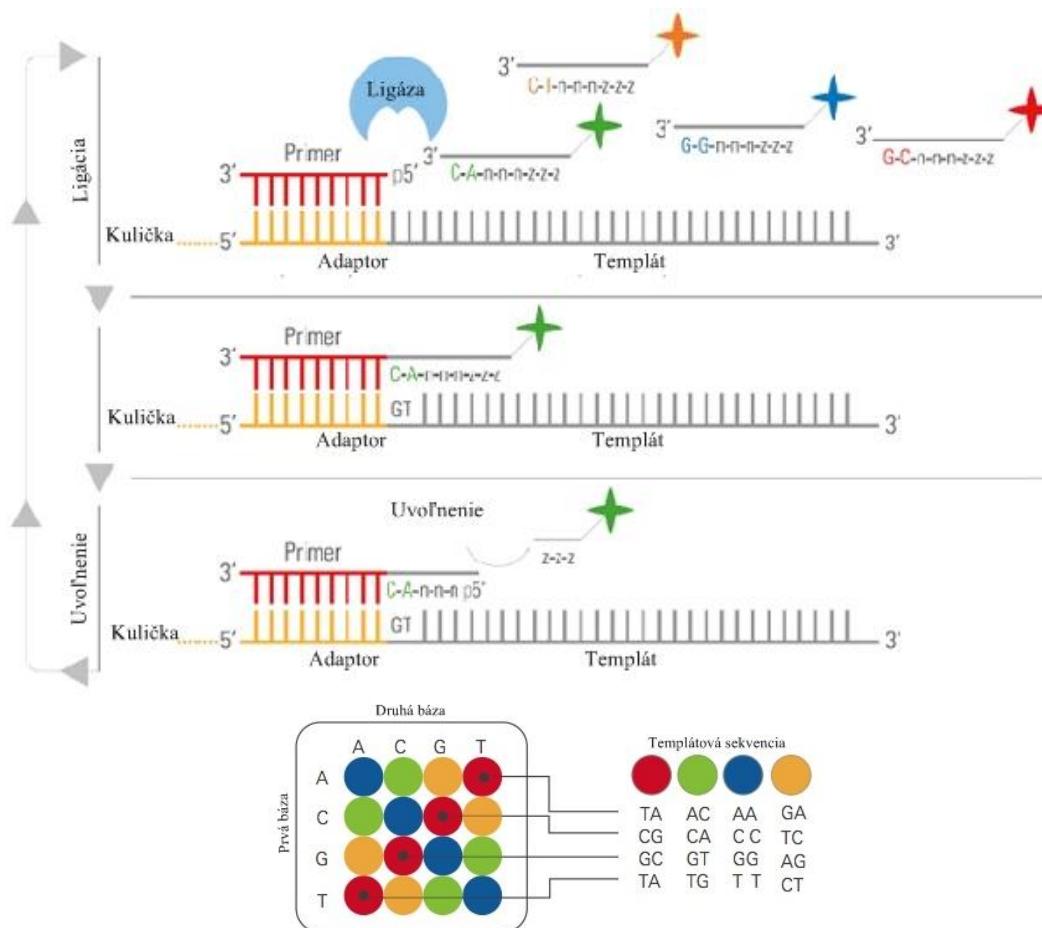
Ku sekvenačnému primeru, napojenému na P1 adaptor, sú postupne ligované 4 odlišne fluorescenčne značené próby o veľkosti 8 nukleotidov (viz Obr.9). Prvé 2 bázy próby sú komplementárne k sekvencii DNA, báza 3 – 5 je degenerovaná a schopná párovať sa s akoukoľvek bázou, a báza 6 – 8, rovnako degenerovaná, sa po ligácii uvoľňuje. V ďalšom

kole je rovnaký primer naviazaný do pozície n-1, následne do pozície n-2, n-3 a n-4. Celý sekvenačný krok sa opakuje v piatich kolách, pričom piate kolo udáva rovnaký signál ako v prvom kole.

4.) Analýza dát

Dáta sú interpretované próbami značenými 4 rozdielnymi nukleotidmi, pričom každá farba reprezentuje súčasne dva nukleotidy. Pri dekódovaní sekvencie je potrebné poznať minimálne 1 bázu sekvencie.

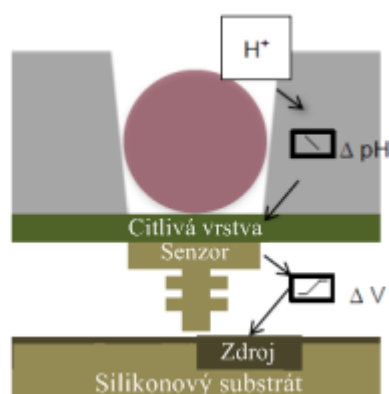
Výhodou SOLiD™ platformy je dvojité čítanie každej bázy, čo redukuje množstvo chýb, a umožňuje predovšetkým presnú identifikáciu SNP, zároveň i krátky čas strávený prípravou vzorkov (približne 1 hodina). Nevýhoda spočíva v prípade chybného prečítania nukleotidu, následkom čoho je chybné prečítaný celý zvyšok sekvencie (Liu a kol., 2012).



Obr. 9: Princíp sekvenácie ligáciou sekvenačnej platformy SOLiD™ (upravené podľa Voelkerding a kol., 2009)

3.4.9.4 Ion Torrent

IonTorrent je sekvenačná technológia firmy Life Science, ktorá je založená na sekvenácii pomocou semikonduktorových čipov. Fragmenty DNA o veľkosti 200 – 400 bp sú pomocou adaptorových sekvencií naligované na guľičky, na ktorých prebieha emPCR. Ion Sphere guľičky sú uložené v jamkách iónových čipov, do ktorých je postupne pridávaný roztok s jednotlivými nukleotidmi. Počas inkorporácie správneho nukleotidu je uvoľnený protón (H^+), ktorý mení pH roztoku v jamkách. Zmena pH je detekovaná citlivou vrstvou uloženou pod jamkami a uvoľnené H^+ sú premenené na napätie (viz Obr. 10). Podľa veľkosti zmeny napätia je možné stanoviť, o aký inkorporovaný nukleotid sa jedná, pričom pri inkorporácii dvoch rovnakých nukleotidov za sebou je veľkosť zmeny napätia je dvojnásobná. Tzv. hands-on time je približne 1 hodina. Analýza zmeny napätia prebieha simultánne vo všetkých jamkách, čo umožňuje rýchlu detekciu, bez potreby kamier či skenovania. Chybovosť dát získaných pomocou Ion Torrent sekvenačnej platformy však môže byť vyššia v srovnaní s technológiou Illumina (Rothberg a kol., 2011; Quail a kol., 2012).



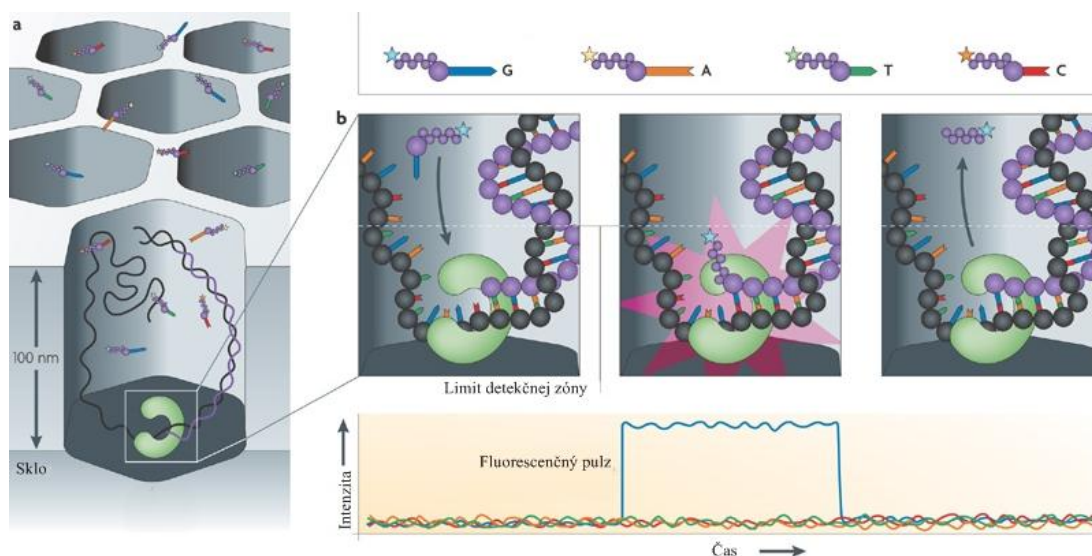
Obr. 10: Princíp sekvenačnej technológie IonTorrent (upravené podľa Rothberg a kol., 2011)

3.4.9.5 Pacific Biosciences

Biotechnologická firma Pacific Biosciences (označovaná i ako PacBio) vyvinula sekvenačnú technológiu SMRTTM (Single Molecule Real Time). Technológia využíva sekvenáciu na SMRT komore s 150 000 vlnovodmi označovanými ako ZMW (Zero-Mode Waveguide). ZMW sú 50 nm široké vlnovody, uložené na sklenej podložke a osvetlené zo spodnej časti svetlom (viz Obr. 11). Svetlo prechádzajúce ZMW osvetľuje spodných 20 – 30 nm, vďaka čomu ZMW vytvárajú najmenší detekčný objem o veľkosti $20 \cdot 10^{-21}$ litra (zeptoliter) (Eid a kol., 2009).

V spodnej časti ZMW je vložená DNA polymeráza, ktorá po pridaní DNA fragmentu syntetizuje komplementárne vlákno. Fluorescenčne značené nukleotidy sú počas syntézy inkorporované do reťazca DNA, a excitované svetlo je zachytené.

PacBio sekvenačná technológia je charakteristická nerovným pokrytím pri sekvenciách bohatých na AT/GC, a vysokými nepresnosťami pri detekcii SNP. Zároveň však umožňuje rýchle a dlhé sekvenačné čítania a sekvenáciu v malom objeme. Čas strávený prípravou vzoriek je približne 4 hodiny (Quail a kol., 2012).



Obr. 11: Princíp sekvenačnej technológie SMRT™ firmy PacBio (upravené podľa Metzker, 2010)

3.4.9.6 MinION™

Novinkou roku 2012 na trhu so sekvenačnými technológiami je MinION™ firmy Oxford Nanopore Technologies (UK). MinION™ pracuje na princípe sekvenácie pomocou organických molekúl nanopórov, bez nutnosti DNA amplifikácie. Nanopór sa nachádza v syntetickej polymernej membráne na povrchu kanálov, pričom jeho stredom prechádza otvor o veľkosti 1 – 2 nm. Prúd iónov, pretekajúci stredom póru, strháva i ďalšie molekuly (DNA, RNA, proteíny), a vtiahnutá molekula charakteristicky ruší prúd iónov, ktorý je zaznamenaný a následne interpretovaný. Pri sekvenácii DNA je vytvorený komplex DNA-enzým, ktorý je súčasťou elektrofyziologickej tekutiny. Enzým rozdeľuje vlákna DNA a umožňuje prechod DNA vo forme ss. Zároveň enzým reguluje rýchlosť prechodu analytu cez nanopór, pričom pri pomalšom tempe je dosahovaná vyššia presnosť.

Samotné zariadenie MinION™ obsahuje dávkovací otvor, priestor pre odpad a prietokovú komoru so sadou jamiek v senzorigickom čipe, pričom každá slúži ako elektronický kanál (viz Obr. 12). MinION™ funguje po pripojení na laptop cez USB kábel a je kontrolovaný softwarom, ktorý zároveň i analyzuje dáta (Mikheyev a kol., 2014).



Obr. č. 12: Ukážka sekvenačného zariadenia MinION™ firmy Oxford Nanopore Technologies (upravené podľa Oxford Nanopore Technologies, 2014)

Tabuľka 2: Technické špecifikácie vybraných sekvenačných platforiem (Liu a kol., 2012; Quail a kol., 2012)

Sekvenátor	454 GS FLX (Roche)	HiSeq 2000 (Illumina)	SOLiDv4	PacBioRS	Ion Torrent PGM	Sanger 3730xl
Sekven. mechanizmus	Pyrosekvenovanie	Sekvenácia syntézou	Sekvenácia ligáciou	SMRT™	Semikonduktorové čipy	Dideoxy terminácia
Dĺžka čítania	700 bp	150 bp	50 + 35 bp/ 50 + 50 bp	1500 bp	200 bp	400 – 900 bp
Presnosť	99,9 %	98 %	99,9 %	99,9 %	98 – 99 %	99,9 %
Čas/analýza	23 hod	3 – 10 dní	7 – 14 dní	2 hod	3 hod	20 min – 3 hod
Cena/1MB	10 \$	0,07 \$	0,13 \$	2000 \$ (Gb)	1000 \$ (Gb)	2400 \$
Množstvo DNA	>2,5 µg	50 – 1000 ng	1 – 5 µg	1 µg	100 – 1000 µg	>2 – 5 µg
Dáta/čítanie	0,7 Gb	600 Gb	120 Gb	100 Mb	1 Gb	1,9 – 84 kb

4. Materiál

4.1 Prístroje a pomôcky

Prístroje určené na prípravu PCR amplikonov:

- Termocyklér umožňujúci PCR analýzu v reálnom čase LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, USA)
- Laminárny Box Mars Safety Classe 2 (LaboGene, Dánsko)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Nemecko)
- Centrifuga Centrifuge 5430 (Eppendorf, Nemecko)
- Centrifuga Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf, Nemecko)
- Vortex mixer VX-200 (Labnet, USA)
- Chladnička a mraziak (Liebherr, Nemecko)
- Mraziaci box Ultra Low Temperature Freezer C340-88 (New Brunswick Scientific, USA)
- Spectrofotometer ND 1000 (Biotech, USA)
- Termostat Bio TDB – 100 (BioSan, USA)

Prístroje a zariadenia určené na pyrosekvenačnú analýzu:

- PyroMark Q96ID sekvenátor (Qiagen, Nemecko)
- PyroMark Q96 Workstation (Qiagen, Nemecko)
- PyroMark Q96 Cartidge (Qiagen, Nemecko)
- Vakuová stanica (KNF, UK)
- VORTEX Genius 3 (IKA, Nemecko)
- Dry Bath Incubator (Major Science, USA)

Pomôcky:

- 0,1 – 2,5 µl pipeta (Eppendorf, Nemecko)
- 0,5 – 10 µl pipeta (Eppendorf, Nemecko)
- 2 – 20 µl pipeta (Eppendorf, Nemecko)
- 10 – 100 µl pipeta (Eppendorf, Nemecko)
- 20 – 200 µl pipeta (Eppendorf, Nemecko)
- 100 – 1000 µl pipeta (Eppendorf, Nemecko)
- Stojan na pipety (Eppendorf, Nemecko)
- Stojan PCRack s viečkom (P-LAB, ČR)
- Chladiaci stojan na skúmavky 1,5 ml (P-LAB, ČR)
- Chladiaci stojan na mikroskúmavky (Eppendorf, Nemecko)

4.2 Software a programy

- LightCycler 480 SW 1.5 (Roche, USA)
- PyroMark Assay Design version 2.0 (Qiagen, Nemecko)
- PyroMark Q96 Application Software 1.0 (Qiagen, Nemecko)
- Microsoft Office Word (Microsoft Corporation, USA)
- Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, USA)
- COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer (Trust Institute, UK)
- OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, USA)
- BLAT Search Genome (USCS Genome Informatics Group, USA)
- UCSC In-Silico PCR (USCS Genome Informatics Group, USA)
- Pyromaker 1.1 (Chen a kol., 2012)

4.3 Spotrebný materiál

- Mikroskúmavky EU Thin-wall 8-tube strip 0,2 ml (BIOplastics, Holandsko)
- Viečka EU Optical Wide Area 8-cap strip (BIOplastics, Holandsko)
- PCR skúmavky 1,5 ml (Axygen, USA)
- 96-jamkové doštičky LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 clear a fólie (Roche, USA)
- Doštičky na sekvenáciu PyroMark Q96 Plate Low (Qiagen, Nemecko)
- QIAquick kolóna (Qiagen, Nemecko)
- 10 µl špičky s dvojitým filtrom (Eppendorf, Nemecko)
- 20 µl špičky s dvojitým filtrom (Eppendorf, Nemecko)
- 100 µl špičky s dvojitým filtrom (Eppendorf, Nemecko)
- 200 µl špičky s dvojitým filtrom (Eppendorf, Nemecko)
- 1000 µl špičky s dvojitým filtrom (Eppendorf, Nemecko)
- Ochranné rukavice NITRILE (Eurotubo Deltalab, Španielsko)

4.4 Chemikálie a reagensy

4.4.1 Chemikálie a reagensy pre PCR

- DEPC ošetrená voda
- Tween20 (1%) (Thermo Scientific, USA)
- 10mM TrisCl pH = 8 (Sigma-Aldrich, USA)
- HotStartTaq *Plus* Master Mix kit (obsahuje 2 x HotStarTaq DNA Polymerázu, 10 x PCR pufor, 3 mM MgCl₂, 400 mM dNTP) (Qiagen, Nemecko)

- PyroMark PCR Kit (obsahuje 2x PyroMark PCR Master Mix: HotStarTaq DNA Polymeráza, 10 x PCR pufoer, 3 mM MgCl₂, 400 mM dNTP) (Qiagen, Nemecko)
- 10 x koncentrát Cora ILoad (Qiagen, Nemecko)
- 5 x Q roztok (Qiagen, Nemecko)
- 25 mM roztok MgCl₂ (Thermo Scientific, USA)
- 20 x EvaGreen (Biotium, USA)
- 10x PCR pufoer (Thermo Scientific, USA)
- 5 U/μl Thermo Start DNA polymeráza (Thermo Scientific)
- 25 mM dNTPs
- 100 μM primerová zmes PM č. 501, 502, 503, 474, 475, 476, 504, 508
- 100 μM sekvenačné primery č. 939, 1018, 1021, 898, 901, 904, 1024, 1061

4.4.2 Chemikálie a reagenty pre pyrosekvenovanie

Pre pyrosekvenačnú analýzu bol použitý theascreen® NRAS Pyro kit so systémom Pyromark obsahujúci:

- Väzbový pufoer PyroMark (Qiagen, Germany)
- Hybridizačný pufoer PyroMark (Qiagen, Germany)
- Denaturačný roztok PyroMark (Qiagen, Germany)
- 10 x premývací pufoer PyroMark (Qiagen, Germany)
- Zmes enzýmov (Qiagen, Germany)
- Zmes substrátov (Qiagen, Germany)
- dATPαS (Qiagen, Germany)
- dCTP (Qiagen, Germany)
- dGTP (Qiagen, Germany)
- dTTP (Qiagen, Germany)

Použité boli i reagenty, ktoré neboli súčasťou theascreen® NRAS Pyro kitu:

- Streptavidin Sepharose® High Performance (GE Healthcare, USA)
- Ethanol

4.5 Biologické vzorky

Použitým biologickým materiálom bola DNA izolovaná z nádorového tkaniva (fixovaného v parafínových rezoch), krvi a bunkových línii pochádzajúca od pacientov FN Olomouc. Na izoláciu DNA bol použitý izolačný kit DNA Sample Preparation Kit. Izolácia DNA pacientov bola vykonaná laborantkami Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (ďalej ÚMTM). Biologické vzorky boli po izolácii uskladnené v mraziacom boxe pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pre testovanie mutačného statusu pacientov bolo získané povolenie etickej komisie v rámci práce na grante MPO TIP FR-TI1/525 a vzorky boli anonymizované štvorčíselným MG kódom.

5. Metódy

5.1 Návrh primerov pre PCR amplifikáciu

Pre úspešnú amplifikáciu cieľovej oblasti úseku DNA boli u analyzovaných mutácií navrhnuté primery v oboch smeroch (tzv. forward (F) a reverse (R)). Pre nasledovnú pyrosekvenačnú analýzu a vytvorenie jednobláknového PCR produktu je potrebné, aby jeden z dvojice primerov obsahoval na 5' konci biotinylovú značku.

Pre návrh správnych primerov je potrebné dodržiavať niekoľko pravidiel:

- Dĺžka primerov približne 18 – 22 nt
- Teplota topenia (T_m) dvojice primerov by sa nemala líšiť o viac ako 5 °C
- Podiel guanínov a cytozínov približne 40 – 60 %
- Jeden alebo dva guaníny/cytozíny na 3' i 5' konci primeru
- Eliminácia sekundárnych štruktúr a krížovej reaktivity
- Maximálna dĺžka intraprimerovej repetície (mono- i dinukleotidovej) nepresahuje 4

Analyzované mutácie boli označené podľa jednotlivých testovaných kodónov: *KRAS* 12/13 (pre mutáciu génu *KRAS* exónu 2, kodónov 12 a 13), *KRAS* 59/61 (pre mutáciu génu *KRAS* exónu 3, kodónov 59 a 61) atď. Pre následnú sekvenačnú analýzu bol u každého primerového páru F alebo R primer označený biotinovou značkou.

Primery pre mutácie *KRAS* 12/13, *KRAS* 59/61, *KRAS* 117 a *NRAS* 117 boli navrhnuté programom PyroMark Assay Design. Program PyroMark Assay Design zároveň u navrhnutých primerov kontroluje prípadné tvorby sekundárnych štruktúr, krížovej reaktivity, a u každého primeru udáva teplotu topenia (T_m). Presnosť a špecifita navrhnutých primerov bola kontrolovaná programami BLAT Search Genome a UCSC In-Sillico PCR.

Primery pre mutácie *KRAS* 146, *NRAS* 12/12 a *NRAS* 59/61 boli prevzaté od Vaughn a kol., 2011. Primery pre mutáciu *NRAS* 146 boli prevzaté od Jung a kol., 2013. Primery prevzaté z cudzích zdrojov boli rovnako kontrolované programom BLAT Search Genome a UCSC In-Sillico PCR a teplota topenia primerov bola stanovená programom OligoAnalyzer 3.1 podľa vopred nastavených pôvodných kritérií.

Z navrhnutých F a R primerov, označených číselným kódom, boli následne vytvorené primerové zmesi (PM):

- *KRAS* 12/13: PM 501 (forward primer 937 + reverse primer 1015)
- *KRAS* 59/61: PM 502 (forward primer 1016 + reverse primer 1017)
- *KRAS* 117: PM 503 (forward primer 1019 + reverse primer 1020)
- *KRAS* 146: PM 474 (forward primer 896 + reverse primer 897)
- *NRAS* 12/13: PM 475 (forward primer 899 + reverse primer 900)
- *NRAS* 59/61: PM 476 (forward primer 902 + reverse primer 903)
- *NRAS* 117: PM 504 (forward primer 1022 + reverse primer 1023)
- *NRAS* 146: PM 508 (forward primer 1059 + reverse primer 1060)

Primery boli po doručení rozpustené v 10 mM Tris (pH 8) na finálnu koncentráciu 0,1 mM, inkubované 10 min pri 70 °C a následne alikvotované na objem 10 µl. Sekvencia, dĺžka, množstvo GC, primerová značka a teplota topenia (T_m) používaných primerov sú uvedené v Tabuľke 3.

Tabuľka 3: Zoznam primerov a ich charakteristík použitých pre PCR amplifikáciu

testovaná mutácia	číslo	smer	značka	dĺžka (nt)	GC (%)	sekvencia	T_m (°C)
<i>KRAS</i> 12/13	937	F		21	48	GGCCTGCTGAAAATGACTGAA	71,5
<i>KRAS</i> 12/13	1015	R	biotín	24	46	TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT	70,4
<i>KRAS</i> 59/61	1016	F	biotín	24	42	TGGAGAAACCTGTCTCTTGGATAT	69,2
<i>KRAS</i> 59/61	1017	R		23	48	TACTGGTCCCTCATTGCACTGTA	70,7
<i>KRAS</i> 117	1019	F	biotín	24	42	TGAAGATGTACCTATGGTCCTAGT	64,9
<i>KRAS</i> 117	1020	R		21	48	AAGTCCTGAGCCTGTTTTGTG	68,3
<i>KRAS</i> 146	896	F		24	46	AGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTT	65,3
<i>KRAS</i> 146	897	R	biotín	23	43	GCCCTCTCAAGAGACAAAACAT	62,9
<i>NRAS</i> 12/13	899	F		21	48	CTTGCTGGTGTGAAATGACTG	62,3
<i>NRAS</i> 12/13	900	R	biotín	24	42	TTCTGGATTAGCTGGATTGTCAGT	63,2
<i>NRAS</i> 59/61	902	F	biotín	22	50	ACACCCCCAGGATTCTTACAGA	65,8
<i>NRAS</i> 59/61	903	R		21	52	GCCTGTCCTCATGTATTGGTC	63,6
<i>NRAS</i> 117	1022	F		24	46	ATGATGTACCTATGGTGCTAGTGG	68,2
<i>NRAS</i> 117	1023	R	biotín	21	52	GTA ACTCTTGGCCAGTTCGTG	68,7
<i>NRAS</i> 146	1059	F		20	55	CGAACTGGCCAAGAGTTACG	55,9
<i>NRAS</i> 146	1060	R	biotín	24	46	TGAAAGCTGTACCATACCTGTCTG	56,5

Pre sekvenačnú analýzu bol ku každému navrhnutému, resp. prevzatému primerovému páru získaný i sekvenačný primer, ktorý slúži pre samotnú sekvenáciu ampliconu. Sekvenačný primer umožňuje sekvenáciu reťazca amplifikovaného F a R primermi, uchyteného pomocou biotinylovej značky na streptavidinové guľičky. Podľa umiestnenia

biotinylovej značky na F alebo R primery je fragment DNA sekvenovaný v priamom, alebo opačnom smere, na čom závisí interpretácia výsledných pyrogramov.

Zoznam sekvenačných primerov označených číselným kódom, dĺžkou nukleotidov, počtom GC nt, sekvenciou a T_m je uvedený v Tabuľke 4. Pozícia a sekvencia všetkých používaných primerov vo vybranom úseku génov *KRAS* a *NRAS* a wt sekvencia testovaných kodónov je zobrazená v kapitole Prílohy, Obr. A.

Tabuľka 4: Zoznam sekvenačných primerov a ich charakteristík použitých pre PCR amplifikáciu

testovaná mutácia	číslo	dĺžka (nt)	GC (%)	sekvencia	T_m (°C)
<i>KRAS</i> 12/13	939	17	53	CTTGTGGTAGTTGGAGC	51,3
<i>KRAS</i> 59/61	1018	18	50	CCTCATTGCACTGTACTC	51,3
<i>KRAS</i> 117	1021	19	42	GTTCTAGAAGGCAAATCAC	51,6
<i>KRAS</i> 146	898	20	20	AATTCCTTTTATTGAAACAT	51,3
<i>NRAS</i> 12/13	901	15	60	GTGGTGGTTGGAGCA	63,4
<i>NRAS</i> 61	904	18	50	CATGGCACTGTACTCTTC	59,3
<i>NRAS</i> 117	1024	16	50	TGGTGCTAGTGGGAAA	53,2
<i>NRAS</i> 146	1061	17	38	TCCATTCATTGAAACC	43

5.2 Príprava PCR mixu

Pri optimalizácii PCR boli porovnávané tri druhy PCR master mixov: master mix z PyroMark PCR Kitu, master mix z HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu, a master mix vytvorený zmiešaním rozdielnych individuálnych reagensí (Thermo Scientific).

U PyroMark PCR Kitu a HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu bol porovnávaný vplyv Coral Load a Q roztoku na amplifikáciu produktu.

U HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu bol porovnávaný i vplyv rozdielneho objemu master mixu (10 μ l a 15 μ l) na výsledný pyrogram. Rovnako boli u daného kitu porovnávané amplifikácie PCR produktu za použitia rozdielnych koncentrácií $MgCl_2$ (1,5 mM, 2,2 mM a 3 mM).

5.2.1 Príprava PCR master mixu pomocou PyroMark PCR Kitu

PyroMark PCR Kit (Qiagen) je optimalizovaný pre amplifikáciu génov slúžiacich na nasledovnú pyrosekvenačnú analýzu. Súčasťou kitu sú:

- PyroMark PCR Master Mix, 2x (obsahuje HotStart *Taq* DNA polymerázu, PyroMark reakčný pufor, 3 mM MgCl₂, dNTP)
- Coral Load koncentrát, 10x (zvyšuje špecifickosť PCR, slúži ako nanášacie farbivo pre prípadnú elektroforetickú analýzu)
- Q roztok, 5x (zlepšuje amplifikáciu ťažšie ampifikovateľných úsekov templátu)
- MgCl₂, 25 mM
- Voda zbavená RNáz

PCR mix bol vytvorený napipetovaním reagensí uvedených v Tabuľke 5. Objem pipetovaných reagensí bol stanovený vzorcom:

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

kde: x – značí počet vzorkov

1,17 – značí vopred stanovený faktor

y – značí celkový objem

Tabuľka 5: Rozpis reagensí PCR PyroMark PCR Kitu

Master mix PyroMark PCR Kitu		
Reagencia	Riedenie	Objem (μl)
PyroMark PCR Master Mix	2x	
CoralLoad	10x	
Q roztok	5x	
PM	400x	
Eva Green	20x	
H ₂ O	-	
	Celkom	

Celkový objem PCR mixu bol stanovený na 10 μl. 9,5 μl master mixu bolo odobratých a prenesených do 8-jamkového stripu, prípadne 96-jamkovej doštičky. K 9,5 μl master mixu bolo pridaných 0,5 μl analyzovanej DNA. Doštička resp. strip boli stočené na centrifúge a vložené do cykléru LC 480.

5.2.2 Príprava PCR master mixu pomocou HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu

HotStartTaq *Plus* Master Mix Kit (Qiagen) je optimalizovaný pre amplifikáciu génov pomocou HotStartTaq *Plus* DNA polymerázy. Súčasťou kitu sú:

- HotStartTaq *Plus* Master Mix, 2x (obsahuje HotStart *Taq* DNA polymerázu, PCR reakčný pufor, 3 mM MgCl₂, 400 μM dNTP)
- Coral Load koncentrát, 10x
- MgCl₂, 25 mM
- Voda zbavená RNáz

PCR mix bol vytvorený napipetovaním reagensí (viz Tabuľka 6), o objeme stanovenom rovnakým výpočtom ako v kapitole 5.2.1.

Pri amplifikácii HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitom bol testovaný vplyv reakčného objemu 10 μl i 15 μl na výsledné pyrogramy. Pri analýze 10 μl objemu master mixu bolo k 9,5 μl master mixu pridávaných 0,5 μl DNA. V prípade použitého objemu 15 μl bol z master mixu odobraný objem 14,25 μl, ku ktorému bolo následne pridávaných 0,75 μl vzorky DNA.

Tabuľka 6: Rozpis reagensí PCR HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu

HotStartTaq <i>Plus</i> Master Mix		
Reagencia	Riedenie	Objem (μl)
HotStart Taq Master Mix	2x	
CoralLoad	10x	
PM	400x	
Eva Green	20x	
H ₂ O	-	
	Celkom	

5.2.3 Príprava PCR master mixu Thermo Scientific

Samostatné reagensie (Thermo Scientific) (tzn. nie z jedného kitu) boli použité na tvorbu tretieho typu master mixu. Master mix obsahoval reagensie uvedené v Tabuľke 7. Po rozpipetovaní 9,5 μl master mixu do jednotlivých jamiek 96-jamkovej doštičky alebo PCR stripov bola pridaná DNA o objeme 0,5 μl.

Tabuľka 7: Rozpis reagencií PCR Thermo Scientific master mixu

Master mix Thermo Scientific		
Reagencia	Riedenie	Objem (µl)
Thermo <i>Taq</i> DNA polymeráza	100x	
PCR pufor	10x	
MgCl ₂	16,6x	
PM	400x	
Eva Green	20x	
dNTP	125x	
H ₂ O	-	
	Celkom	

5.2.4 Príprava PCR mixu pre porovnávanie účinku Coral Load a Q roztoku

U PyroMark PCR Kitu a HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu boli porovnávané amplifikácie s použitím Q roztoku a Coral Load koncentrátu. Každá možná varianta bola porovnávaná v duplikáte wt DNA (označenej číslom 9690), a obsahovala negatívnu kontrolu. DNA bola amplifikovaná primerovou zmesou č. 501. Použité reagencie i s výpočtom (rovnakým postupom ako v predchádzajúcich kapitolách) pre 3 analyzované vzorky sú uvedené v Tabuľke 8 a 9.

Tabuľka 8: Rozpis reagencií PCR HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu s rozdielnym objemom Coral Load

Porovnanie rozdielych objemov CoralLoad u HotStartTaq <i>Plus</i> Master Mix Kitu			
	Riedenie	Výpočet (µl)	
HotStartTaq <i>Plus</i> Master Mix	2x	17,55	17,55
PM	400x	0,1	0,1
Coral Load	10x	3,51	0
Eva Green	20x	1,755	1,755
H ₂ O	-	10,425	13,935

Tabuľka 9: Rozpis reagencií PyroMark PCR Kitu s rozdielnym objemom Q roztoku a Coral Load

Porovnanie rozdielych objemov CoralLoad a Q roztoku u PyroMark PCR Kitu					
PyroMark PCR Kit	Riedenie	Výpočet (µl)			
PyroMark PCR MasterMix	2x	17,55	17,55	17,55	17,55
PM	400x	0,1	0,1	0,1	0,1
Q roztok	5x	7,02	7,02	0	0

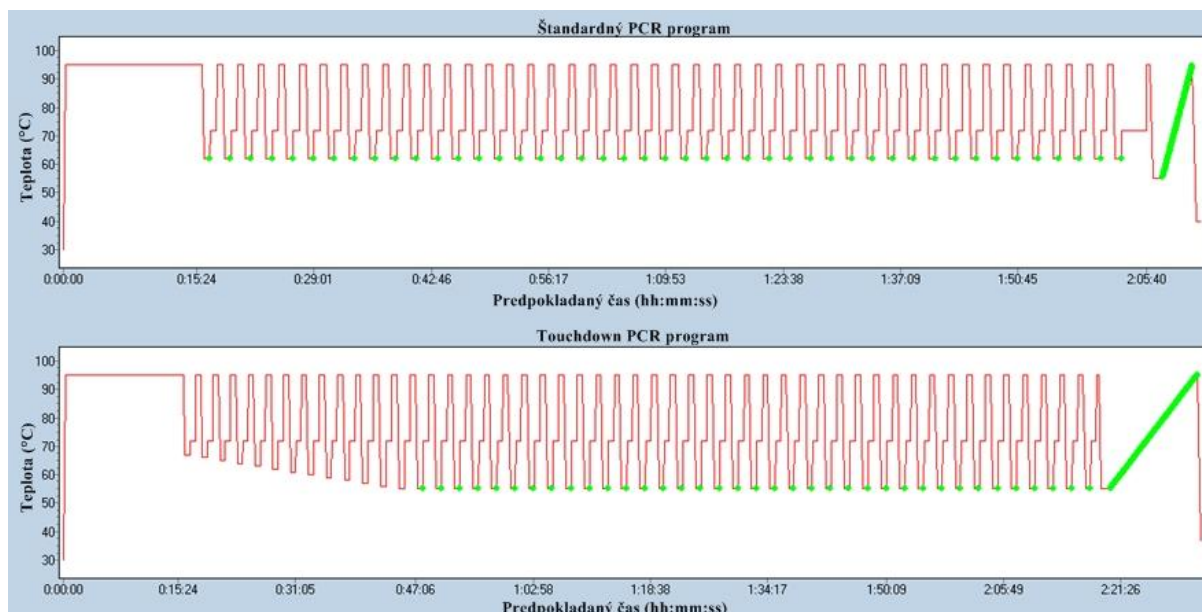
Tabuľka 9 - pokračovanie					
Porovnanie rozdielych objemov CoralLoad a Q roztoku u PyroMark PCR Kitu					
CoralLoad	10x	3,51	0	3,51	0
Eva Green	20x	1,755	1,755	1,755	1,755
H ₂ O	-	3,405	6,915	10,43	15,69

5.3 Nastavenie PCR programu LC 480

Analyzované vzorky boli v LC 480 amplifikované pomocou touchdown PCR programu. Touchdown PCR amplifikuje DNA pri vysokej hybridizačnej teplote (T_A), ktorá sa v počiatočných cykloch znižuje na úroveň T_A štandardnej PCR. Touchdown program v LC 480 je uvedený v Tabuľke 10. Vizualizácia touchdown programu v porovnaní so štandardným PCR programom je uvedená na Obr. 14.

Tabuľka 10: Vizualizácia touchdown PCR programu

Touchdown PCR program			
Názov programu	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (hh:mm:ss)
Aktivácia	1	95 °C	00:15:00
Touchdown	13	95 °C	00:00:30
		68 °C → 55 °C	00:00:30
		72 °C	00:00:30
PCR amplifikácia	37	95 °C	00:00:30
		55 °C	00:00:30
		72 °C	00:00:30
Topenie (melting)	1	95 °C	00:00:10
		55 °C	00:01:00
		95 °C	00:00:00
Chladnutie (cooling)	1	37 °C	00:00:01



Obr. 14: Porovnanie štandardného PCR programu a touchdown PCR programu

5.4 Optimalizácia pyrosekvenačnej analýzy

Príprava vzorkov na pyrosekvenačnú analýzu spočíva v imobilizácii amplikonov na guľičky Streptavidin Sepharose[®] High Performance, čím sa pripraví jednoreťazcový úsek DNA, na ktorý je hybridizovaný sekvenačný primer.

5.4.1 Imobilizácia PCR produktov na guľičky Streptavidin Sepharose[®] High Performance

Pred analýzou na systéme PyroMark Q96 je potrebné imobilizovať templát DNA na guľičky Streptavidin Sepharose[®] High Performance. Sepharosové guľičky boli pretrepaním homogenizované. Podľa rozpisu reagencií v Tabuľke 11 bol pripravený master mix pre imobilizáciu DNA. Master mixu bol pripravený v objeme o 10 % väčšom než bol objem pre celkový počet vzoriek. Pri analýze amplikonu v objeme 10 µl bol pre celkový počet vzoriek použitý objem master mixu 70 µl, u amplikonu v objeme 15 µl bol pre celkový počet vzoriek použitý objem master mixu 65 µl (viz Tabuľka 11). Ku amplikonom v 96-jamkovej doštičke alebo PCR stripe bolo pridaných 70 µl resp. 65 µl imobilizačného master mixu. Po uzavretí zmesi fóliami alebo viečkami boli vzorky miešané pri 1400 ot./min, pri laboratórnej teplote (15 – 25 °C) po dobu 5 – 10 min. Vzorky boli kvôli rýchlej sedimentácii sepharosových kuličiek ihneď po miešaní prečistené na vaukovej stanici.

Tabuľka 11: Rozpis reagensíí pre imobilizáciu PCR produktov na Streptavidin Sepharose[®] High Performance guličky

Master mix pre imobilizáciu DNA	
Zložka	Objem/vzorka (µl)
Streptavidin Sepharose [®] High Performance	3
Väzbový pufr PyroMark	40
H ₂ O	28 (resp. 23)
Celkový objem	70 (resp. 65)

5.4.2 Príprava vzoriek pred pyrosekvenačnou analýzou

Použitý sekvenačný primer bol hybridizačným pufrom PyroMark nariadený na 0,4 µM. 40 µl nariadeného sekvenačného primeru bolo prenesených na doštičku PyroMark Q96. PCR doštička (resp. stripy) a Pyromark Q96 doštička boli uložené do vaukovej stanice. Filtračné sondy vakuovej hlavice boli po zavedení prívodu vakua na 15 s spustené do PCR doštičky. Vakuová hlavica bola prenesená do vaničky s 40 ml 70 % etanolu. Po 5 s preplachovaní bola vakuová hlavica prenesená do vaničky s 40 ml denaturačného roztoku a preplachovaná po dobu 5 s. Vakuová hlavica bola prenesená do vaničky obsahujúcej 50 ml premývacieho pufru nariadeného 10x a preplachovaná po dobu 10 s. Vakuová hlavica bola po dobu 5 s zdvihnutá z vaničky a naklopená zvislo cez 90 °. Po prenesení vakuovej hlavice nad PyroMark Q96 doštičku bol prívod vakua vypnutý a filtračné sondy boli ponorené do roztoku sekvenačných primerov. Filtračné sondy boli spustením vakua premyté v destilovanej vode a vzorky v doštičke PyroMark Q96 boli na predhriatom stojane po dobu 2 min ohriate na 80 °C. Po zahriatí vzorky vychladli na laboratórnu teplotu. Lyofilizovaná zmes enzýmov a zmes substrátov boli rozpustené vo vode a podľa schémy výrobcu napipetované do kazety PyroMark Q96.

6. Výsledky

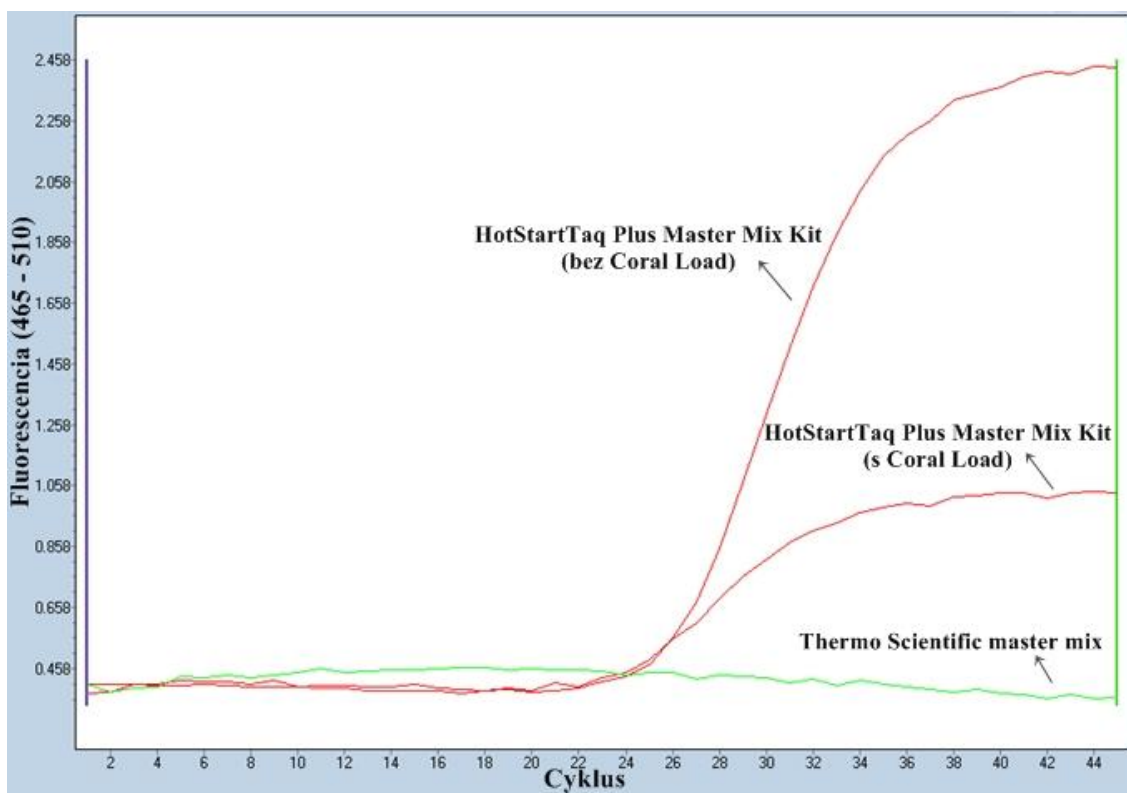
Cieľom experimentálnej časti diplomovej práce boli návrh primerov pre všetky testované mutácie (Kapitola 5.1), optimalizácia podmienok amplifikácie analyzovaných vzoriek (Kapitoly 6.1, 6.2, 6.3) a návrh a optimalizácia pyrosekvenačnej analýzy (Kapitola 6.4). Súčasťou cieľov diplomovej práce bola i diagnostika *KRAS* a *NRAS* mutácií v patientských vzorkách pyrosekvenačnou technológiou (Kapitola 6.5).

6.1 Amplifikácia DNA pomocou HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu a Thermo Scientific master mixu

Amplifikácia DNA bola porovnávaná pomocou HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu (porovnávané boli varianty master mixu s i bez prítomnosti Coral Load koncentrátu) a Thermo Scientific master mixu. Podľa rozpisu prípravy master mixu z HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu (viz kapitola 5.2.2) a master mixu Thermo Scientific (viz kapitola 5.2.2) boli analyzované vzorky wt DNA pre *KRAS* 146, *NRAS* 12/13 a *NRAS* 59/61. U každej analýzy bola zaradená voda ako negatívna kontrola (výsledky nepublikované). Výsledok amplifikácie wt DNA je uvedený v Tabuľke 12 vo forme hodnoty Cp (crossing point). Cp udáva moment nahromadenia amplifikovaného produktu, kedy dochádza k zvýšeniu množstva fluorescencie nad pozadím. Použitím master mixu Thermo Scientific nedošlo u žiadnej vzorky k amplifikácii. Z Tabuľky 12 vyplýva, že Cp hodnoty sú u DNA amplifikovanej bez Coral Load koncentrátu nižšie než s jeho prídavkom. HotStartTaq *Plus* Master Mix Kit umožnil lepšiu amplifikáciu vzoriek u varianty bez Coral Load, než u varianty s jeho prídavkom. Ukážka amplifikačných kriviek pre každý použitý mix je zobrazená na Obr. 15. Na Obr. 15 je viditeľné i zníženie fluorescencie u amplifikácie DNA master mixom s pridaným Coral Load koncentrátom.

Tabuľka 12: Porovnanie hodnôt Cp u variant HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu a Thermo Scientific master mixu

PM	DNA	Cp - HotStartTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (s Coral Load)	Cp - HotStartTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (bez Coral Load)	Cp - Thermo Scientific master mix
KRAS 146	9843	-	27,14	-
	9690	23,16	20,78	-
NRAS 12/13	9843	32,70	26,39	-
	9690	26,70	24,17	-
NRAS 59/61	9843	29,89	24,90	-
	9690	24,70	22,5	-



Obr. 15: Ukážka amplifikačných kriviek DNA u HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu (varianty s i bez Coral Load koncentrátu) a Thermo Scientific master mixu

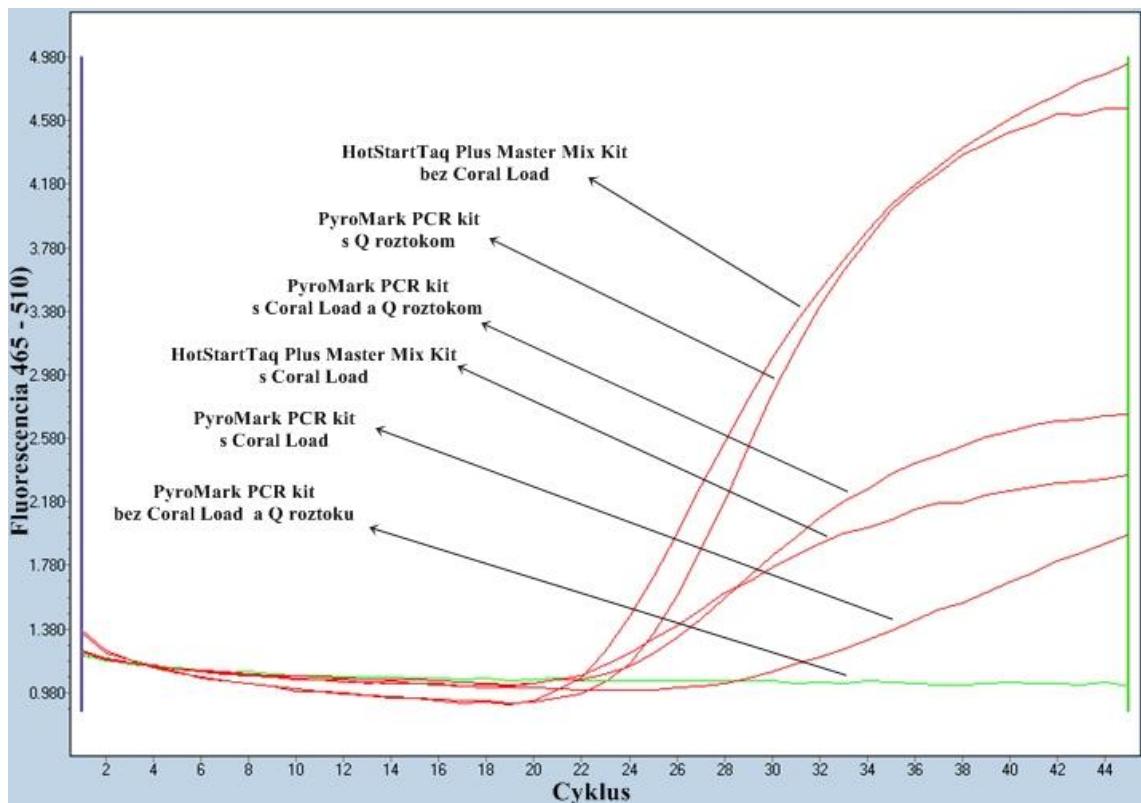
6.2 Amplifikácia DNA pomocou HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu a PyroMark PCR Kitu

Vplyv prítomnosti koncentrátu Coral Load a Q roztoku na amplifikáciu DNA bol porovnávaný u HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu a PyroMark PCR kitu (rozpís viz kapitola

5.2.3). Analyzované boli vzorky wt DNA 9690 s primerovou zmesou *KRAS* 12/13 v duplikáte spolu s negatívnou kontrolou (výsledky negatívnej kontroly neuvedené). Výsledky vo forme Cp hodnoty sú uvedené v Tabuľke 13. Amplifikačné krivky vybraných vzoriek pre všetky testované varianty sú uvedené na Obr. 16. Z údajov z Tabuľky 13 a Obr. 16 je viditeľné, že amplifikovaná DNA mala vyšší nárast fluorescence a nižšiu Cp hodnotou u HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu bez prídavku Coral Load a u PyroMark PCR kitu s Q roztokom, bez Coral Load. Prídavok samotného Coral Load u oboch kitov znížil fluorescenciu. U master mixu PyroMark PCR kitu s Coral Load bez Q roztoku bol zaznamenaný slabý fluorescenčný signál. U master mixu PyroMark PCR kitu bez Coral Load a Q roztoku nedošlo k amplifikácii u žiadnej vzorky.

Tabuľka 13: Porovnanie hodnôt Cp u variant HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu a PyroMark PCR kitu

DNA	Cp – HotStart-Taq <i>Plus</i> Master Mix Kit (s Coral Load)	Cp – HotStart-Taq <i>Plus</i> Master Mix Kit (bez Coral Load)	Cp – PyroMark PCR kit (s Coral Load, Q roztokom)	Cp – PyroMark PCR kit (bez Coral Load, bez Q roztoku)	Cp – PyroMark PCR kit (iba s Q roztokom)	Cp – PyroMark PCR kit (iba s Coral Load)
9690	23,90	22,24	24,12	-	24,20	28,00
9690	-	22,20	24,00	-	25,33	27,90



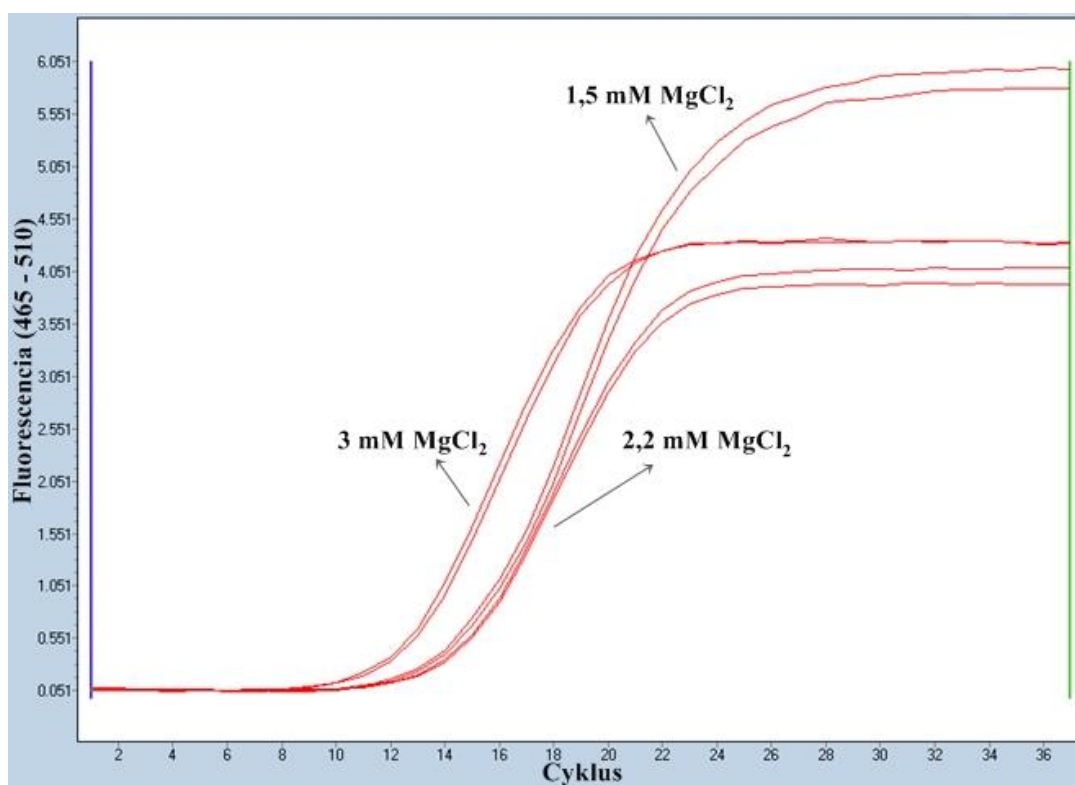
Obr. 16: Ukážka amplifikačných kriviek DNA za použitia HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu a PyroMark PCR kitu (varianty s i bez Coral Load koncentráту a Q roztoku)

6.3 Porovnanie vplyvu rozdielnej koncentrácie $MgCl_2$ na amplifikáciu DNA

Po porovnaní troch variant master mixov (Thermo Scientific master mix, HotStartTaq *Plus* Master Mix Kit a PyroMark PCR kit) bol pre ďalšiu prácu využívaný HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu bez pridaného Coral Load koncentráту. Pomocou HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu (rozpís viz kapitola 5.2.2, bez prítomnosti Coral Load koncentráту) bol porovnávaný vplyv rozdielnej koncentrácie $MgCl_2$: 1,5 mM, 2,2 mM a 3 mM na amplifikáciu DNA. Analyzované boli vzorky wt DNA v duplikáte pre všetky testované primerové zmesi. Výsledky amplifikácie u duplikátov sú ako C_p hodnoty uvedené v Tabuľke 14. Na Obr. 17 sú zobrazené rozdiely v amplifikačných krivkách DNA v duplikáte (príklad s primerovou zmesou pre pozíciu *NRAS* 117) pre všetky tri testované koncentrácie $MgCl_2$. Z údajov uvedených v Tabuľke 14 vyplýva, že C_p hodnota amplifikovaných vzoriek bola vo všeobecnosti nižšia u master mixu s koncentráciou $MgCl_2$ 3 mM, a vyššia u master mixov s 2,2 mM $MgCl_2$ a 1,5 mM $MgCl_2$.

Tabuľka 14: Porovnanie hodnôt Cp u HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu o testovaných koncentráciach MgCl₂ 1,5 mM, 2,2 mM a 3 mM, uvedené pre oba duplikáty

PM	DNA	Cp (1,5 mM MgCl ₂)		Cp (2,2 mM MgCl ₂)		Cp (3 mM MgCl ₂)	
<i>KRAS</i> 12/13	10214	18,23	17,61	11,6	12,55	10,48	10,44
<i>KRAS</i> 59/61	10214	14,39	23,73	12,38	11,42	11,42	11,58
<i>KRAS</i> 117	10214	16,49	22,62	13,6	13,68	13,57	13,44
<i>KRAS</i> 146	10214	10,32	12,13	9,54	9,56	9,21	8,97
<i>NRAS</i> 12/13	10214	17,57	17,89	15,82	15,84	13,79	15,6
<i>NRAS</i> 59/61	10214	11,22	10,99	11,15	10,73	11,64	11,49
<i>NRAS</i> 117	10214	12,05	11,79	12,46	12,38	10,45	10,15
<i>NRAS</i> 146	10214	11,77	11,81	9,99	9,82	9,75	9,91



Obr.17: Amplifikačné krivky analyzovanej DNA po použití 1,5 mM, 2,2 mM a 3 mM MgCl₂

6.4 Optimalizácia pyrosekvenačných analýz

6.4.1 Nastavenie dispensation order

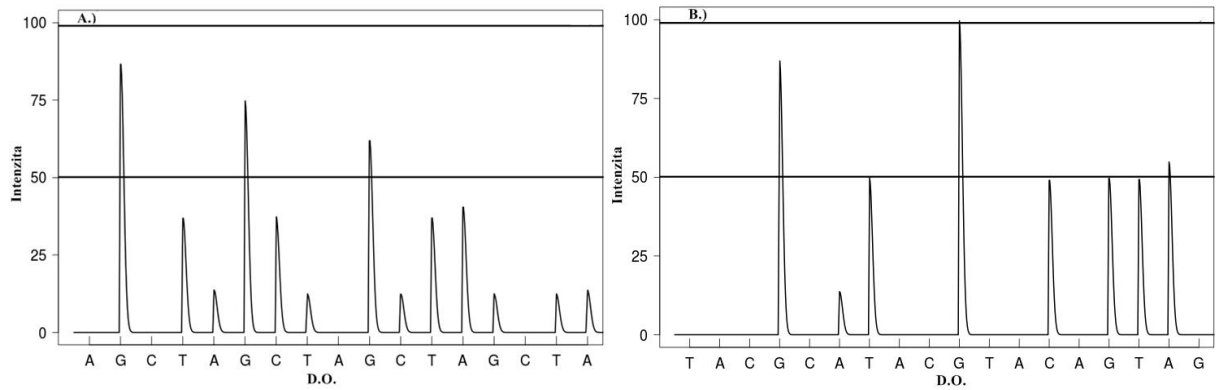
Pre úspešné pyrosekvenovanie vzoriek je potrebné nastaviť správne dispensation order (D.O.) – poradie, v ktorom sú jednotlivé nukleotidy vkladané do komory so sekvenačnými

reakciami. D.O. bolo navrhnuté pomocou voľne dostupného programu Pyromaker, ktorý generuje teoretické pyrogramy na základe užívateľských nastavení.

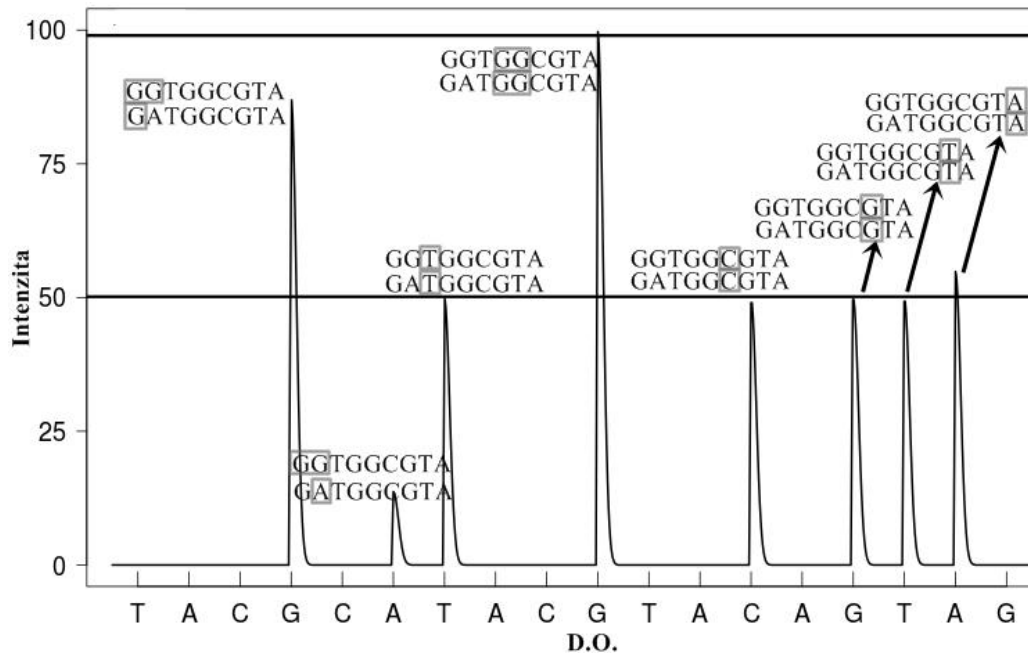
Miesto využitia cyklického D.O. (cyklicky sa opakujúca štvorica nukleotidov) bolo D.O. optimalizované (rozdielne poradie nt) samostatne pre všetky analyzované kodóny. Obr. 18 demonštruje rozdiely v pyrogramoch analyzovaného úseku *KRAS* kodónu 12 pri nastavení cyklického a optimalizovaného D.O. Pri použití rozdielných D.O. dochádza u rovnakej analyzovanej sekvencii k tvorbe rozdielných pyrogramov. Cyklický D.O. pri mutácii *KRAS* kodónu 12 (GGT → GAT) spôsobuje rozdiely v synchronizácii sekvenovaných reťazcov (tzv. *out of phase* – stav mimo fázu), čo generuje nadbytočné píky a komplikuje interpretáciu pyrogramov.

Fáza je definovaná ako relatívna pozícia DNA polymerázy na sekvenovanom vlákne. Sekvenované mutantné i wt vlákna DNA sú vo fázi v momente, keď sú zoradené na rovnakej pozícii. Desynchronizáciu spôsobuje rozdielna pozícia bazí elongujúcich sa sekvenujúcich vlákien. Optimalizovaný D.O. počas sekvenácie udržiava elongujúce sa reťazce DNA vo fázi. Na Obr. 19 je znázornené nastavenie optimalizovaného D.O. (gén *KRAS* analýza kodónov 12 a 13) so synchronizovanými sekvenovanými reťazcami DNA (stav vo fázi). Obr. 20 u rovnakej sekvencii demonštruje desynchronizovaný stav pri cyklickom D.O.

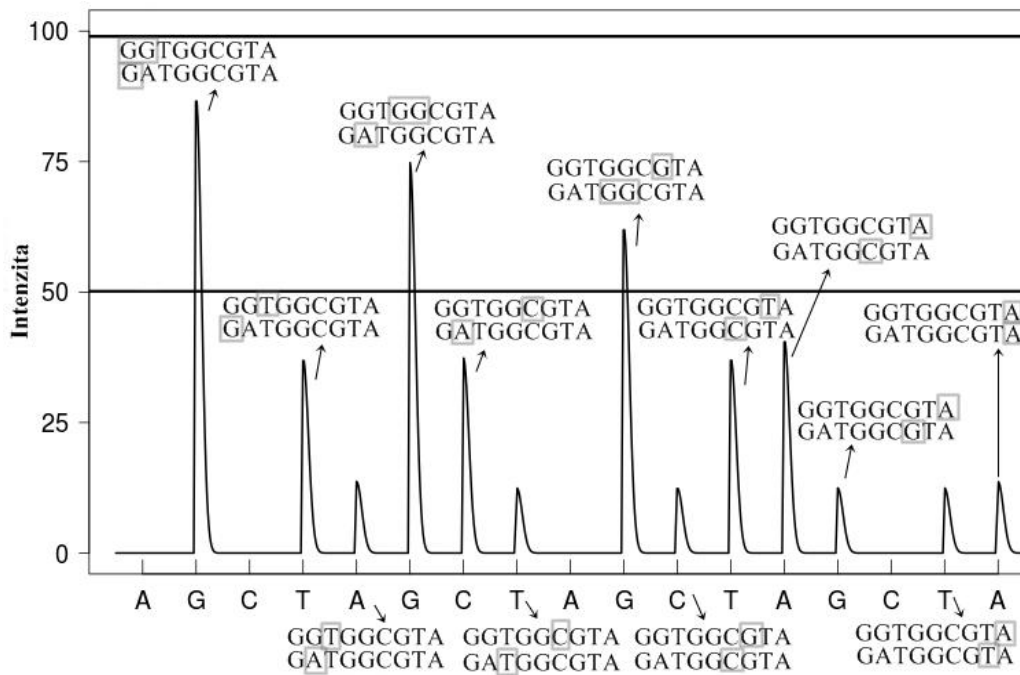
D.O. boli u testovaných kodónov navrhnuté pre všetky možné kombinácie mutácií (tzn. u každého kodónu pre všetky varianty každého nukleotidu). D.O. bolo optimalizované i pre kodóny, u ktorých boli sekvenačné primery prevzaté z cudzích zdrojov. Na Obr. 21 je porovnaný D.O. génu *NRAS* (kodón 146) navrhnutý autormi sekvenačného primeru (Jung a kol., 2013) a novo navrhnutý optimalizovaný D.O. pre všetky kombinácie mutácií kodónu. D.O. používaný autormi sekvenačného primeru nedokázal zachytiť všetky možné mutácie kodónu 146.



Obr. 18: Porovnanie cyklického D.O. (A) a optimalizovaného D.O. (B) u mutovanej sekvencie *KRAS* v kodóne 12 (wt: GGTGGCGTA, mutant: G(A)TGGCGTA, pri nastaveniach: 50 % buniek obsahujúcich mutáciu, mutant 100 %, chromozómový status heterozygot), simulácia v programe Pyromaker

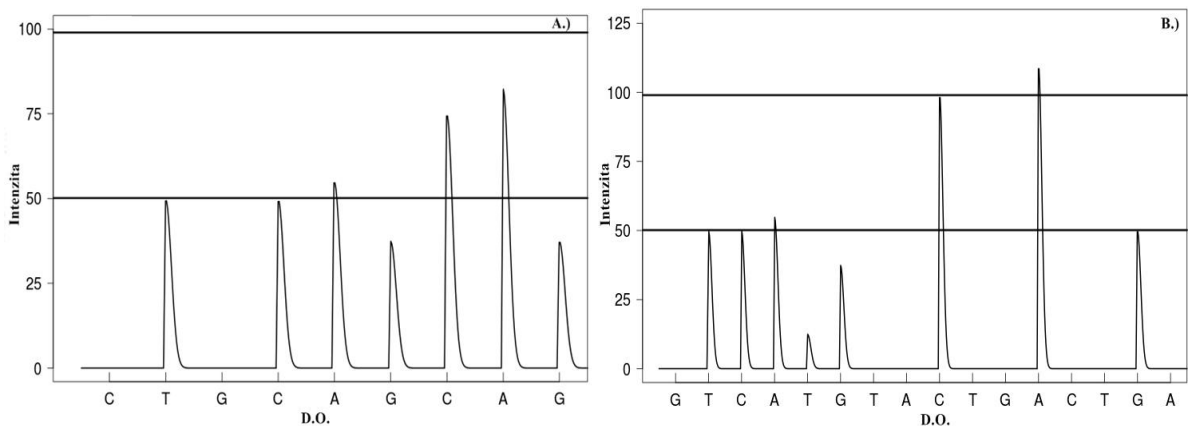


Obr. 19: Ukážka sekvenovaných reťazcov v stave vo fázi optimalizovaného D.O. pre *KRAS* mutáciu kodónu 12 (wt: GGTGGCGTA, mutant: G(A)TGGCGTA, pri nastaveniach: 50 % buniek obsahujúcich mutáciu, mutant 100 %, chromozómový status heterozygot), simulácia v programe Pyromaker



D.O.

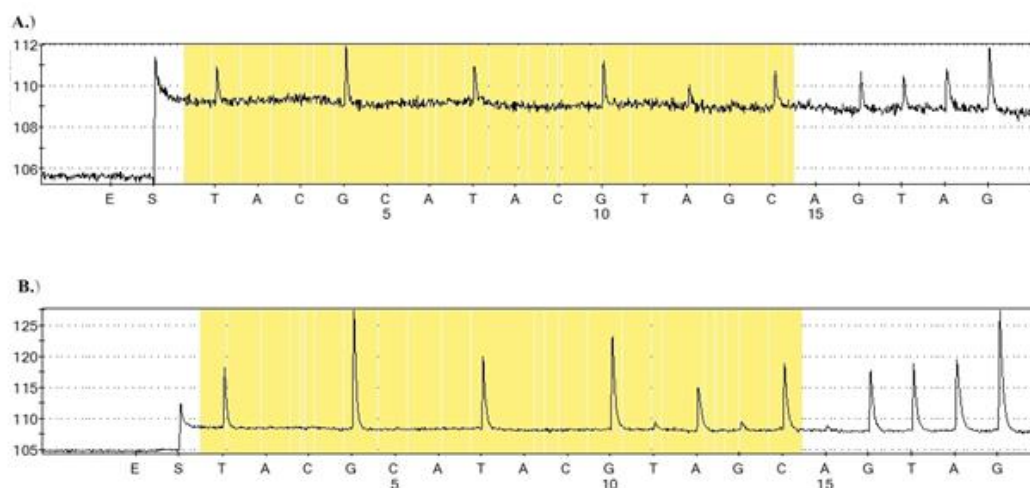
Obr. 20: Ukážka sekvenovaných reťazcov v desynchronizovanom stave mimo fáze cyklického D.O. pre *KRAS* mutáciu kodónu 12 (wt: GGTGGCGTA, mutant: G(A)TGGCGTA, pri nastaveniach: 50 % buniek obsahujúcich mutáciu, mutant 100 %, chromozómový status heterozygot), simulácia v programe Pyromaker



Obr. 21: Porovnanie D.O. autorov sekvenáčného primeru (A.) a novo optimalizovaného D.O (B.) pre *NRAS* mutáciu kodónu 146 (wt: TCAGCCAAG, mutant: TCA(T)CCAAG, pri nastaveniach: 50 % buniek obsahujúcich mutáciu, mutant 100 %, chromozómový status heterozygot), simulácia v programe Pyromaker

6.4.2 Vplyv objemu amplikonu na pyrosekvenačnú analýzu

Vplyv rozdielneho objemu amplikonu na pyrosekvenačnú analýzu bol analyzovaný porovnaním amplikonov použitých v reakčnom objeme 10 μ l a 15 μ l (rozpis viz kapitola 5.2.2). Analyzované boli vzorky patientskej DNA s 52 % mutácie *KRAS* v kodóne 13 (GGC \rightarrow GAC). Vzorky rovnakej koncentrácie boli v trojitom opakovaní amplifikované pomocou HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu bez prídavku Coral Load koncentráту s 3 mM koncentráciou MgCl₂. Vplyv purifikácie a rozdielneho reakčného objemu na výsledné pyrogramy u vybranej analyzovanej vzorky *KRAS* je zobrazený na Obr. 22. Na Obr. 22 je viditeľné, že vo výsledných pyrogramoch pri analýze vzoriek vo vstupnom objeme 15 μ l došlo k zvýšeniu fluorescencie a zníženiu šumu, u prečistenej vzorky naopak nie je viditeľný nijaký detekovaný pík.



Obr. 22: Porovnanie pyrogramov sekvenovaného úseku *KRAS* kodónov 12 a 13 patientskej DNA pri použití 10 μ l (A), 15 μ l (B) PCR reakčného mixu (*KRAS* wt: TGGTGGCGTAG, mutant: TGGTG(A)CGTAG)

6.4.3 Stanovenie citlivosti pyrosekvenačnej analýzy

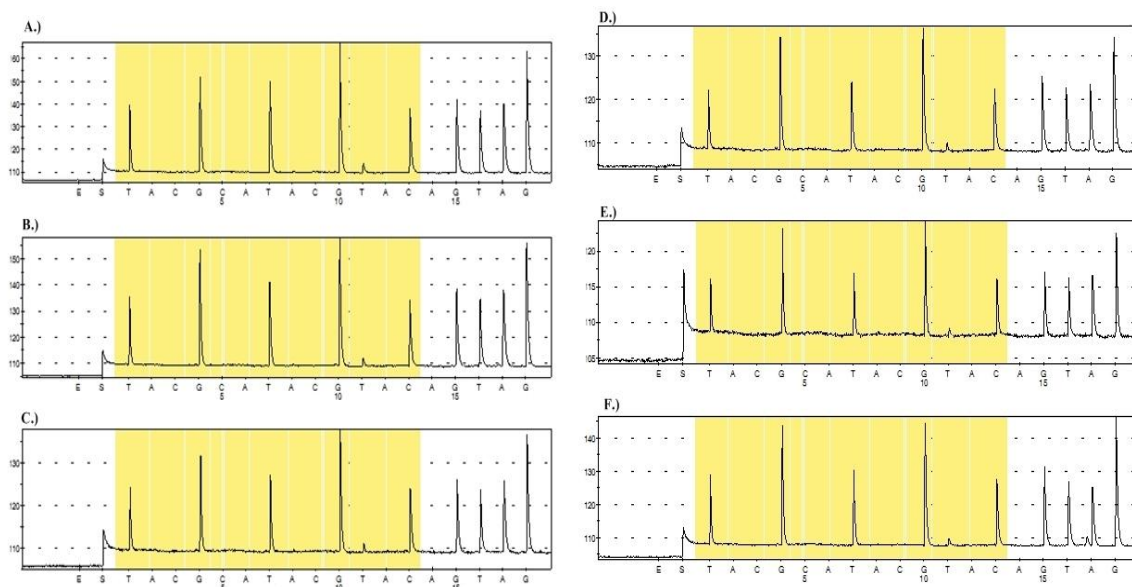
6.4.3.1 Rozsah podielu mutácie vstupného materiálu

Analytická citlivosť detekčnej súpravy PyroMark bola pre každú testovanú oblasť stanovená zmiešaním mutovanej DNA s wt DNA. Mutovaná i wt DNA boli riedené vodou na výslednú koncentráciu 20 ng/ μ l. Pri stanovení citlivosti sa vychádzalo z približne 50 % mutácie vo vzorke mutovanej DNA. Mutovaná DNA bola následne zmiešaná s wt DNA v pomere 1:1 (2x), 1:3 (4x), 1:7 (8x), 1:15 (16x) a 1:31 (32x). Vzorky boli v duplikátoch

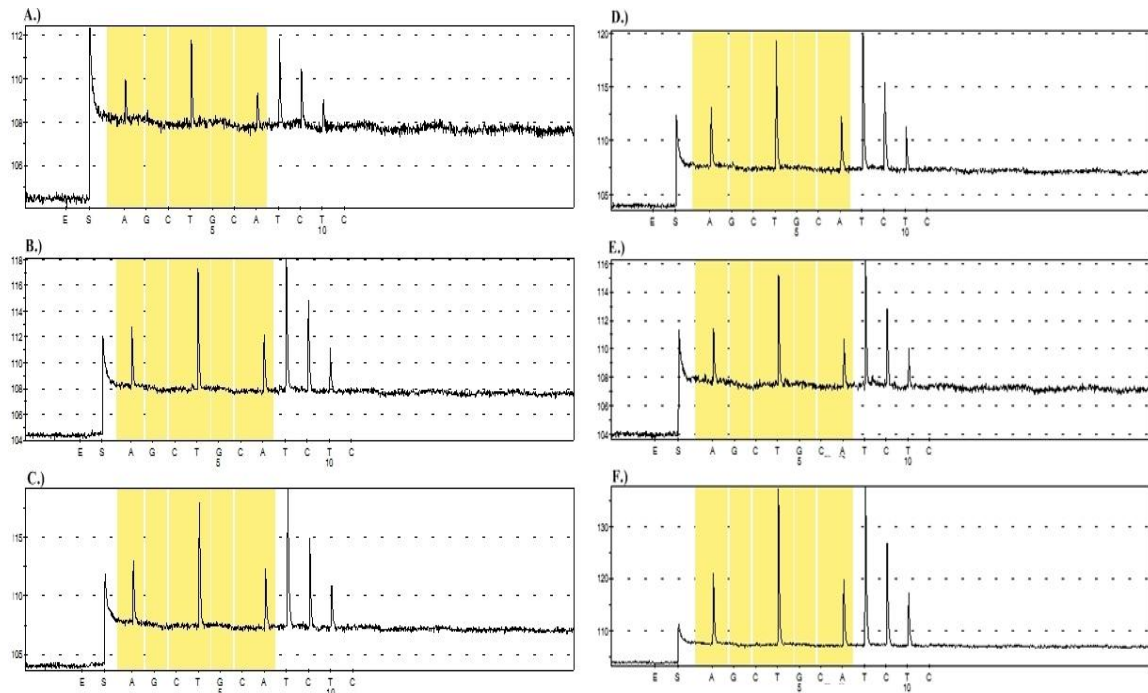
amplifikované pomocou HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu bez prídavku Coral Load koncentrátu s 3 mM koncentráciou MgCl₂.

Vybrané pyrogramy mutačnej rady *KRAS* kodónov 12 a 13 (u analyzovanej vzorky bolo prítomných 44 % mutácie, riedených s wt DNA na 22 %, 11 %, 5,5 %, 2,75 % a 1,32 %) sú zobrazené na Obr. 23. U všetkých riedení bola zachytená mutácia G12V (GGT → GTT).

Na Obr. 24 sú zobrazené pyrogramy mutačnej rady *KRAS* analyzovaného kodónu 117, ktorý bol amplifikovaný sekvenačným primerom v obrátenom (reverse) smere. U analyzovanej vzorky bolo prítomných 47 % mutácie, riedenej s wt DNA na 23,5 %, 11,75 %, 5,87 %, 2,9 % a 1,47 %. V prípade sekvenácie vzorky sekvenačným primerom v reverse smere je daná vzorka analyzovaná v komplementárnom prepise. U analyzovanej vzorky bola zachytená mutácia K117N (AAA → AAT) do prítomnosti 2,9 % mutácie vo vzorke.



Obr. 23: Pyrogramy mutačnej rady *KRAS* kodónov 12 a 13 patientskej DNA, riedených z 44 % (A.) na 22 % (B.), 11 % (C.), 5,5 % (D.), 2,75 % (E.) a 1,32 % (F) mutácie (*KRAS* wt: TGGTGGCGTAG, mutant: TG(T)TGGCGTAG)



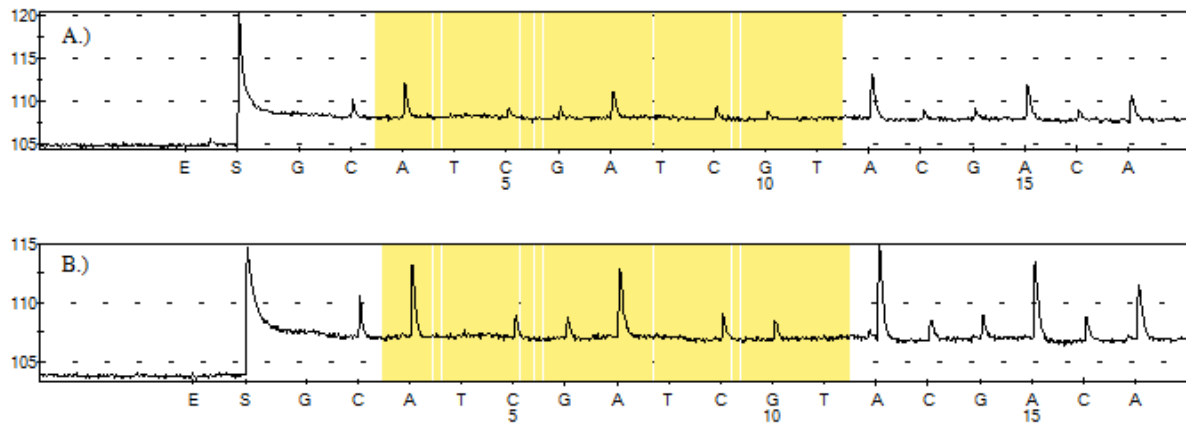
Obr. 24: Pyrogramy mutačnej rady *KRAS* kodónu 117 patientskej DNA, riedené z 47 % (A.) na 23,5 % (B.), 11,75 % (C.), 5,87 % (D.), 2,9 % (E.) a 1,47 % (F) mutácie (*KRAS* wt: AGGAAATAAAAT, mutant: AGGAAATAA(T)T)

6.4.3.2 Rozsah celkového množstva vstupného materiálu

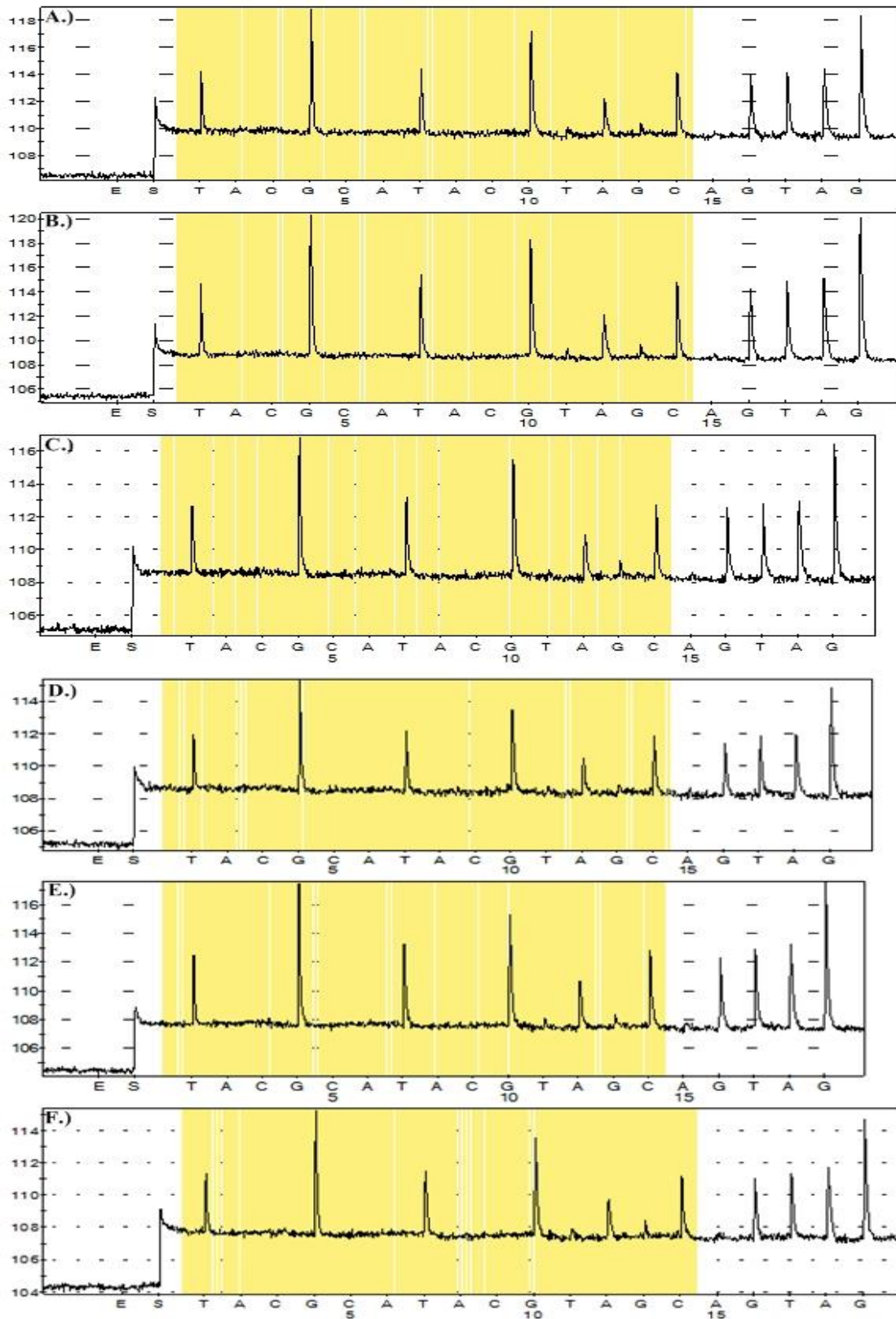
Analytická citlivosť detekčnej súpravy bola okrem mutačnej rady stanovená i pomocou koncentračnej rady. Analyzované vzorky boli v duplikátoch amplifikované pomocou HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu bez prídavku Coral Load koncentráту s 3 mM koncentráciou MgCl₂. 15 µl PCR produktu bolo použitých pre pyrosekvenačnú analýzu.

KRAS s mutáciou v kodóne 146 (47,8 % mutácie) bola riedená z 20 ng/µl na 0,156 ng/µl. Pri interpretácii pyrogramov bola viditeľná desynchronizácia sekvenovaných reťazcov (viz Obr. 25, vybrané riedenia 20 ng/µl na 0,156 ng/µl). Vo všetkých prípadoch bola potvrdená mutácia A146T (GCA → ACA).

DNA analyzovaná pre oblasť *KRAS* 12/13 (51,7 % mutácie) bola vodou riedená na koncentráciu 20 ng/µl, 15 ng/µl, 10 ng/µl, 5 ng/µl, 2,5 ng/µl a 1,75 ng/µl. Vybrané pyrogramy *KRAS* analyzovaných kodónov 12 a 13 riedených s vodou na uvedené koncentrácie sú zobrazené na Obr. 26. Vo všetkých riedeniach vzoriek bola preukázaná mutácia G13D (GGC → GAC).



Obr. 25: Pyrogramy *KRAS* kodónu 146, patientska vzorka DNA riedená na 20 ng/μl (A.), 0,156 ng/μl (B.) (*KRAS* wt: CAGCAAAGACA, mutant: CAACAAAGACA)



Obr. 26: Pyrogramy *KRAS* kodónov 12 a 13 pacientskej DNA, vzorka riedená na 20 ng/μl (A.), 15 ng/μl (B.), 10 ng/μl (C.), 5 ng/μl (D.), 2,5 ng/μl (E.) a 1,75 ng/μl (F.) (*KRAS* wt: TGGTGGCGTAGGC, mutant: TGGTG(A)CGTAGGC)

6.5 Diagnostika mutácií patientskych vzorkov

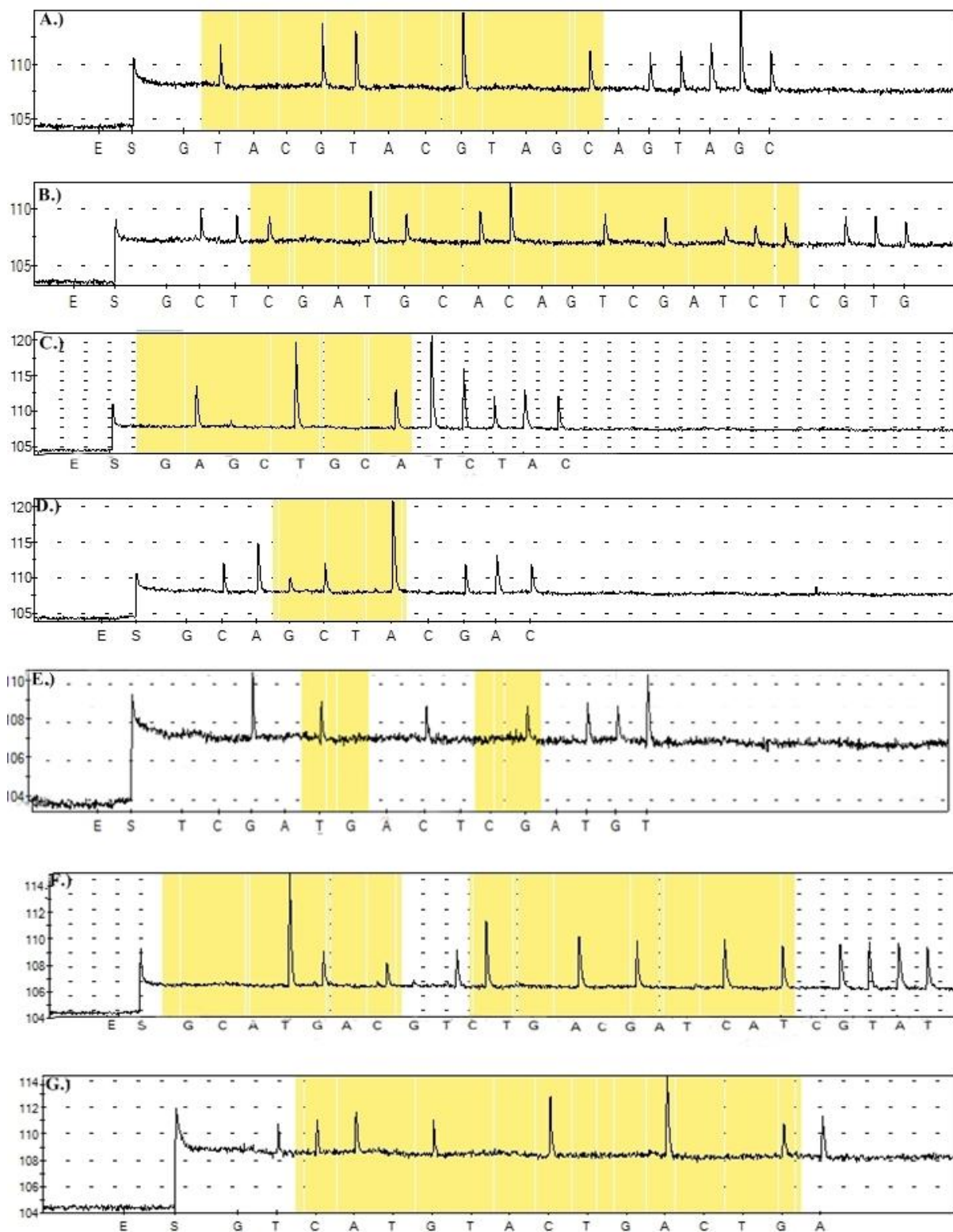
Schopnosť detekčnej súpravy PyroMark zachytiť mutácie v patientských vzorkách bola preukázaná u všetkých testovaných mutácií, s výnimkou mutácie *NRAS* kodónu 117. Na pracovisku DNA laboratória ÚMTM nebola v čase testovania prístupná vzorka s mutáciou *NRAS* 117. Analyzované vzorky o rozdielnom množstve mutácie boli pre pyrosekvenáčnú analýzu amplifikované pomocou HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu bez prídavku Coral Load koncentráta s 3 mM koncentráciou MgCl₂.

Výsledky typizácie získané detekčnou súpravou PyroMark boli porovnávané s dostupnými sekvenáčnými údajmi získanými zo sekvenátora MiSeq (Illumina). Sekvenáčné údaje zo sekvenátora MiSeq boli poskytnuté pracovníkmi ÚMTM. PyroMark detekoval mutácie u všetkých analyzovaných kodónov i v prípade, že vzorky boli sekvenované pred finálnou optimalizáciou D.O. pre jednotlivé mutácie.

Analyzované vzorky, typ, množstvo mutácie a koncentrácia vzorky je uvedená v Tabuľke 15. Pyrogramy z detekčnej súpravy Pyromark pre každú analyzovanú mutáciu sú uvedené na Obr. 27.

Tabuľka 15: Diagnostika mutácií génov *KRAS* a *NRAS* sekvenovaných pomocou MiSeq a PyroMark detekčných súprav

Mutácia	DNA	c (ng/μl)	% mutácie	Záver MiSeq	Záver PyroMark
<i>KRAS</i> 12/13	10245	20	44 %	G12V	G12V
<i>KRAS</i> 59/61	10192	20	31,7%	A59T	A59T
<i>KRAS</i> 117	10008	20	47 %	K117N	K117N
<i>KRAS</i> 146	9758	20	47,8 %	A146T	A146T
<i>NRAS</i> 12/13	10015	20	100 %	G13R	G13R
<i>NRAS</i> 59/61	10262	20	20 %	Q61K	Q61K
<i>NRAS</i> 117	Neprítomná vzorka s mutáciou				
<i>NRAS</i> 146	2843	20	14,2 %	A146T	A146T



Obr. 27: Pyrogramy všetkých analyzovaných mutácií DNA pacientov - A.) *KRAS* 12/13 wt: TGGTGGCGTAGGC, mutant: TG(T)TGGCGTAGGC, B.) *KRAS* 59/61 wt: CACAGCAGGTCAAGAG, mutant: CACA(A)CAGGTCAAGAG, C.) *KRAS* 117 wt: GTAGGAAATAAAT, mutant: GTAGGAAATAA(T)T, D.) *KRAS* 146 wt: CAGCAAAGAC,

mutant: CA(A)CAAAGAC, E.) *NRAS* 12/13 wt: GGTGGTGTT, mutant: GGT(C)GTGTT,
F.) *NRAS* 59/61 wt: ATACAGCTGGACAA, mutant: ATACAGCTGGA(A)AA, G.) *NRAS*
146 wt: TCAGCCAAAGA, mutant: TCA(A)CCAAAGA

7. Diskusia

Predložená diplomová práca sa zaoberá sekvenáciou vybraných mutácií *RAS* génov. Jedným z cieľov diplomovej práce bolo zavedenie pyrosekvenačnej analýzy génov *KRAS* a *NRAS* na pracovisko DNA laboratória ÚMTM. Pyrosekvenačná analýza bola optimalizovaná na úrovni prípravy vzoriek (PCR) i užívateľských nastavení pyrosekvenácie.

Pre efektívnu amplifikáciu DNA boli u každého analyzovaného exónu navrhnuté primery (v oboch smeroch amplifikácie – F, R a sekvenačný primer) a vytvorený touchdown PCR program amplifikácie.

Amplifikácia vzoriek pre pyrosekvenovanie bola porovnávaná použitím troch typov master mixov – z PyroMark PCR Kitu, HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu (obsahujúce aditíva Coral Load a Q roztok) a Thermo Scientific. Porovnaním jednotlivých master mixov bol nakoniec pre ďalšiu amplifikáciu DNA vybraný HotStartTaq *Plus* Master Mix Kit – varianta bez prídavku Coral Load. Optimalizácia PCR bola prevedená i porovnaním rozdielnej koncentrácie $MgCl_2$ v reakčnej zmesi a rozdielneho objemu reakčnej zmesi použitej pre pyrosekvenáciu. Pre ďalšie analýzy bola používaná optimalizovaná reakčná zmes s 3 mM $MgCl_2$ a spracované amplikony sekvenované v objeme 15 μ l.

Pred samotnou sekvenačnou analýzou boli pre každú testovanú mutáciu optimalizované nastavenia pyrosekvenácie (dispensation order). Citlivosť pyrosekvenačnej analýzy bola stanovená na úrovni rozsahu podielu mutácie a celkového množstva vstupnej vzorky.

Priebeh amplifikácie a pyrosekvenačnej analýzy bol optimalizovaný návrhom F, R a sekvenačných primerov pomocou programu PyroMark Assay Design version 2.0 (Qiagen, Nemecko). PyroMark Assay Design poskytuje výber zo štyroch kvalít primerových súprav, ktoré sú pomocou algoritmu (stanovenie výpočtu neznáme) označené 4 farbami – modrá (najvyššia kvalita), žltá (stredná kvalita), oranžová (nízka kvalita) a červená (nevhodná kvalita). Na amplifikáciu a následnú pyrosekvenáciu boli vybrané primerové súpravy v najvyššej kvalite. U kvalít označených modrou a žltou farbou je uvedené, že minimálne 90 % navrhnutých primerových súprav umožňuje funkčné analýzy (PyroMark Assay Design Software Handbook, 2011). Pozícia sekvenačných primerov bola navrhnutá tak, aby

sekvenovali o jeden až niekoľko nukleotidov pred samotnou testovanou mutáciou, čím sa počas sekvenácie overila správnosť ich hybridizácie.

Vplyv rozdielneho zloženia master mixov na amplifikáciu DNA bol porovnávaný z master mixov PyroMark PCR Kitu, HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu a Thermo Scientific. Thermo Scientific master mix pozostával zo samostatných reagensí, ktoré neboli súčasťou jedného kitu. Pri amplifikácii HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitom a PyroMark PCR Kitom bol porovnávaný vplyv PCR aditív Coral Load koncentrátu a Q roztoku na amplifikáciu vzoriek.

Qiagen, 2010 uvádza štyri možné účinky prídavku Q roztoku do PCR master mixu: zlepšenie amplifikácie ťažšie amplifikovateľných úsekov, zvýšenie primer-templátovej špecificity, zhoršenie amplifikácie, alebo amplifikáciu bez viditeľného zlepšenia či zhoršenia. Koncentrát Coral Load slúži ako nanášacie farbivo umožňujúce elektroforetickú vizualizáciu PCR produktu, a zvyšuje špecifickosť PCR (Qiagen, 2010). Coral Load je v PCR manuáli pre pyrosekvenáciu pomocou súpravy PyroMark uvádzaný ako súčasť prípravy PCR reakčnej zmesi (Qiagen, 2011). Podľa Qiagen, 2010 by Coral Load nemal interferovať s väčšinou enzýmov, no jeho použitie nie je odporúčané bez následného prečistenia vzorky. Pri porovnaní amplifikačných kriviek došlo u master mixov s prídavkom Coral Load k zníženiu fluorescence. Zaznamenaný pokles v detekovanej fluorescencii môže byť spôsobený zložením koncentrátu. Coral Load je zložený z červeného a oranžového nanášacieho farbiva (druh farbív nešpecifikovaný), ktorým môže byť napr. Cresol Red (červené) a Orange G alebo Tartrazin (oranžové) farbivo. Pokles v detekovanej fluorescencii, viditeľný pri porovnávaní amplifikácie rozdielnymi master mixmi s prídavkom Coral Load, je teda možný následok interferencie Coral Load a použitého fluorescenčného farbiva EvaGreen, viažuceho sa na dsDNA, prípadne priamej väzby na dsDNA.

Najlepšie výsledky amplifikácie boli získané použitím PyroMark PCR Kitu s Q roztokom (bez Coral Load) a HotStartTaq *Plus* Master Mix Kitu (bez Coral Load). Pre ďalšie analýzy bol používaný HotStartTaq *Plus* Master Mix Kit (bez Coral Load), ktorý je v DNA laboratóriu ÚMTM dostupnejší a častejšie využívaný než PyroMark PCR Kit.

Postup pyrosekvenácie bol optimalizovaný vytvorením špecifického dispensation order (poradie vkladania nukleotidov do sekvenačnej komory, D.O.) pre každú analyzovanú mutáciu. U vzoriek, ktoré boli sekvenované pred nastavením optimálneho D.O., bol v súlade s publikovanou literatúrou pozorovaný desynchronizovaný stav, ktorý komplikoval

interpretáciu pyrogramov (Harrington a kol., 2013). Pre všetky testované mutácie, s výnimkou kodónu 61 génu *NRAS*, bol vytvorený optimalizovaný D.O. Wt sekvencia *NRAS* kodónu 61 je CAA. V prvom nukleotide (C) kodónu 61 (CAA) a teoretickej možnej mutácii (CAA → AAA) dochádza pri sekvenovaní v reverse smere k desynchronizácii reťazcov a zmene profilu pyrogramov. Podľa databázy COSMIC, 2014 dochádza konkrétne v kodóne 61 najčastejšie k mutácii CAA → AAA (79 z 153 prípadov, údaje z 2014-11-23). Pri interpretácii tejto mutácie je teda potrebné brať ohľad na možné komplikácie počas vyhodnotenia pyrogramov.

Pri príprave master mixu pre imobilizáciu DNA pomocou Streptavidin Sepharose® High Performance je v manuáli a literatúre používaný objem biotinylovaného PCR produktu 10 µl, s ktorým sa štandardne pracuje i v DNA laboratóriu ÚMTM, napríklad u metód *KRAS* CADMA a theascreen (Qiagen, 2011; Sundström a kol., 2010; Tsiatis a kol., 2010). Pri porovnaní pyrosekvenácie použitím 10 µl a 15 µl PCR produktu (pri zachovaní koncentrácií u oboch objemov) došlo pri testoch s 15 µl PCR produktu k viditeľnému zvýšeniu fluorescence a zlepšeniu čitateľnosti pyrogramov. Pre ďalšie pyrosekvenačné testy bol používaný objem 15 µl PCR produktu.

Príručka Qiagen, 2011 odporúča riediť analyzovanú DNA na koncentráciu 0,4 – 2 ng/µl. Pri porovnaní rozsahu celkového množstva vstupného materiálu bola u vzorky *KRAS* 12/13 zachytená mutácia G13D vo všetkých riedených vzorkách (riedené podľa dostupnosti množstva DNA 2x z 20 ng/µl na 1,75 ng/µl). Pri analýze *KRAS* 146 bola vzorka (z dostatočnej zásoby) riedená z 20 ng/µl dilučnou radou 2x na 0,156 ng/µl. Mutácia A146T bola potvrdená vo všetkých riedeníach, pričom však u všetkých riedení došlo k desynchronizácii sekvenovaných reťazcov, čo skomplikovalo interpretáciu pyrogramov. Desynchronizácia bola spôsobená D.O. pre *KRAS* 146, ktorý ešte nebol v čase analýzy citlivosti plne optimalizovaný. Výrazný pokles fluorescence pri riedení DNA nebol zaznamenaný.

Pri stanovení analytickej citlivosti z hľadiska detekovateľného percenta mutácie vo vzorku bola u vzorky *KRAS* 12/13 preukázaná prítomná mutácia do riedenia 1,3 %. Pri analýze kodónu 117 génu *KRAS* bola prítomnosť mutácie identifikovaná do riedenia 2,9 % mutácie vo vzorke. Prítomnosť mutovanej alely vo vzorke s mutáciou *KRAS* v kodóne 146 bola detekovaná do riedenia 6,1 % (dáta neuvedené). Namerané hodnoty analytickej citlivosti približne zodpovedajú 5 % detekčnému limitu pyrosekvenovania, uvádzanému v literatúre (Harrington a kol., 2013; Tsiatis a kol., 2010). Sundström a kol. (2010) uvádza nízke čitateľné

píky detekované i pri riedeniach 1,25 % - 2,5 % mutácie *KRAS*. V literatúre je ako možný faktor ovplyvňujúci detekčný limit pyrosekvenácie uvádzaná kvalita DNA, kvalita navrhnutých primerov, počet PCR cyklov atď. (Ogino a kol., 2005). Nami používané vzorky i vzorky používané Sundström a kol., 2010 a Tsiatis a kol., 2010 pochádzali z FFPE CRC. Tsiatis a kol., 2010 využíva PCR program s 38 cyklami amplifikácie, pričom sekvenciu použitých primerov neuvádza. Sundström a kol., 2010 neudáva sekvencie použitých primerov ani PCR program. Tsiatis a kol., 2010 i Sundström a kol., 2010 na pyrosekvenáciu využívali 10 µl biotinylovaného produktu.

Mutácie *RAS* je okrem pyrosekvenovania v súčasnosti možné detekovať množstvom komerčných detekčných súprav, založených na PCR amplifikácii alebo sekvenácii. Metódy založené na detekcii amplifikáciou zvyčajne poskytujú jednoduchšie pracovné protokoly a kratší čas nutný na prácu so vzorkami než pri sekvenáčnych analýzach. Hlavný nedostatok metód, ktoré nie sú založené na sekvenácii, spočíva v ich prednastavení na detekciu konkrétnych mutácií vo vybraných kodónoch, pričom však nezachytia všetky (teda i menej časté) varianty mutácií. Limit detekcie u uvedených CE-IVD detekčných súprav bol stanovený testovaním vybraných mutácií *KRAS* a *NRAS* (1 % LOD u exónov 2 a 3 *KRAS*, 5 % LOD u exónov 2 a 3 *KRAS* a *NRAS*): theascreen® RGQ – exón 2 *KRAS*, cobas® - exón 2 a kodón 61 *KRAS*, StripAssay - exón 2 a kodón 61 *KRAS*, Infiniti® *KRAS*-*BRAF* Assay - exón 2 a kodón 61 *KRAS*, LightMix® Kit *KRAS*-*NRAS* – exón 2 *KRAS*, theascreen *NRAS* & *KRAS* Pyro (PyroMark) – exón 2 a kodón 61 *KRAS* a *NRAS*) (Krieken, 2014). Pri porovnaní pyrosekvenácie a HRM analýzy umožňuje HRM menej citlivú detekciu vzoriek - s 10 % obsahom mutácie, pričom výsledok HRM analýzy je potrebné potvrdiť i inou metódou (Tsiatis a kol., 2010). HRM vo vzorkách neidentifikuje konkrétne mutované sekvencie, čo môže byť problém predovšetkým u FFPE vzorkov, a môže tak zvyšovať množstvo falošne pozitívnych výsledkov. CE-IVD súprava theascreen® RGQ umožňuje detekciu mutácií v porovnateľnej citlivosti s pyrosekvenovaním. theascreen® RGQ zachytí približne 1 % mutácie, detekuje však iba 7 mutácií kodónov 12 a 13 *KRAS* (Kotoula a kol., 2009; Malapelle a kol., 2014). CE-IVD detekčná súprava cobas® detekuje *RAS* mutácie o podobnej citlivosti ako pyrosekvenovanie (LOD cobas® 2,5 % – 5 %) z FFPE vzoriek, umožňuje však detekciu iba 20 mutácií *KRAS* (Harlé a kol., 2013; Lee a kol., 2012). CE-IVD *KRAS* a *NRAS* StripAssay súpravy umožňujú citlivejšie detekcie *RAS* mutácií než pyrosekvenovanie s citlivosťou detekcie 1 %, pričom umožňujú detekciu 13 mutácií *KRAS* a 12 mutácií *NRAS* (Jancik a kol., 2012; Malapelle a kol., 2014). CE-IVD značený kit Infiniti® *KRAS*-*BRAF*

Assay (AutoGenomics) detekuje 19 mutácií génu *KRAS* v kodónoch 12, 13 a 61 (INFINITI® KRAS-BRAF Assay, 2013). French a kol., 2011 uvádza detekčný limit Infiniti® technológie 10 %. LightMix® Kit KRAS-NRAS je CE-IVD detekčná súprava umožňujúca detekciu 38 mutácií v génoch *KRAS* a *NRAS* s citlivosťou detekcie 1 % (LightMix Kit KRAS-NRAS, 2013).

Sekvenačné platformy umožňujú detekovať presnú sekvenciu mutovanej vzorky, s možnosťou identifikácie i vzácné sa vyskytujúcich mutácií. „Zlatý štandard“ sekvenačných technológií, Sangerovo sekvenovanie, umožňuje sekvenáciu dlhších úsekov (do 900 bp), čo však u detekcie mutácií *RAS* z FFPE nie je nutnosťou. Limit detekcie u Sangerovho sekvenovania je nižší než u väčšiny detekčných súprav – približne 20 % (Altimari a kol., 2013; Shendure a kol., 2008; Tsiatis a kol., 2010). Pyrosekvenovanie umožňuje detekciu kratších sekvencií (približne 50 nt) s limitom detekcie 5 % (Malapelle a kol., 2014; Ogino a kol., 2005), čo je výhodné predovšetkým pri diagnostike mutácií z FFPE vzoriek. Jednou z uvádzaných výhod pyrosekvenovania je možnosť sekvenovať DNA bez predchádzajúcej potreby purifikácie PCR produktov (Ogino a kol., 2005), a v porovnaní s technológiami novej generácie vyžaduje kratší čas strávený prípravou vzoriek. Sekvenačné technológie novej generácie umožňujú paralelnú citlivú sekvenáciu veľkého množstva vzoriek, avšak medzi ich nevýhody patrí pomerne vysoká cena prístrojov a reagensií, náročná príprava a dlhá doba spracovania a analýzy vzoriek. Pracovný postup MiSeq vychádza z: 1) príprava amplikonov (celkovo 3 hod: príprava DNA, reakčnej zmesi, PCR doštičky, qPCR - PCR program približne 2 hod), 2) príprava knižnice na sekvenáciu (tagmentácia Nextera XT – spojenie amplikonov, purifikácia magnetickými guľčkami, kvantifikácia (celkovo cca 60 min), tagmentácia a neutralizácia vzoriek (30 min), indexačná PCR a jej kontrola, purifikácia magnetickými guľčkami, kvantifikácia indexovaných primerov a kontrola koncentrácie poolu – celkovo 4 hod), 3) sekvenovanie, 4) analýza výsledkov (3 hod). Pracovný postup PyroMark je založený na: 1) príprava amplikonov (príprava DNA, reakčnej zmesi, PCR doštičky – celkovo 1 hod, qPCR - PCR program približne 2 hod 20 min), 2) imobilizácia PCR produktov na streptavidinové guľčky (približne 20 min) 3) príprava vzoriek na pyrosekvenáciu (príprava sekvenačných primerov, purifikácia a hybridizácia vzoriek na vakuovej stanici – celkovo približne 20 min) 4) sekvenovanie (15 – 60 min), 5) analýza výsledkov (1 hod). Pracovný postup MiSeq vyžaduje 2,5 – 3 dní v porovnaní s 4 – 5 hod u PyroMark. NGS technológia 454 Roche je rovnako ako PyroMark založená na pyrosekvenovaní (postup viz kapitola 3.4.9.1) a umožňuje citlivejšiu detekciu mutácií (pomer testovaných pozitívnych vzoriek

k celkovým testovaným, pozitívnym, vzorkám 1 % - 5 % v porovnaní s 5 % u PyroMark) (Altimari a kol., 2013). Firma Roche však v priebehu roku 2016 plánuje ukončenie technickej podpory 454 pyrosekvenačnej platformy (Seven Days: 18–24 October 2013, 2013).

Pyrosekvenovanie poskytuje citlivú detekciu vyžadovaných *RAS* mutácií na úrovni sekvencie DNA, s krátkym časom stráveným prácou so vzorkami. V DNA laboratóriu ÚMTM teda môže pyrosekvenovanie slúžiť ako vhodná alternatíva k zavedenej sekvenovacej platforme MiSeq, Illumina. V prípade malého množstva analyzovaných vzoriek, kedy sekvenácia pomocou MiSeq nie je finančne a časovo výhodná, prípadne pri overení správnosti záveru MiSeq môžu byť jednotlivé *RAS* mutácie detekované pyrosekvenačne pomocou súpravy PyroMark.

8. Záver

Mutácie *KRAS* a *NRAS* sa musia vyšetrovať z FFPE vzoriek kolorektálneho karcinómu, pretože biologická liečba je efektívna iba u pacientov s wt stavom *RAS* génov. Predložená diplomová práca sa zaoberá detekciou mutácií uvedených prediktívnych biomarkerov pomocou pyrosekvenačnej technológie.

V súčasnosti nejestvuje jednotná referenčná metóda určená pre diagnostiku *RAS* mutácií. Genotypizačné laboratória môžu na *RAS* diagnostiku využiť komerčne dostupné detekčné súpravy založené na PCR, ktoré však nedetekujú všetky mutácie, resp. nedetekujú všetky potrebné exóny. Pyrosekvenovanie poskytuje citlivú detekciu všetkých vyžadovaných *RAS* kodónov na úrovni sekvencie DNA.

Cieľom diplomovej práce bolo zavedenie pyrosekvenačnej analýzy na pracovisko DNA laboratória ÚMTM a diagnostika mutácií v patientských vzorkách.

Príprava PCR produktu pre nasledovnú pyrosekvenáciu bola optimalizovaná porovnaním troch rozdielnych master mixov, a porovnaním vplyvu aditív na amplifikáciu pomocou zvolených master mixov. Pred amplifikáciou bola rovnako optimalizovaná i koncentrácia $MgCl_2$ reakcie a vytvorený touchdown PCR program, umožňujúci špecifickú amplifikáciu všetkých primerových zmesí v jednom kole amplifikácie.

Samotná pyrosekvenácia bola optimalizovaná pre každú analyzovanú mutáciu nastavením špecifického poradía nukleotidov vkladaneého do pyrosekvenačnej reakcie. Vplyv rozdielneho množstva amplikonu pre pyrosekvenačnú analýzu bol porovnávaný použitím 10 μ l a 15 μ l PCR produktu. Citlivosť pyrosekvenačnej analýzy bola stanovená diagnostikou vzoriek o rozdielnom množstve mutácie a koncentrácii. Schopnosť pyrosekvenačnej platformy zachytiť mutácie vo všetkých analyzovaných kodónoch bola potvrdená analýzou patientských vzoriek o rôznom mutačnom statuse. Správnosť výsledku pyrosekvenácie u patientských vzoriek bola overená dátami pochádzajúcimi z inej sekvenačnej platformy (MiSeq, Illumina).

V súčasnosti je na ÚMTM stanovená analytická citlivosť pyrosekvenácie z hľadiska množstva mutácie pre štyri z ôsmich resp. siedmich analyzovaných kodónov (nedostupná mutácia *NRAS* kodónu 117). Plány pre ďalšie testy spočívajú v stanovení analytickej citlivosti podielu mutácií v zvyšných vzorkách, rovnako ako i rutinnej diagnostike patientských vzoriek. Pyrosekvenácia pomocou PyroMark bude na ÚMTM slúžiť ako jedna zo sekvenačných metód detekujúcich *RAS* mutácie u pacientov s kolorektálnym karcinómom.

9. Použitá literatura

Altimari, A., deBiase, D., De Maglio, G., Gruppioni, E., Capizzi, E., Degiovanni, A., D'Errico, A., Pession, A., Pizzolitto, S., Fiorentino, M., Tallini, G. (2013): 454 next generation-sequencing outperforms allele-specific PCR, Sanger sequencing, and pyrosequencing for routine KRAS mutation analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *OncoTargets and Therapy* 6: 1057 – 1064.

Bolton, L., Reiman, A., Lucas, K., Timms, J., Cree, IA. (2015): KRAS mutation analysis by PCR: A comparison of two methods. *PLoS One* 10(1): e0115672.

Bokemeyer, C., Kohne, KH., Ciardiello, F., Lenz, HJ., Heinemann, V., Klinkhardt, U., Beier, F., Duecker, K., Tejpar, S. (2014): Treatment outcome according to tumor RAS mutation status in OPUS study patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) randomized to FOLFOX4 with/without cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*. 32:15 3505.

Cox, AD., Der, CJ. (2002): Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biology & Therapy* 1(6): 599 – 606.

Douillard, JY., Siena, S., Cassidy, J., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., Rivera, F., Kocáková, I., Ruff, P., Blasinska-Morawec, M., Šmakal, M., Canon, JL., Rother, M., Oliner, KS., Wofl, M., Gansert, J. (2010): Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of Clinical Oncology* 28(31): 4697 – 4705.

Dušek, L., Zavoral, M., Májek, O., Suchánek, Š., Mužík, J., Pavlík, T., Šnajdrová, L., Gregor, J. *Kolorektum.cz – Program kolorektálního screeningu v České republice* [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2014. [cit. 2014-11-03]. Dostupný z WWW: <http://www.kolorektum.cz>. ISSN 1804-0888. Verze 1.6f.

Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Chaudhuri, BB., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., deWinter, A., Dixon, J., Foquet, M., Gaertner, A., Hardenbol, P., Heiner, C., Hester, K., Holden, D., Kearns, G., Kong, X., Kuse, R., Lacroix, Y., Lin, S., Lundquist, P., Ma, C.,

Marks, P., Maxham, M., Murphy, D., Park, I., Pham, T., Phillips, M., Roy, J., Sebra, R., Shen, G., Sorenson, J., Tomaney, A., Travers, K., Trulson, M., Vieceli, J., Wegener, J., Wu, D., Yang, A., Zaccarin, D., Zhao, P., Zhong, F., Korlach, J., Turner, S. (2009): Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 323: 133 – 138.

French, D., Smith, A., Powers, MP., Wu, AHB. (2011): *KRAS* mutation detection in colorectal cancer by a commercially available gene chip array compares well with Sanger sequencing. *Clinica Chemica Acta* 412: 17 – 18.

Gharizadeh, B., Kalantari, M., Garcia, CA., Johansson, B., Nyrén, P. (2001): Typing of human papillomavirus by pyrosequencing. *Laboratory Investigation* 81: 673 – 679.

Gonzales deCastro, D., Angulo, B., Gomez, B., Mair, D., Martinez, R., Suarez-Gauthier, A., Shieh, F., Velez, M., Brophy, VH., Lawrence, HJ., Lopez-Rios, F. (2012): A comparison of three methods for detecting *KRAS* mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *British Journal of Cancer* 107: 345 – 351.

Hall, A., Marshall, CJ., Spurr, NK., Weiss, RA. (1983): Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the *ras* gene family located on chromosome 1. *Nature* 303: 396 – 400.

Hancock, JF., Magee, AI., Childs, JE., Marshall, CJ. (1989): All *ras* proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57(7): 1167 – 1177.

Harlé, A., Busser, B., Rouyer, M., Harter, V., Genin, P., Leroux, A., Merlin, JL. (2013): Comparison of COBAS 4800 *KRAS*, TaqMan PCR and high resolution melting PCR assays for the detection of *KRAS* somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded colorectal carcinomas. *Virchows Archiv* 462:329 – 335.

Harrington, CT., Lin, EI., Olson, MT., Eshleman, JR. (2013): Fundamentals of pyrosequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine* 137: 1296 – 1303.

Chang, EH., Gonda, MA., Ellis, RW., Scolnick, EM., Lowy, DR. (1982): Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 4848 – 4852.

Chen, G., Olson, MT., O'Neill, AO., Norris, A., Beierl, K., Harada, S., Debeljak, M, Rivera-Roman, K., Finley, S., Stafford, A., Gocke, CD., Lin, MT., Eshleman, JR. (2012): A virtual pyrogram generator to resolve complex pyrosequencing results. *The Journal of Molecular Diagnostics* 14(2): 149 – 159.

Jancik, S., Drabek, J., Berkovcova, J., Xu, YZ., Stankova, M., Klein, J., Kolek, V., Skarda, J., Tichy, T., Grygarkova, I., Radzioch, D., Hajdich, M. (2012): A comparison of Direct sequencing, Pyrosequencing, High resolution melting analysis, TheraScreen DxS, and the K-ras StripAssay for detecting KRAS mutations in non small cell lung carcinomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 31(1): 79.

Jung, A., Sers, C., Schewe, C., Liffers, ST., Aust, D., Schäfer, KL., Lehmann, U., Penzel, R., Kloor, M. (2013): RAS mutation detection, detection of mutations in Exons 2, 3 and 4 of the KRAS and NRAS Oncogenes. *Handbook*.

Kothari, N., Schell, MJ., Teer, JK., Yeatman, T., Shibata, Kim, R. (2014): Comparison of KRAS mutation analysis of colorectal cancer samples by standard testing and next-generation sequencing. *Journal of Clinical Pathology* 67: 764 – 767.

Kotoula, V., Charalambous, E., Biesmans, B., Malousi, A., Vrettou, E., Fountzilias, G., Karkavelas, G. (2009): Targeter KRAS mutation assessment on patient tumor histologic material in real time diagnostics. *PLoS ONE* 4(11): e7746.

Ladanyi, M., Pao, W. (2008): Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Modern Pathology* 21 S16 – S22.

Lee, S., Brophy, VH., Cao, J., Velez, M., Heoppner, C., Soviero, S., Lawrence, HJ. (2012): Analytical performance of a PCR assay for the detection of KRAS mutations (codons 12/13 and 61) in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of colorectal carcinoma. *Virchows Archives* 460(2): 141 – 149.

Linggi B., Carpenter G. (2006): ErbB-4 s80 intracellular domain abrogates ETO2-dependent transcriptional repression. *J Biol Chem*. Sep 1;281(35): 25373-80.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. (2012): Comparison of next generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012.

- Liu, Y., Tang, J., Wakamatsu, Peter, Xue, H., Chen, J., Gaynon, PS., Shen, S., Sun, W. (2014): High-resolution melting curve analysis, a rapid and affordable method for mutation analysis in childhood acute myeloid leukemia. *Frontiers in Pediatrics* 2:96.
- Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N., Russo, A. (2002): Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *Journal of Cellular Physiology* 192: 125 – 130.
- Malapelle, U., Carlomagno, C., deLuca, C., Bellevicine, C., Troncone, G. (2014): KRAS testing in metastatic colorectal carcinoma: challenges, controversies, breakthroughs and beyond. *Journal of Clinical Pathology* 67: 1 – 9.
- Malik, I., Hecht, JR., Patnaik, A., Venook, A., Berlin, J., Croghan, G., Navale, L., MacDonald, M., Jerian, S., Meropol, NJ. (2005). Safety and efficacy of panitumumab monotherapy in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology* 23:16: 3520.
- Mardis, ER. (2008): The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics* 24:3 133 – 141.
- McGrath, JP., Capon, DJ., Smith, DH. (1983): Structure and organization of the human *Ki-ras* protooncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 304 (5926): 501 – 506.
- Medrara, AF., Santos, E. (2011): Ras in cancer and developmental diseases. *Genes & Cancer* 2 (3): 344 – 358.
- Metzker, ML. (2010): Sequencing technologies – the next generation. *Nature Review Genetics* 11: 31 – 46.
- Mikheyev, AS., Tin, MMY. (2014): A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Molecular Ecology Resources* 14: 1097 – 1102.
- Neuwirthová, J., Mechl, Z., Kostřica, R., Smilek, P. (2008): Panitumumab. *Remedia* 18: 67–69.
- Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Yan, L., Cantor, M., Namgyal, C., Mino-Kenudson, M., Lauwers, GY., Loda, M., Fuchs, CS. (2005): Sensitive sequencing method for

KRAS mutation detection by pyrosequencing. *Journal of Molecular Diagnostics* 7:3 413 – 421.

Pells, S., Divjak, M., Romanowski, P., Impey, H., Hawkins, NJ., Clarke, AR., Hooper, ML., Williamson, DJ. (1997): Developmentally-regulated expression of murine *K-ras* isoforms. *Oncogene* 15: 1781 – 1786.

Prior, IA., Lewis, PD., Mattos, C. (2012): A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research* 72(10): 2457 – 2467.

PyroMark Assay Design Software Handbook. (2011). Sample & Assay Technologies.

Quail, MA., Smith, M., Coupland, P., Otto, TD., Harris, SR., Connor, TR., Bertoni, A., Swerdlow, HP., Gu, Y. (2012): A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13:341.

Rothberg, JM., Hinz, W., Rearick, TM., Schultz, J., Mileski, W., Davey, W., Leamon, JH., Johnson, K., Milgrew, MJ., Edwards, M., Hoon, J., Simons, JF., Marran, D., Myers, JW., Davidson, JF., Branting, A., Nobile, JR., Puc, PB., Light, D., Clark, TA., Huber, M., Branciforte, JT., Stoner, IB., Cawley, SE., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinkas, R., Sokolsky, T., Fidanza, JA., Namsaraev, E., McKernan, KJ., Williams, A., Roth, GT., Bustillo, J. (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475: 348 – 352.

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

Shendure, J., Hanlee, J. (2008): Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26(10): 1135 – 1145.

Sundström, M., Edlund, K., Lindell, M., Glimelius, B., Birgisson, H., Micke, P., Borling, J. (2010): *KRAS* analysis in colorectal carcinoma: Analytical aspects of pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice. *BMC Cancer* 10:660.

therascreen® *KRAS* RGQ PCR Kit Handbook. (2012): Qiagen Manchester, UK.

Thissen, JA., Gross, JM., Subramanian, K., Meyer, T., Casey, PJ. (1997): Prenylation-dependent association of Ki-Ras with microtubules: evidence for a role in subcellular trafficking. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (48): 30362 – 30370.

Tsiatis, AC., Norris-Kirby, A., Rich, RG., Hafez, MJ., Gocke, CD., Eshleman, JR., Murphy, KM. (2010): Comparison of sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations. *Journal of Molecular Diagnostics* 12:4 425 – 432.

Vaughn, CP., ZoBell, SD., Furtado, LV., Baker, CL., Samowitz, WS. (2011): Frequency of *KRAS*, *BRAF* and *NRAS* mutations in colorectal cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer* 50:307 – 312.

Voelkerding, KV., Dames, SA., Durtschi, JD. (2009): Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry* 55:4 641 – 658.

Vyzula, R., Hoch, J., Kala, Z., Kiss, I., Obermannová, R., Petruželka, L., Prausová, J., Ryska, M., Tomášek, J., Válek, V., Vyzula, R., Zavoral, M. (2014): *Modrá kniha České onkologické společnosti*, pp. 63 – 81, Masarykův onkologický ústav, ISBN 978-80-86793-35-1.

Wennerberg, K., Rossman, KL., Der, CJ. (2005): The Ras superfamily at glance. *Journal of Cell Science* 118 (5): 843 – 846.

Internetové odkazy:

COSMIC. In: *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* [online]. 2014 [cit. 2014-10-13]. Dostupné z: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F.: *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* [online]. International Agency for Research on Cancer, Lyon (France) 2013. Dostupný z WWW: <http://globocan.iarc.fr>

GeneCards. In: *KRAS gene* [online]. 2014a [cit. 2014-10-13]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KRAS>

GeneCards. In: *NRAS gene* [online]. 2014b [cit. 2014-10-13]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NRAS&search=606d6234a2cf2e2d52b0ade7ed869ca5>

Infiniti® KRAS-BRAF Assay. *AutoGenomics* [online]. 2013 [cit. 2014-12-02]. Dostupné z: <http://www.autogenomics.com/pdf/EnglishPackageInsertforKRAS-BRAF.pdf>

LightMix Kit KRAS-NRAS. *TIP MOLBIOL* [online]. 2013 [cit. 2014-12-08]. Dostupné z: http://www.roche-as.es/logs/LightMix%C2%AE_40-0654-16_NRAS-KRASV131201a.pdf

Krieken, HV. (2014): European experience in RAS-testing and quality assessment. [online]. 2013 [cit. 2014-12-08]. Dostupné z: http://www.roche-as.es/logs/LightMix%C2%AE_40-0654-16_NRAS-KRASV131201a.pdf

Krieken, HV. In: *European experience in RAS-testing and quality assessment* [online prezentace]. 2014 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: http://worldgicancer.com/wcgi/WGIC2014/assets/download/presentations/thursday/Session-III-MTP/RAS-Testing/0800_van-Krieken_attendees.pdf

NCBI. In: *Homo sapiens Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), RefSeqGene on chromosome 12* [online]. 2014a [cit. 2014-10-13]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007524.1

NCBI. In: *Homo sapiens neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog (NRAS), RefSeqGene (LRG_92) on chromosome 1* [online]. 2014b [cit. 2014-10-13]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007572.1

Oxford Nanopore Technologies. In: *The MinION™ device: a miniaturised sensing system* [online]. 2014 [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: https://nanoporetech.com/uploads/Technology_New/MinION/mini_ion_300_open-copy.png?mw=720

Qiagen. *Taq PCR Handbook* [online]. 2010 [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=c73208eb-a83e-40c4-a9b6-ea5c4c94b9f4&lang=en>

Qiagen. *therascreen® NRAS Pyro Kit Handbook* [online]. 2011 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=cfae46ae-ef65-482e-9465-cb251ba5a379&lang=en>

Seven Days: 18–24 October 2013. *Nature* [online]. 2013 [cit. 2014-12-25]. Dostupné z: <http://www.nature.com/news/seven-days-18-24-october-2013-1.13994>

StripAssay® Evaluator. In: *KRAS StripAssay* [online]. 2013a [cit. 2014-11-28]. Dostupné z: http://viennalab.sci-design.at/webevaluator25/evaluate.php?assay=5-590_20120508

StripAssay® Evaluator. In: *NRAS StripAssay* [online]. 2013b [cit. 2014-11-28]. Dostupné z: http://viennalab.sci-design.at/webevaluator25/evaluate.php?assay=5-610_20140106

Tech Summary: Illumina's Solexa Sequencing Technology. *SEQanswers, the next generation sequencing community*[online]. 2007 [cit. 2014-12-27]. Dostupné z: <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21>

10. Zoznam použitých skratiek a symbolov

5-FU	5-fluorouracil
A	adenin
A	alanin
ADP	adenozíndifosfát
Ala	alanín
AMP	adenozínmonofosfát
ARMS	amplification-refractory mutation system
ASPE	analyte specific primer extension
ATP	adenozíntrifosfát
AP-1	activator protein 1
bp	base pair
BRAF	V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
C	cytosin
C	cystein
CCD	charge-coupled device
CE	Conformité Européene
CHO bunky	bunky vaječníka čínskeho škrečka <i>Cricetulus griseus</i>
Cp	crossing point
CRC	kolorektálny karcinóm
ČOS	Česká onkologická spoločnosť
D	kyselina asparágová
dATP	deoxyadenozíntrifosfát
dATP- α -S	deoxyadenozín- α -thiotrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ddNTP	dideoynukleotid trifosfát
dNMP	deoxynukleotid monofosfát
dNDP	deoxynukleotid difosfát
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
D.O.	dispensation order
dsDNA	double-stranded (dvojvláknová) DNA
E	kyselina glutámová
E2F	transkripčný faktor
EGF	epidermálny rastový faktor
EGFR	epidermal growth factor receptor
emPCR	emulzná PCR
ERK	gén
F	fenylalanín
FDA	food and drug administration
FFPE	formalin-fixed, parafin-embedded
FN	fakultná nemocnica
FOLFIRI	leukovorin, irinotekan, 5-FU
FOLFOX	leukovorin, oxaliplatina, 5-FU
G	guanín
G, Gly	glycín
Gln	glutamín
Glu	kyselina glutímová

GAP	GTPázu-aktivujúci proteín
GDP	guanozín difosfát
GTP	guanozín trifosfát
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
H	histidín
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRM	high resolution melting
I	izoleucín
IgG1	imunoglobín G, podtrieda 1
IVD	<i>in vitro</i> diagnostika
K	lyzín
kbp	kilobase pair
kDa	kilodalton
KRAS	Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog
L	leucín
LNA	locked nucleic acid
M	methionín
mAb	monoklonálna protilátka
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase
Mb	megabáza
MEK	gén
mRNA	mediátorová RNA
N	asparagín
nt	nukleotid
NGS	next generation sequencing
NF- κ B	jadrový faktor, nuclear factor- κ B
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
OS	overall survival
P	prolín
PBK	proteinkináza B
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PDK1	PIP3-dependentnú kinázu-1
PFS	progression-free survival
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PM	primerová zmes
PPi	pyrofosfát
PTP	pikotitračná doštička
Q	glutamín
qPCR	kvantitatívna PCR
R	arginín
RAS	Rat sarcoma
S	serín
SMRT	single molecule real time
ssDNA	single-stranded (jednovláknová) DNA
sstDNA	single-stranded (jednovláknová) templátová DNA

SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
SNP	single nucleotide polymorphism
SOS	son of sevenless
SPC	súhrn charakteristických vlastností liekov
T	tymín
T	treonín
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF α	transformujúci rastový faktor α
Tyr	tyrozín
U	uracil
V	valín
VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový faktor
wt	wild-type
X	akákoľvek aminokyselina
Y	tyrozín
ZMW	zero-mode waveguide

11.Prílohy

KRAS kodóny 12 a 13

5'GGCTGCTGAAAATGACTGAA3' 5'CTTGTGGTAGTTGGAGC3'
 |||
 5'GGCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAA3'
 |||
 5'TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT3'

KRAS kodóny 59 a 61

5'TGGAGAAACCTGTCTCTTGGATAT3' 5'CCTCATTGCACTGTACTC3'
 |||
 5'TGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGTCAAGAGGAGTACAGTGCAATGAGGGACCAGTA3'
 |||
 5'TACTGGTCCCTCATTGCACTGTA3'

KRAS kodón 117

5'TGAAGATGTACCTATGGTCCCTAGT3' 5'GTCTTAGAAGGCAAATCAC3'
 |||
 5'TGAAGATGTACCTATGGTCCCTAGTAGGAAATAAATGTGATTTGCCCTCTAGAACAGTAGACACAAAACAGGCTCAGGACTT3'
 |||
 5'AAGTCCCTGAGCCCTGTTTTGTG3'

KRAS kodón 146

5'AGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTT3' 5'AATTCCTTTTATTGAAACAT3'
 |||
 5'AGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTTATGGAATTCCTTTATTGAAACATCAGCAAGACAAAGACAGGTAAGTAACACTGAAATAAATACAGATCTG3'
 5'TTTCTGCAAAATCATAACTGTATGTCAATTAATATATCAGTTTTCTCTCAATTATGCTATACTAGGAAATAAAACAATATTTAGTAAATGT3'
 |||
 5'GCCCT3'

5'TTTGTCTCTTGAGAGGGC3'

|||

5'CTCAAGAGACAAAACAT3'

NRAS kodóny 12 a 13

5'GTTCTTGTCTGTGAAATGACT3' 5'GTGGTGGTTGGAGCA3'
 |||
 5'GTTCTTGTCTGTGAAATGACTGAGTACAACTGGTGGTGGTTGGAGCAGGTGGTGTGGGAAAAGCGCACTGACAATCCAGCTAATCCAGAA3'
 |||
 5'TTCTGGATTAGCTGGATTGTCAGT3'

NRAS kodóny 59 a 61

5'ACACCCCCAGGATTCTTACAGA3'
 |||
 5'ACACCCCCAGGATTCTTACAGAAAACAAGTGGTTATAGATGGTGAAACCTGTTTGTGGACATACTGGATACAGCTGGAAGAAGAGTACAGTG3'
 |||
 5'CATGGCACTGTAC3'

5'CCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGC3'

|||

5'TCTTC3' 5'GCCTGTCCTCATGTATTTGGTC3'

NRAS kodón 117

5'ATGATGTACCTATGGTGTCTAGTGG3'
 |||
 5'ATGATGTACCTATGGTGTCTAGTGGGAAACAAGTGTGATTTGCCAACAAAGGACAGTTGATACAAAACAAGCCACGAACTGGCCAAGAGTTAC3'
 |||
 5'TGGTGCCTAGTGGGAA3' 5'GTAACCTTTGGCCAGTTCGTG3'

NRAS kodón 146

5'CGAACTGGCCAAGAGTTACG3' 5'TCCATTCAATTGAAACC3'
 |||
 5'CGAACTGGCCAAGAGTTACGGGATTCATTCAATTGAAACCTCAGCCAAGACCAGACAGGTATGGTACAGCTTTCA3'
 |||
 5'TGAAAGCTGTACCATACTGTCTG3'

Obr. A: Schématické zaznačenie sekvencie používaných primerov a testovaných kodónov na vybranom ss úseku *KRAS* a *NRAS* (všetky sekvencie sú zobrazené v smere 5'→3', F primer označený oranžovou farbou, R primer označený fialovou farbou, sekvenačný primer označený zelenou farbou, testovaná wt sekvencia kodónu zvýraznená červenou farbou)