



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Zavedení vyšetření mutace V600E v genu BRAF  
v klinické laboratoři**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Markéta Vítková

**Vedoucí práce:** Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Zavedení vyšetření mutace V600E v genu BRAF v klinické laboratoři“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 14. 8. 2017

.....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala mé vedoucí práce Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. za možnost pracovat na své bakalářské práci v laboratoři Genlabs s.r.o., dále za její ochotu učit mě nové věci a za její trpělivost při realizaci jak praktické, tak i teoretické části této práce.

# Zavedení vyšetření mutace V600E v genu BRAF v klinické laboratoři

## Abstrakt

Rakovina kůže patří v dnešní době k velmi častým nádorovým onemocněním. Dokázáno je, že slunce a rakovina kůže spolu maximálně souvisí, a tak může postihnout kohokoliv, ale vyšší náklonnost vykazují lidé „světlých typů“ – s blondatými nebo zrzavými vlasy, světlou kůží a velkým množstvím pih. Nejčastější lokalizace kožních nádorů je na místech, která jsou dlouhodobě vystavená slunečnímu záření – oční víčka, nos, tváře, šíje, ramena a ruce. Nejčastějšími druhy rakoviny kůže jsou bazaliom, melanom a spinaliom.

Cílem mé bakalářské práce bylo osvojení si teoretických poznatků ohledně rakoviny kůže, především o maligním melanomu. Maligní melanom se na rozdíl od ostatních epiteliálních nádorů jako je bazaliom nebo spinaliom nevyznačuje lokálním destruktivním růstem, ale nebezpečím časného hematogenního nebo lymfogenního metastazování. Maligní melanom metastázuje nejčastěji do lymfatických uzlin, ale vzdálené metastázy se mohou objevit i v kůži, plicích, mozku a gastrointestinálním traktu, převážně v tenkém střevě. Za biologickou příčinu maligního melanomu můžeme považovat přítomnost mutací. Jednou z nejvýznamnějších a nejvíce popisovaných mutací v souvislosti s maligním melanomem je mutace genu BRAF V600E, která se vyskytuje v pozici 1799 v oblasti kodonu 600. Mutace kodonu GTG>GAG vede k záměně valinu za kyselinu glutamovou. Aktivace mutovaného BRAF proteinu je výsledkem konformačních změn v jeho struktuře. Mutované V600E BRAF buňky nepodléhají apoptóze a stárnutí, což má za následek nekontrolovatelný replikační potenciál buněk. V600E BRAF mutovaný melanom pak uniká imunitní odpovědi organismu.

V praktické části mé bakalářské práce bylo cílem osvojit si základní molekulárně biologické metody v genetické laboratoři. Především izolaci genomové DNA z buňkálního stěru i periferní krve, přípravu a provedení PCR reakce, přípravu agarózového gelu a detekci PCR produktů pomocí gelové elektroforézy. Vyšetření mutace V600E v genu BRAF jsem prováděla pomocí metody PCR-ARMS. Principem této metody je použití čtyř různých primerů schopných detekovat mutovanou i

nemutovanou sekvenci DNA během jednoho experimentu. Metodika byla převzata z práce Huang et al. (2013) a následně upravena pro potřeby laboratoře.

**Klíčová slova**

melanom; mutace; V600E; gen; BRAF; PCR-ARMS

# **Introducing the V600E Mutation Examination within the BRAF gene into a Clinical Laboratory**

## **Abstract**

Nowadays, skin cancer belongs among very frequent tumor diseases. It has been proven that sun and skin cancer are maximally related, and thus it may affect everyone, however, 'light-type' people – having blonde or ginger-coloured hair, light skin and high numbers of freckles – are much more likely to be affected. Skin tumors are most frequently localized in body areas that are exposed to sunshine in the long term, such as eyelids, nose, neck, shoulders and hands. The most frequent types of skin cancer are the following: Basaliom, Melanoma and Spinaliom.

The aim of my bachelor thesis was to acquire theoretical knowledge about skin cancer, especially about the Malignant Melanoma. The Malignant Melanoma is, unlike the other epithelial tumors, such as Basaliom or Spinaliom, not characterized by local destructive growth, but by the danger of an early haematogenic or lymphogenic metastasis. The Malignant Melanoma often metastasizes into lymph nodes, however, distant metastases may also appear in skin, lungs, the brain and gastro-intestinal tract, mainly in the small intestine. The presence of mutations may be understood to be the biological cause of the Malignant Melanoma. One of the most significant and most described mutations (in connection to the Malignant Melanoma) is the BRAF gene V600E mutation, appearing in position No. 1799 in the area of codon No. 600. Codon GTG>GAG mutation leads to the exchange of valin for glutamic acid. Activating the mutated BRAF protein is a result of conformation changes within the protein structure. The mutated V600E BRAF cells are not subject to apoptosis and aging, the result of which is an incontrollable replicational potential of the cells. The mutated V600E BRAF Melanoma then escapes the organism's immunity response.

The aim of the practical part of my bachelor thesis was to acquire the basic molecularly biological methods in a genetic laboratory. Mainly isolating the genom DNA obtained from a buccal swab as well as peripheral blood, preparing and carryng out a PCR reaction, preparing agarose gel, and detecting PCR products using gel electrophoresis. Mutation V600E within the BRAF gene examination was carried out via the PCR-ARMS method. The principle of this method relies in using four different

primers able to detect both mutated and unmutated DNA sequence during one experiment. The methodology was taken over from Huang et al. (2013) and subsequently adapted to the needs of the laboratory.

**Keywords**

Melanoma; mutation; V600E; gene; BRAF; PCR-ARMS

# Obsah

Úvod.....	10
1 Teoretická část .....	12
1.1 Mutace jako příčina nádorového onemocnění .....	12
1.2 Hereditární a sporadická maligní onemocnění.....	12
1.3 Melanocyty.....	13
1.4 Maligní melanom .....	13
1.5 Formy maligního melanomu .....	14
1.5.1 Povrchově se šířící maligní melanom.....	14
1.5.2 Nodulární melanom .....	15
1.5.3 Lentigo maligní melanom.....	15
1.5.4 Akrolentiginózní melanom .....	15
1.6 Gen BRAF.....	15
1.7 Kinázy a signální dráhy.....	17
1.7.1 MAPK signální dráha-RAS/RAF/MEK/ERK .....	17
1.7.2 Protein RAS .....	17
1.7.3 Protein RAF.....	18
1.7.4 Regulační kinázy MAPK a ERK .....	18
1.8 Onkogenomika v onkologické praxi .....	18
1.9 Léčba.....	21
2 Cíl práce.....	23
3 Metodika .....	24
3.1 Izolace genomové DNA .....	24
3.2 Fluorometrické stanovení koncentrace DNA.....	25
3.3 PCR.....	26
3.4 PCR-ARMS.....	27
3.5 Elektroforéza .....	28
4 Praktická část .....	30
4.1 Izolace genomové DNA z bukální sliznice.....	30
4.2 Měření koncentrace DNA .....	31
4.3 Amplifikace zdravé DNA se třemi různými PCR mixy.....	32



4.4	Příprava gelové elektroforézy .....	33
4.5	Gelová elektroforéza se zdravou DNA a třemi různými PCR mixy .....	34
4.6	Amplifikace mutované DNA .....	34
4.7	Gelová elektroforéza s mutovanou DNA .....	34
4.8	Amplifikace DNA s různými koncentracemi (gradient DNA) .....	35
4.9	Gelová elektroforéza s různými koncentracemi DNA .....	36
4.10	Opakování amplifikace DNA .....	37
4.11	Gelová elektroforéza opakované amplifikace DNA .....	37
5	Výsledky .....	39
5.1	Koncentrace DNA .....	39
5.2	Gelová elektroforéza se zdravou DNA a třemi různými PCR mixy .....	39
5.3	Gelová elektroforéza s mutovanou DNA .....	40
5.4	Gelová elektroforéza s různými koncentracemi DNA .....	41
5.5	Gelová elektroforéza opakované amplifikace DNA .....	42
6	Diskuze .....	44
7	Závěr .....	46
8	Seznam literatury .....	47
9	Seznam příloh a obrázků .....	51
10	Seznam zkratk .....	54

## Úvod

Sluneční záření má mnohočetné příznivé vlivy na člověka, např. podporuje tvorbu vitamínu D, který dále ovlivňuje kvalitu kostí a jejich tvrdost. Má nesporný vliv na psychiku člověka a přispívá k duševní pohodě (Dienstbier, 2010). Zároveň však vysílá i ultrafialové záření, které člověk také potřebuje, ale jen v určité míře (Borská, © 2015). Vlnová délka UV záření se pohybuje od 100 do 400 nm a na základě vlnové délky rozlišujeme UVC záření (100-280 nm), UVB záření (280-320 nm) a UVA záření (320-400 nm). Čím kratší je vlnová délka, tím je toto záření škodlivější (Dienstbier, 2010). Ozonová vrstva se stará o to, aby se na Zemi dostalo UV záření v potřebné míře pro všechny organismy. Nadměrné vystavení lidského těla UV záření vyvolá zánět kůže (zarudnutí – erytém, otok až puchýře), ale také zapojí obranný mechanismus – pigmentaci. Dlouhodobé vystavení organismu UV záření vede k narušení funkcí imunitního systému (fotoimunosupresi) nebo k poškození funkce (chorobná citlivost na UV záření – fotodermatóza) i struktury kožních buněk, což vyvolá soubor změn, které nazýváme stárnutí kůže (fotoaging) a nakonec může způsobit i změnu nejhorší, a to nádorové bujení kožních buněk (fotokarcinogeneze) (Borská, © 2015).

Termínem rakovina označujeme heterogenní skupinu nádorových onemocnění. Jde vlastně o soubor několika chorob a jejím typickým znakem je nečekané rozvíjení určité skupiny buněk. Tyto buňky začnou ničit svým růstem své okolí a vytváří kolonie dalších rakovinných buněk, tzv. metastázy. V současnosti rakovina představuje jednu z nejznámějších, ale i nejhorších lidských chorob. Pokud člověk neodhalí příznaky rakoviny a léčba se nezačíná včas, bývá zpravidla smrtelná. Léčba rakoviny je v některých případech na velice vysoké úrovni a neustále se vyvíjí, přesto existují typy této nemoci, které nelze efektivně léčit. Projevy rakoviny jsou různé, jelikož tato nemoc může postihnout různé části a orgány v lidském těle (Štěpán, © 2017). Rakovina kůže postihuje především starší lidi, ale může se vyskytnout ve své agresivní podobě i v mládí (Rakovina kůže, © 2016).

Melanom sice nepatří mezi časté nádory, ale je velmi agresivní. Způsobuje 2/3 úmrtí ze všech kožních nádorů. Vizuálně se jedná o pigmentované, většinou hnědé až černé ložisko na kůži, které se trvale zvětšuje (Dienstbier, 2010). Maligní melanom vzniká z melanocytů. Ty pocházejí z neurální lišty a migrují do epidermis, živnatky,

mozkových plen a ektodermální mukózy. Melanocyty v bazální vrstvě epidermis a ve spojích dermis a epidermis produkují protektivní melanin. Maligní melanom tedy může vzniknout v jakékoliv výše zmíněné tkáni (Tan, 2012).

S rozvojem genetických metod došlo k novým poznatkům v oblasti biologie nádorů. U maligního melanomu hraje významnou roli signální dráha MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Inamdar et al., 2010). Nejvýznamnějším terapeutickým cílem je pak gen BRAF, který je mutovaný v 50 % případů melanomů (Ji et al., 2012). Nejčastější mutací je BRAF V600E, která se vyskytuje v přibližně 90 % BRAF mutovaných tumorů (Ko et al., 2010).

# 1 Teoretická část

## 1.1 Mutace jako příčina nádorového onemocnění

Změny v genotypu se nazývají a rozlišují podle různých kritérií, např. dle charakteru zasažené buňky na zárodečné a somatické nebo dle vlivu na změnu v počtu kopií genomu na amplifikace nebo delece nebo dle úrovně, na které ovlivňují genetickou informaci na genomové (numerické), chromozomální (strukturní – balancované a nebalancované) a genové (dále se dělí na bodové a dynamické) nebo dle způsobu jejich vzniku na spontánní a indukované. V případě, že je mutací zasažená zárodečná buňka, pak se daná mutace vyskytuje ve všech buňkách jedince včetně gamet. V případě somatické mutace jsou zasaženy jen některé buňky tkání a orgánů (Brdička, 2014).

Pokud se mluví o nádorových onemocněních, bere se v úvahu mutace dvou typů genů a to tumor-supresorových genů a méně často onkogenů. Protoonkogen se ve své mutované formě nazývá onkogen. Změna jeho funkce nebo exprese vlivem mutace vede k abnormální stimulaci buněčného dělení a proliferaci (Garber, Offit, 2005).

Četnost mutací se liší v závislosti na prostředí, můžeme tak říci, že četnost mutací roste s rostoucím vlivem mutagenů a zhoršujícími se životními podmínkami a zdravotním stavem organismu (Brdička, 2014).

## 1.2 Hereditární a sporadická maligní onemocnění

Dostupná literatura uvádí, že většina zhoubných rakovinných onemocnění je sporadická (nedědičná). K dosažení plně rozvinutého maligního fenotypu je zapotřebí, aby se v buňkách klonu nashromáždily další mutace těch genů, které jsou „za nádor-odpovědné“ a další tzv. epigenetické události. Takže mutace, která je schopna vyhnout se protinádorovým mechanismům (reparace mutací, apoptóza a jiné imunologické mechanismy) dokáže přeměnit normální buňku na nádorovou buňku. Proto k nahromadění takového velkého množství změn v klonu buněk je potřeba uplynutí určitého času. Incidence sporadických malignit je logicky závislá na věku. Říká se, že to je onemocnění postreprodukčního období, kdy postupně přirozeně klesá efektivita protinádorových mechanismů (Goetz et al., 2006).

V naší populaci se udává riziko celoživotního onemocnění zhoubným melanomem 1-1,5 %. Asi 10 % tohoto onemocnění se vyznačuje familiární zátěží (Foretová et al., 2014) a je způsobená mutacemi vysoce penetrantních genů. Původ takového onemocnění můžeme hledat ve zděděné zárodečné mutaci jedné alely genu, se kterou se člověk již rodí. V tomto případě se predispozice k určitému malignímu onemocnění u nositele vyskytuje ve všech jeho somatických buňkách (Garber, Offit, 2005).

### **1.3 Melanocyty**

Melanocyty jsou buňky původem z neurální lišty, které během vývoje namigrovaly do bazální vrstvy epidermis, kde tvoří asi 4 % buněčné populace. Melanocytů je okolo 500 na 2000 mm<sup>2</sup> povrchu kůže. Nejvíce je jich v kůži na trvale osvětlených částech těla jako je obličej a hřbet ruky (Čihák, 2004).

### **1.4 Maligní melanom**

Maligní melanom je nádor, který vychází z pigmentotvorných buněk. Na jeho vzniku se podílí ultrafialové záření (UV), zejména složka UVB. I když melanom vzniká z mateřských znamének jen někdy, vzrůstá při jejich vyšším počtu úměrně i riziko vzniku tohoto nádoru. Maligní melanom je odlišně barevná skvrna, která se začne tvořit na původně zdravé kůži a zvolna se zvětšuje a postupně přibývá na tloušťce. Může se ovšem změnit i klidné mateřské znaménko, a proto je třeba si pravidelně kontrolovat pihy a znaménka, případně podstoupit vyšetření na dermatovenerologii. Pokud se jedná o maligní melanom, je nutné, aby se projev co nejdříve odstranil a předešlo se tak vzniku vzdálených dceřiných ložisek (Maligní melanom kůže, © 2005).

Buňky maligního melanomu se rychle šíří (metastazují) po celém těle a usazují se v plicích nebo mozku a tam vytvářejí vzdálené metastázy. Maligní melanom a jeho metastázy jsou příčinou více než 75 % úmrtí na kožní nádory. V České republice ročně onemocní maligním melanomem přibližně 1300 lidí. Za posledních 30 let je to nárůst o více než 420 %. Podle statistik umírá ročně na rakovinu kůže více než 300 nemocných (Strach, © 2017).

*Ve srovnání s rokem 1970 se počet hlášených nových onemocnění v ČR v roce 2002 zvýšil pětkrát u mužů (v roce 1970 to bylo 151 hlášených nových onemocnění a*

v roce 2002 již 758). U žen je situace obdobná, počet hlášených nových onemocnění se zvýšil také téměř pětkrát (ze 165 na 803 v roce 2002). V přepočtu na 100 000 to představuje 15,3 hlášených nových onemocnění u mužů stejně jako 15,3 u žen (Ajmová, 2005) (příloha 1). Podle věkových skupin a pohlaví dochází u mužů i žen k pomalému vzestupu od věkové skupiny 20-24 let až do 50-54 let. Dále se vývoj u mužů a žen liší. U mužů je vzestup strmý, ve věku nad 85 let dosahuje až na pětinasobek hodnoty, která je uvedena ve věkové skupině 50-54 let. U žen je vzestup pomalejší, ve věku nad 85 let je to zhruba dvojnásobek počtu případů uváděných ve věku 50-54 let (Ajmová, 2005) (příloha 2).

Diseminovaný melanom je téměř rezistentní vůči klasickým terapeutickým léčbám, jako jsou chemoterapie a radioterapie. Bylo zjištěno, že skoro 50 % všech případů melanomů nese aktivační mutaci v genu BRAF. Maligní melanom je velmi agresivní forma rakoviny kůže (Foretová et al, 2014).

### ***1.5 Formy maligního melanomu***

Melanom může vzniknout nejen na kůži z pigmentotvorných buněk, ale také v jiných tkáních či orgánech jako jsou plíce, trávicí trakt, sliznice střeva, močový měchýř, ovaria nebo oční sliznice. Mimo oblast kůže se ale vyskytuje velice vzácně, protože 92 % případů je kožního původu, 5 % připadá na oční melanom a 3 % na slizniční melanom (Kružicová, 2010).

Rozlišujeme čtyři základní formy maligního melanomu (Maligní melanom kůže, © 2005).

#### ***1.5.1 Povrchově se šířící maligní melanom***

Patří mezi nejčastější typy (tvoří zhruba 65 % těchto nádorů). Nejprve roste povrchově, později začne pronikat do hlubších vrstev kůže. Na kůži se takový růst projevuje vytvořením hrboleku na tmavě hnědé až černé plošce. Postihuje hlavně osoby mezi 30. až 50. rokem života.

### **1.5.2 Nodulární melanom**

Tvoří asi 20 % všech melanomů a je také poměrně častý typem. Charakteristický je hrbol vyvýšený nad okolní kůži, který signalizuje prorůstání nádoru do větší hloubky kůže. Velmi rychle přechází do metastáz.

### **1.5.3 Lentigo maligní melanom**

Postihuje nejčastěji starší osoby. Jedná se o plošná ložiska, na nichž se střídají světlejší a tmavší odstíny hnědé barvy. Ty jsou nepřesně ohraničené, vzniklé v důsledku dřívějšího poškození UV zářením. Představuje asi 5 % případů maligního melanomu.

### **1.5.4 Akrolentiginózní melanom**

Tato forma vzniká hlavně na periferních partiích lidského těla, typicky na ploskách či dlaních nebo pod nehty. Zpočátku může vypadat jako bradavice, modřina nebo mozol. Běžný je v černošské populaci (Maligní melanom kůže, © 2005, Kružicová, 2010).

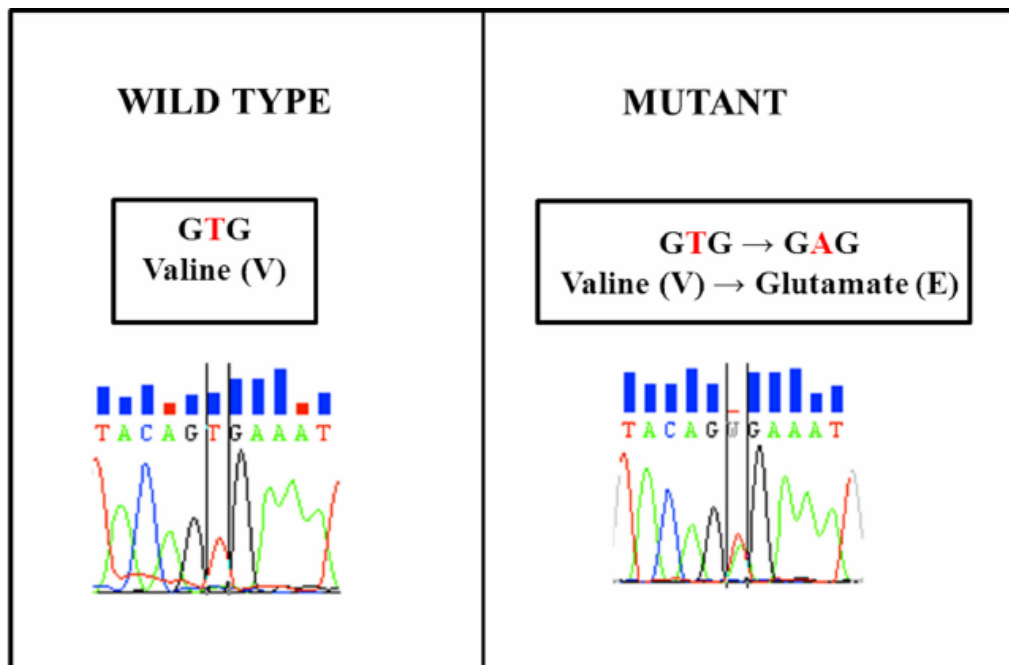
## **1.6 Gen BRAF**

Gen BRAF (kódující protein B-RAF) je lokalizován na chromozómu 7 v pozici 7q34 a patří do rodiny serin-treoninových kináz RAF (ARAF, BRAF a CRAF, které jsou členy signální transdukční kaskády MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK). Klíčovým mediátorem přenosu signálu z membránových tyrosinkinázových receptorů růstových faktorů je dráha MAPK. Aktivační mutace genu BRAF se většinou nachází v kodonu 600. V 80 % případů jde o substituční mutace, které vedou k záměně valinu za kyselinu glutamovou (V600E). V kináze BRAF byly popsány další mutace (např. L597V, G464V, G469A). Ty sice působí podobně na aktivitu signální dráhy MAPK jako mutace V600E, ale vyskytují se jen s nízkou frekvencí (Foretová et al., 2014).

Jak už bylo zmíněno, mutace v místě 1799, v kodonu 600 GTG>GAG označovaná jako transverze T1799A, vede k záměně valinu za kyselinu glutamovou (obrázek č. 1) (Huang et al., 2013). *Aktivace mutovaného BRAF proteinu je výsledkem konformačních změn ve struktuře proteinu* (Garnett et al., 2004). BRAF mutace se vyskytují u přibližně 80 % všech lidských rakovin. S vysokou frekvencí se tato mutace vyskytuje u

maligního melanomu (50-70 %), klasického papilárního karcinomu štítné žlázy (40-70 %), kolorektálního karcinomu (5-15 %), rakoviny vaječnicků a leukémie vlasových buněk (5-100 %) (Huang et al., 2013).

Doposud bylo identifikováno více než 50 různých typů mutací genu BRAF. Avšak 90 % z nich je způsobeno záměnou kyseliny glutamové za valin na pozici 600 (V600E mutace) , což má za následek 138násobné zvýšení aktivity BRAF kinázy oproti nemutované molekule proteinu. Tato mutace vede ke konstitutivní aktivaci signální dráhy MAPK a následnému nekontrolovanému buněčnému růstu. Ovlivnění mutace BRAF V600E má obrovský význam v boji proti malignímu melanomu (Arenbergerová, Puzanov, 2012).



Obrázek č. 1: Ukázka normální a mutované sekvence BRAF genu v případě papilárního karcinomu štítné žlázy v exonu 15. Pozitivní vzorek pro mutaci BRAF vykazuje pozitivitu pro heterogenní tymidin-adeninovou transverzi v nukleotidové pozici 1799, která způsobí substituci kyseliny glutamové za valin v kodonu 600 (BRAF V600E mutace rs113488022). Převzato z:

[https://www.researchgate.net/publication/276465570\\_BRAF\\_overexpression\\_is\\_associated\\_with\\_BRAF\\_V600E\\_mutation\\_in\\_papillary\\_thyroid\\_carcinomas](https://www.researchgate.net/publication/276465570_BRAF_overexpression_is_associated_with_BRAF_V600E_mutation_in_papillary_thyroid_carcinomas)



## **1.7 Kinázy a signální dráhy**

V buňce se vyskytuje řada enzymů a proteinů, které se podílejí na proliferaci, diferenciaci nebo přežívání melanocytů. Je zřejmé, že vše musí podléhat přísné kontrole, a proto buňka využívá složité signální dráhy jako nástroj k regulaci buněčného cyklu (Lazarov et al., 2002).

### **1.7.1 MAPK signální dráha-RAS/RAF/MEK/ERK**

Signální dráha RAS/RAF/MEK/ERK (označována také jako MAPK) bývá aktivována u řady maligních nádorů včetně melanomu. Signální dráha MAPK je hlavní intracelulární dráha, která je odpovědná za buněčnou proliferaci, expresi genů, diferenciaci buněk, jejich mitotickou aktivitu, schopnost buněk přežít a za apoptózu. Aktivační mutace v signální dráze MAPK způsobují trvalou onkogenní proliferaci nádorových buněk i potlačení apoptózy (Krajsová, 2014).

Vzniklé mutace v MAPK mají somatický charakter a vyskytují se především u metastazujících melanomů například mutace BRAF, která způsobuje hyperaktivaci této dráhy a urychlí proliferaci melanocytů (Mercer, Pritchard, 2003). Z lékařského hlediska se sledují mutace zahrnující MAPK signální dráhu v již rozvinutých nádorech (ne predispozičně), a to především kvůli specifické léčbě.

Teprve po identifikaci BRAF mutace u většiny metastazujících melanomů se signální dráze MAPK dostalo větší pozornosti (Davies et al, 2002).

Cesta přenosu signálu z vnějšího prostředí dovnitř buňky probíhá pomocí RAS proteinu lokalizovaného na vnitřní straně buněčné membrány. RAS funguje jako přepínač (Ras-GTP/Ras-GDP; on/off) kontrolovaný povrchovým receptorem a přenáší signál do jádra buňky (Adjei, 2001). Aktivovaný RAS aktivuje serin-threoninovou kinázu RAF a ta následně aktivuje MAPKK jinak nazývanou MEK. Signál se dále přenáší aktivací MAPK nebo ERK a dochází k výsledné aktivaci a fosforylaci transkripčních faktorů, kterými jsou c-fos, c-myc, c-jun aj (Giaccone, Soria, 2013).

### **1.7.2 Protein RAS**

Geny z rodiny RAS kódují malé molekuly patřící do skupiny GTP vazebných proteinů. Ty mají za úkol organizovat cytoskelet, napomáhat při transportu proteinů a

diferenciaci buněk. RAS geny představují v genomu oblasti, které jsou obzvláště náchylné ke změnám. Pokud dojde v tomto genu ke změně, RAS zůstane aktivní a buňka se nekontrolovatelně dělí, pokud ovšem nezasáhnou regulátory jako p53, p16INK4A a p14ARF (Roberts, Der, 2007).

### **1.7.3 Protein RAF**

Všechny proteiny z rodiny RAF mají shodné tři konzervativní oblasti – CR1, CR2 a CR3. První doména obsahuje specifické místo pro navázání RAS proteinu, druhá oblast je zodpovědná za regulaci BRAF kinázy a třetí doména je zodpovědná za aktivaci RAF enzymu pomocí fosforylace (Mercer, Pritchard, 2003).

RAF tvoří homo nebo hetero dimery, které jsou pozitivně regulovány RAS proteiny. Následkem vytvoření dimeru dochází k aktivaci enzymu RAF. Ze všech členů kináz RAF rodiny, má BRAF nejsilnější enzymatickou aktivitu. Díky tomu stimuluje proliferaci buňky a zabraňuje, aby docházelo k apoptóze. Je to tedy jeden z nejvýznamnějších genů, ve kterém dochází k mutacím u nádorových buněk (Mercer, Pritchard, 2003).

### **1.7.4 Regulační kinázy MAPK a ERK**

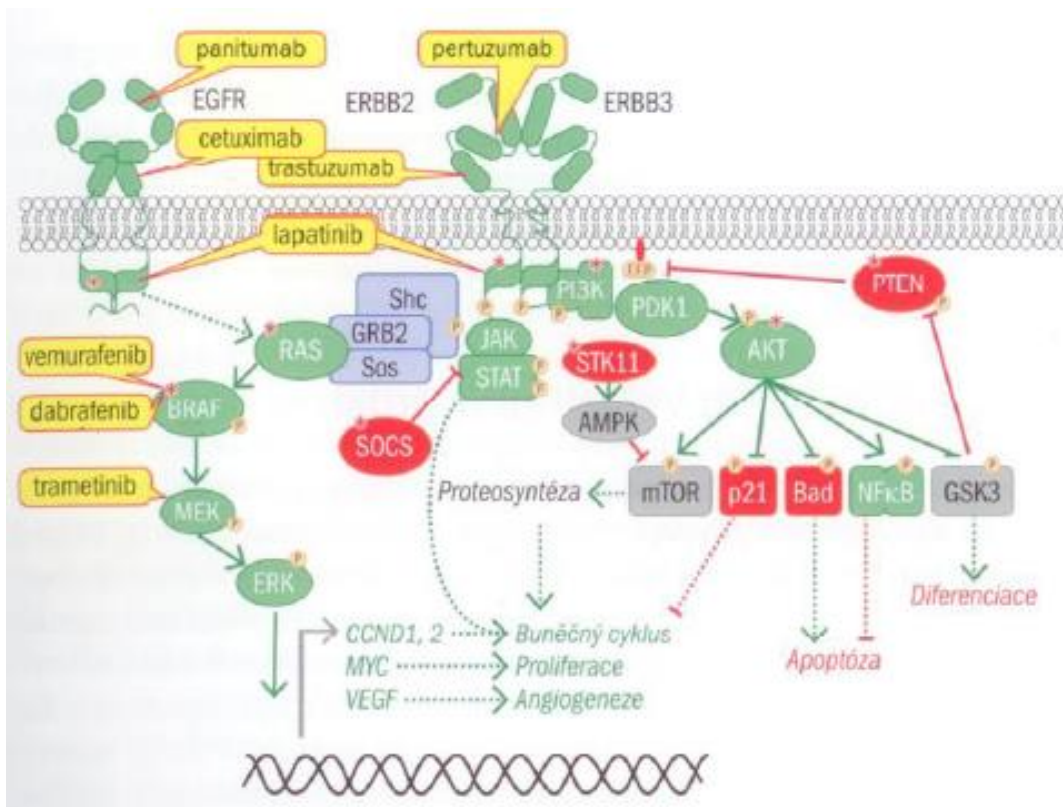
Spouštěčem pro signální dráhu MAPK je malý protein RAS, který je spjatý s receptorem EGFR na vnější straně buněčné membrány. Tento protein existuje ve dvou formách, podle toho, na jakou molekulu se váže – Ras-GTP nebo Ras-GDP, což ovlivňuje jeho funkčnost. Komplex RAS-GTP předá signál o aktivaci serin-threoninové kinázy RAF, která dále aktivuje kinázy MAPKK, která je nazývána také jako MEK a ERK. Aktivovaná ERK vstupuje do jádra, kde fosforyluje různé transkripční faktory a ovlivňuje tak expresi mnoha genů. Nejdůležitější je stimulace přepisu genu pro ligand TGF, který se váže na EGFR a působí jako zpětná vazba v signální dráze (Roberts, Der, 2007).

## **1.8 Onkogenomika v onkologické praxi**

Mezi základní genetické charakteristiky maligních nádorů patří zvýšená četnost mutací a poruchy genomové stability. Mutace vznikající v průběhu nádorové

transformace mohou náhodně postihnout libovolné geny, ale příčinou nádorové transformace je postižení určitých genů kódujících klíčové proteiny regulující především tkáňovou homeostázu, DNA reparační mechanismy nebo interakci nádorových buněk s mikroprostředím. Známe jsou některé z často nebo častěji alterovaných genů. Mezi takové geny patří tumor-supresorový gen p53 (mutovaný u přibližně 50 % všech solidních nádorů), KRAS (mutovaný u přibližně 30 % všech solidních nádorů) nebo transverze c.T1799A (V600E) onkogenu BRAF, který často vzniká u maligního melanomu nebo papilárního karcinomu štítné žlázy.

Vyšetření vzorku nádorové tkáně pomocí sekvenování nové generace (NGS) přináší informace o tom, jaké mutace se nacházejí v nádorových buňkách u konkrétního pacienta, jaký je jejich fenotypový projev, ale i které z těchto mutací reprezentují molekulární poruchy zapříčiňující nádorovou transformaci buněk příslušné tkáně. Metoda NGS také umožňuje analýzu alterací DNA cílenou pouze na vybrané geny (cílené NGS), všechny kódující geny (transkriptomové NGS) nebo celý genom (genomové NGS). V uvedeném pořadí roste úplnost a komplexita identifikace genomových změn vyšetřovaného nádorového ložiska. Zároveň ovšem také roste finanční nákladnost vyšetření i požadavky na náročnost zpracování získaných dat. V posledních letech byla takto řada nádorových typů a subtypů podrobena těmto analýzám. Jejich výsledkem je mapování celkového genetického terénu (genomic landscape) ložiska nádoru. *Důležitou součástí těchto výzkumů je identifikace příčinných alterací, které způsobují nádorovou transformaci a zvyšují maligní potenciál primárního tumoru a jeho metastáz (označovaných jako „driver“ mutace) a jejich odlišení od genetických variant přítomných v nádorových buňkách, avšak bez zjevné důležitosti s ohledem na vznik a rozvoj nádoru (tzv. „passenger“ mutace). Identifikace „driver“ mutací umožňuje nejen pochopení odlišností biologického chování maligních nádorů různých typů a individuální variability nádorů u různých pacientů, ale je rovněž předpokladem pro identifikaci molekulárních cílů specifické léčby viz obrázek č. 2 (Brdička, Didden, 2015)*



Obrázek č. 2: Hlavní místa účinku cílených chemoterapeutik (žluté rámečky) na schematickém příkladu signálních drah aktivovaných receptorovými tyrosinkinázami (EGFR NEBO ERBB2/3). Zobrazená cílená chemoterapeutika působí jako inhibitory proteinových produktů způsobujících aberantní mitogenní stimulaci, inhibici apoptózy nebo diferenciace. Tyto poruchy vznikají v důsledku amplifikací nebo aktivačních mutací (\*) příslušných protoonkogenů kódujících jednotlivé proteinové komponenty přenosu signálu z receptorů lokalizovaných na cytoplazmatické membráně do buněčného jádra (zelené tvary). Podobný účinek mohou mít alterace (\*) tumor-supresorových proteinů (červené tvary), které jsou fyziologickými negativními regulátory zobrazených signálních drah. Převzato z: BRDIČKA, R., DIDDEN, W., 2015. Genetika nádorových onemocnění. In: KLEIBL, Z. *Genetika v klinické praxi III*. Praha: Galén, 45. s.

## 1.9 Léčba

Biologická léčba melanomu zahrnuje tři hlavní podskupiny – léčbu imunomodulační zaměřenou na aktivaci T lymfocytů nespecifickým způsobem, cílenou léčbu zaměřenou na blokaci mutace genu v melanomu a vývoj specifických melanomových vakcín.

Důležité jsou zejména multikinázové inhibitory z druhé kategorie cílených terapií blokujičích aktivaci genu BRAF. Jedná se o inhibitor sorafenib a selektivní inhibitor BRAF kinázy PLX4032 s nynějším názvem vemurafenib. Vemurafenib je cílený preparát ovlivňující signální cestu MAPK. Vemurafenib byl schválen FDA v srpnu 2011 a v únoru 2012 lékovou agenturou EMA pro léčbu první i dalších linií pacientů s neresekovatelným nebo metastatickým melanomem pozitivních pro mutaci v genu BRAF.

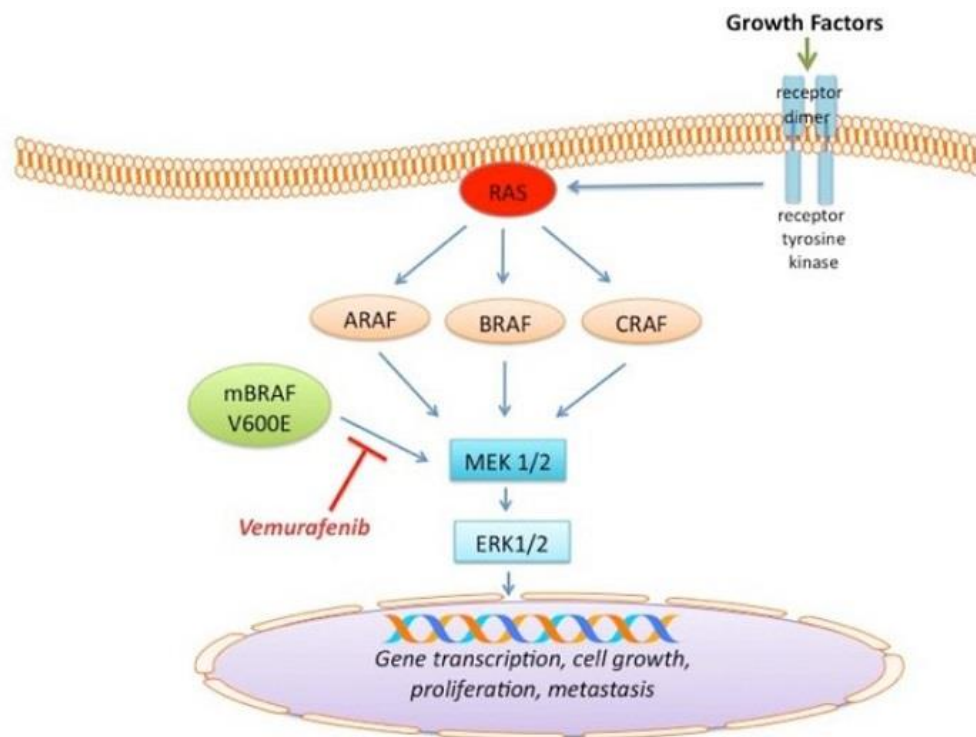
Původní inhibitor sorafenib, nepřinesl uspokojivé výsledky samostatně, ani v kombinaci s tradičními chemotereapeutickými režimy.

Vemurafenib je novější a více specifický inhibitor mutace BRAF V600E. Lék je navíc poměrně dobře tolerován, z nepříznivých vedlejších příznaků se nejčastěji vyskytovaly artralgie, únava a kožní spinaliomy (Arengergerová, Puzanov, 2012).

Vemurafenib je reverzibilní ATP-kompetitivní inhibitor kinázové domény BRAF. Vzhledem k vysokému stupni homologie v této oblasti mezi BRAF a CRAF a malým počtem dalších kináz vykazuje lék inhibiční aktivitu i proti dalším kinázám (CRAF, ARAF, SRMS, ACK1, MAP4K5 a FGR) *in vitro* za použití purifikovaných kináz. U neporušených buněk vemurafenib blokuje pouze aktivaci MEK v buňkách, které nesou aktivující mutace BRAF. U buněk divokého typu BRAF paradoxně vemurafenib zvyšuje aktivaci MEK stimulací kinázové aktivity dimerů BRAF (obrázek č. 3) (Flaherty, 2012).

Studie označovaná BRIM2 (BRAF inhibitors in melanoma 2) hodnotila vemurafenib u předlěčených pacientů s metastatickým melanomem nesoucím mutaci BRAF V600E. Do studie bylo zařazeno celkem 132 pacientů. Pacienti byli léčeni pomocí 960 mg vemurafenibu podávaného perorálně dvakrát denně. Medián období do progresu onemocnění byl 6,8 měsíce. Medián celkového přežití byl 15,9 měsíců, což představuje významné prodloužení ve srovnání s 8-10 měsíci dosaženými v minulosti).

Celkové přežití 6 měsíců bylo dosaženo u 77 % případů a celkové přežití 12 měsíců v 58 % případů (Arenbergerová, Puzanov, 2012).



Obrázek č. 3: Schematické znázornění mechanismu účinku vemurafenibu u karcinomů nesoucích aktivační mutaci BRAF (V600E). Převzato z: <http://www.medscape.com/viewarticle/771620>

## **2 Cíl práce**

- Vypracování odborné rešerše na dané téma.
- Praktické zvládnutí laboratorních metod – izolace DNA z bukálního stěru, měření koncentrace DNA, metoda PCR-ARMS, gelová elektroforéza, analýza získaných výsledků.
- Optimalizace metody PCR ARMS pro detekci mutace V600E v genu BRAF.
- Interpretace výsledků a diskuze.

## 3 Metodika

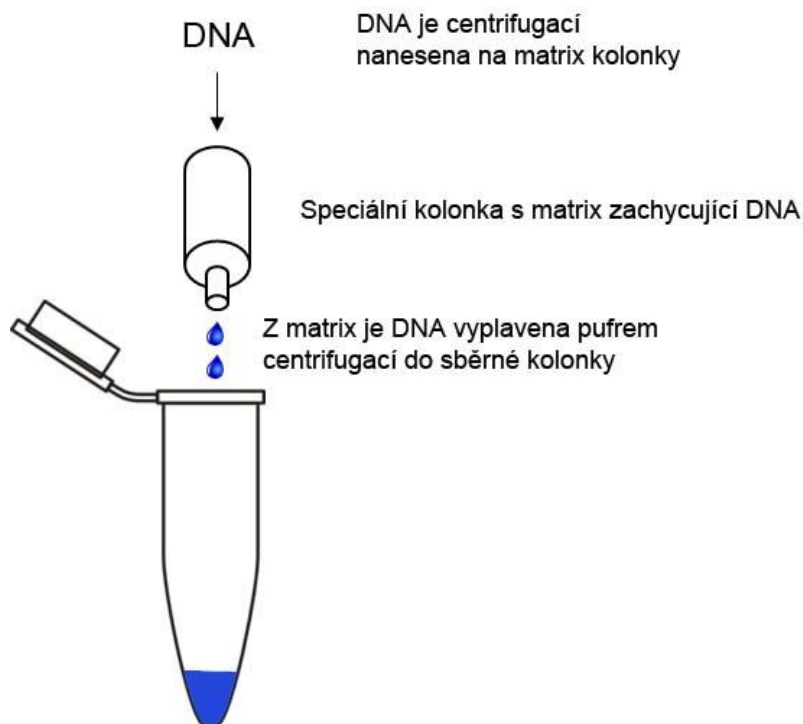
### 3.1 Izolace genomové DNA

Základní genetický materiál většiny živých organismů je deoxyribonukleová kyselina (DNA). Je tvořena dvěma antiparalelními polynukleotidovými řetězci a její nejběžnější struktura je pravotočivá dvoušroubovice. Oba řetězce jsou vzájemně vázány dvěma vodíkovými vazbami mezi bázemi adeninem (A) a thyminem (T) a třemi vodíkovými vazbami mezi cytosinem (C) a guaninem (G). Kostra každého řetězce je tvořena zbytky deoxyribózy a kyseliny fosforečné, přičemž dovnitř šroubovice směřují jednotlivé báze. DNA se u živočichů a člověka nachází v buněčném jádře a v mitochondriích. Izolovat ji lze jako celkovou genomickou DNA nebo je možné si dle potřeby vybrat konkrétní typ DNA k izolaci. Postupně byla vyvinuta řada metod, které se od sebe mohou značně lišit. Volba konkrétní izolační techniky závisí na typu použitého biologického materiálu, dále na požadované rychlosti a účinnosti metody, na dalším využití získané DNA a dále také na finanční náročnosti celého procesu (Izolace genomové DNA ze savčích buněk, stanovení koncentrace DNA pomocí absorpční spektrofotometrie, © 2011).

Izolace pomocí komerčně dostupných gravitačních kolonek je v současnosti nejčastějším způsobem izolace genomové DNA. Tato metoda je rychlá, účinná a poskytuje DNA o dostatečné čistotě. Na trhu je k dispozici celá řada kolonkových kitů sloužících k izolaci genomové DNA.

Izolace DNA probíhá v několika základních krocích. Lyzát, který se získává rozrušením tkání a buněk a působením proteázy se nanese do speciální kolonky. V kolonce je přítomna matrix, na kterou se dodaná DNA naváže a centrifugací kolonky se roztok (bez DNA) odplaví pryč. Matrix s navázanou DNA se promyje promývacím roztokem. Pak se promývací roztok díky centrifugaci kolonky také odplaví. Po promytí se DNA z matrix vyváže centrifugací s vodou nebo elučním pufrem. DNA je takto odplavena z matrix do připravené sběrné zkumavky (obrázek č. 4) (Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek, © 2014).





Obrázek č. 4: Odplavení DNA z kolonky z matrix do připravené sběrné zkumavky.  
Převzato z: <http://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselini/izolace-dna-pomoci-gravitacnich-kolonek/>

### 3.2 Fluorometrické stanovení koncentrace DNA

Fluorometr principiálně využívá fluorescenční barviva k určení koncentrace nukleových kyselin a proteinů ve vzorku.

Každé barvivo je specifické pro jeden typ molekuly – DNA, RNA nebo protein. Tato barviva mají extrémně nízkou fluorescenci, dokud se nenaváží na své cíle – DNA, RNA nebo protein. Po navázání intenzivně fluoreskují. Při určitém množství barviva je množství fluorescenčního signálu z této směsi přímo úměrné koncentraci DNA v roztoku. Fluorometr Qubit může tento fluorescenční signál zachytit a měří koncentraci DNA vzhledem k standardům DNA o známé koncentraci. Fluorometr Qubit vždy používá standardy DNA k odvození koncentrace DNA ve vzorku. (Qubit fluorometer, © 2017).

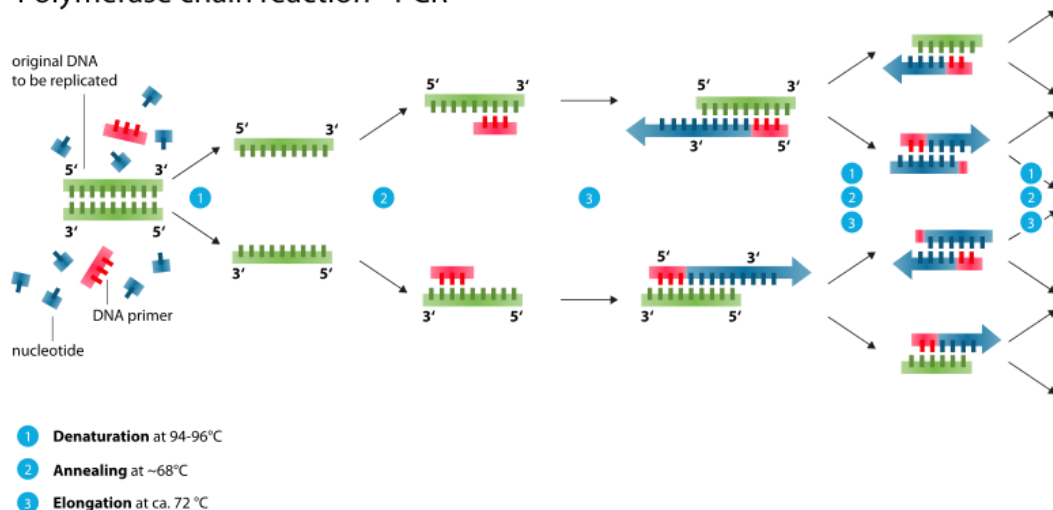
Metodu absorpce UV záření pak používá přístroj spektrofotometr a dokáže změřit přirozené absorbance světla při 260 nm pro DNA a RNA a 280 nm pro proteiny. Čím více je DNA, RNA nebo proteinu ve vzorku, tím více světla se absorbuje. Absorpce je přirozená vlastnost DNA, RNA, volných nukleotidů, proteinů a některých aminokyselin atd. Vzhledem k tomu, že tolik molekul absorbuje světlo při 260 nm, toto měření je vystaveno nepřesnosti v důsledku potenciální přítomnosti či spíše kontaminace vzorku těmito dalšími molekulami (Izolace genomové DNA ze savčích buněk, stanovení koncentrace DNA pomocí absorpční spektrofotometrie, © 2011).

### 3.3 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction) je metoda k rychlému zmnožení (amplifikace) vybraného úseku DNA (Polymerázová řetězová reakce, © 2014). Byla vyvinuta v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii (Průša, 1998). DNA je nejprve denaturována za vzniku dvou jednovláknových templátových (matricových) molekul DNA. Množený úsek DNA je ohraničen tzv. primery (oligonukleotidy), což jsou specifické fragmenty DNA o 20-25 nukleotidech. Ty díky své komplementaritě přisedají právě ke koncům vybraného úseku. Od přisedlých primerů probíhá syntéza DNA (obrázek č. 5) (Polymerázová řetězová reakce, © 2014). Syntézu nových vláken katalyzuje termostabilní DNA polymeráza (například Taq z bakterie *Thermus aquaticus*) od 5' konce ke 3' konci vždy začínající od primerů (Průša, 1998). Principem reakce je využití mnohonásobně se opakujících se teplotních změn v tzv. cyklech, které umožňují denaturaci (rozvolnění) DNA, přisedání primerů a syntézu DNA (Polymerázová řetězová reakce, © 2014).

Teplotní fáze reakčního cyklu jsou denaturace (optimálně při 95 °C), hybridizace primerů (optimálně podle denaturační teploty duplexu templátové DNA s primerem minus 12, obvykle mezi 50-55 °C) a syntéza (obvykle mezi 70-74 °C). Počet cyklů se obvykle pohybuje v rozmezí 15 až 40 cyklů a koncentrace amplifikované DNA narůstá geometrickou řadou. Každý experiment musí mít pozitivní a negativní kontrolu (Průša, 1998).

## Polymerase chain reaction - PCR



Obrázek č. 5: Princip polymerázové řetězové reakce. Převzato z:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

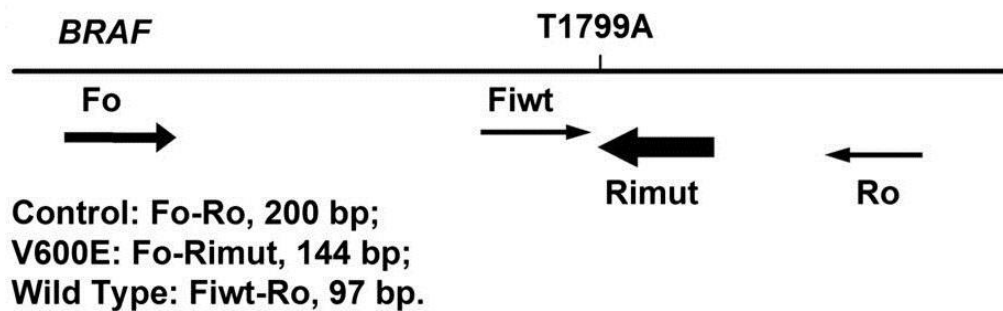
### 3.4 PCR-ARMS

PCR-ARMS (amplifikační refrakční mutační systém) je jednoduchá metoda pro detekci bodové mutace nebo malé delecce. Je to varianta AS-PCR (alelově specifické PCR). ARMS je založena na použití sekvenčně specifických PCR primerů, které umožňují amplifikaci DNA testu pouze tehdy, když je cílová alela obsažena ve vzorku. Metoda je spolehlivá a jasně rozliší heterozygota ve sledovaném lokusu od homozygotů pro jednu nebo druhou alelu.

PCR-ARMS je velice citlivá, specifická a nízkonákladová metoda pro detekci mutací s hlášenou analytickou citlivostí v rozmezí od 0,1 % do 2 % (Huang et al., 2013).

Metoda ARMS-PCR pro testování mutace V600E v genu BRAF převzatá z práce Huang et al. (2013) využívá čtyři primery v jediné PCR reakci, přičemž dva vnější primery jsou navrženy pro amplifikaci fragmentu o velikosti 200 bp zahrnujícího také místo potenciální mutace V600E, které zároveň slouží jako interní amplifikační kontrola. Dva interní primery jsou buď specifické pro mutantní sekvenci nebo sekvenci divokého typu. Mutovaná a normální sekvence je odlišitelná na základě rozdílné délky amplifikovaných fragmentů. Fragment získaný amplifikací divokého typu má velikost

97 bp, zatímco fragment obsahující mutaci má velikost 144 bp (obrázek č. 6) (Huang et al., 2013).



Obrázek č. 6: V jedné PCR zkumavce jsou přítomny čtyři specifické primery. Primer Fo a Ro generuje běžný fragment 200 bp zahrnující místo mutace. Primer Fo a Rimut generuje fragment o velikosti 144 bp specifický pro mutaci BRAF V600E. Primer Fiwt a Ro generuje fragment o velikosti 97 bp specifický pro nemutovaný gen BRAF.

Převzato z: HUANG, T., et al., 2013.

V praktické části pracuji s primery Fo, Ro, Fiwt a Rimut. Primerové sekvence byly:

- přední (Fo): 5'-CTCTTCATAATGCTTGCTCTGATAG-3'
- zpětný (Ro): 5'-GCCTCAATTCTTACCATCCAC-3'
- přední divoký typ (Fiwt): 5'-GTGATTTTGGTCTAGCTACAGT-3'
- zpětný mutovaný (Rimut): 5'-CCCACTCCATCGAGATTTCT-3'

Všechny primery byly 20  $\mu$ M (Huang et al., 2013).

### 3.5 Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která se používá k rozdělení makromolekul. Makromolekuly s nenulovým elektrickým nábojem se v elektrickém poli pohybují k jedné z elektrod v závislosti na své molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. Fragmenty DNA se v elektrickém poli pohybují od záporné elektrody směrem ke kladné, protože DNA je kyselina a obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny. Nejčastěji se k dělení fragmentů DNA používá agarózový gel. Vzniklé fragmenty DNA o stejné délce formují viditelný proužek a na agarózovém gelu postupují stejně rychle.

DNA je vizualizována díky specifickému barvení pomocí interkalačního činidla např. ethidiumbromidem (EtBr). Tato látka se váže dovnitř dvoušroubovice a po ozáření ultrafialovým světlem (UV) oranžově fluoreskuje (Čurn, 2008).

## 4 Praktická část

Pozitivní kontrola, a tedy DNA s mutací V600E v genu BRAF byla poskytnuta spřátelenou laboratoří. V genetické laboratoři Genlabs s.r.o. jsem si zkusila izolaci genomové DNA jak z periferní krve, tak i z bukálního stěru. Pro optimalizaci metody PCR ARMS ve své práci pracuji s DNA izolovanou z bukální sliznice, proto zde neuvádím postup pro izolaci DNA z periferní krve.

### 4.1 *Izolace genomové DNA z bukální sliznice*

K izolaci byl použit DNA Isohelix DNA Isolation kit: DDK-3/DDK-50.

#### **Reagencie a jejich skladování**

Lysis buffer LS – pokojová teplota

Proteinase K – -20 °C

Capture buffer CT – pokojová teplota

Re-hydration buffer TE – pokojová teplota

#### **Postup**

Do zkumavky s tamponem s buňkami bukálního stěru bylo napipetováno 500 µl LS pufru. Dále bylo přidáno 20 µl rozmrazené Proteinase K. Vzorek byl krátce zvortexován a zcentrifugován na stolní centrifuze. Poté byl inkubován jednu hodinu při 60 °C v suché lázni. Po uplynutí jedné hodiny byl krátce zvortexován a zcentrifugován. Ze zkumavky byl přepipetován všechnen supernatant do nové, řádně označené, 1,5 ml zkumavky, a poté bylo do zkumavky přidáno 500 µl Capture butter CT pufru. Pak byla zkumavka krátce vortexována a zcentrifugována při 13 tis. ot/min po dobu 7 minut. Poté byl opatrně odstraněn supernatant, aby se neporušila peleta DNA. Zkumavka byla krátce zcentrifugována a opatrně se odebral všechnen zbylý supernatant. K peletě DNA bylo přidáno 50 µl TE pufru vytemperovaného na 60 °C. Takto připravený vzorek byl inkubován po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Poté byl krátce zvortexován a zcentrifugován při 13 tis. ot/min po dobu 15 minut. Supernatant obsahující DNA byl odebrán do nové 1,5 ml zkumavky, která byla označená štítkem se jménem a příjmením

klienta, jeho rodným číslem, LIČ (laboratorní identifikační číslo) a zkratkou, kdo DNA izoloval. Izolovaná DNA je dále skladována v mrazicím boxu.

#### **4.2 Měření koncentrace DNA**

Koncentrace vyizolovaných DNA byla měřena pomocí přístroje Qubit® 2.0 Fluorometer. Měření koncentrace DNA je rozděleno na dvě části. Prvním krokem je příprava pracovního roztoku Qubit™ Working Solution se kterým je následně smíchán v určitém poměru vzorek DNA a druhým krokem je vlastní měření koncentrace DNA ve vzorku pomocí fluorometru. Koncentrace jednotlivých vzorků DNA je uvedena v tabulce č. 6 v kapitole 5.1.

#### **Reagencie a jejich skladování**

Qubit™ dsDNA BR reagent – pokojová teplota

Qubit™ dsDNA BR buffer – pokojová teplota

Qubit™ dsDNA BR Standard #1 – 4 °C

Qubit™ dsDNA BR Standard #2 – 4 °C

#### **Postup**

Nejdříve byly standardy vytemperovány na pokojovou teplotu a pro každý vzorek byly připraveny předepsané mikrozkušavky Qubit™ assay tubes. Pracovní roztok byl připraven pro všechny měřené vzorky do jedné 1,5 ml zkumavky, přičemž pro každý vzorek bylo napipetováno 199 µl Qubit™ dsDNA BR bufferu a 1 µl Qubit™ dsDNA BR reagentu.. Pak byla směs přibližně 15 sekund vortexována a na stolní centrifuze zcentrifugována. Pro měření standardu bylo napipetováno do připravených mikrozkušavek Qubit™ assay tubes 190 µl připraveného pracovního roztoku. Do jedné zkumavky bylo přidáno 10 µl Qubit™ dsDNA BR Standard #1, do druhé Qubit™ dsDNA BR Standard #2. Pro měření vzorku bylo do mikrozkušavky napipetováno 198 µl pracovního roztoku a 2 µl DNA izolátu. Mikrozkušavky byly

krátce zvortexovány a zcentrifugovány. Po 2 minutách inkubace byla změřena koncentrace DNA.

#### **4.3 Amplifikace zdravé DNA se třemi různými PCR mixy**

Jelikož jsem měla k dispozici tři různé komerční PCR kity (PCRBIO HS Taq DNA Polymerase, EmeraldAmp GT PCR Master Mix a gb Basic PCR Master Mix), nejdříve jsem vyzkoušela, který z nich bude pro můj experiment nejefektivnější s ohledem na výtěžnost a specifitu PCR reakce.

#### **Reagencie a jejich skladování**

PCRBIO HS Taq DNA Polymerase – -20 °C

EmeraldAmp GT PCR Master Mix – -20 °C

gb Basic PCR Master Mix – -20 °C

zdravá DNA (bez mutace V600E) – -20 °C

primery: Fo, Ro, Fiwt, Rimut – -20 °C

deionizovaná H<sub>2</sub>O – pokojová teplota

#### **Postup**

PCR mixy byly připraveny v PCR boxu v chladícím stojánku. Jeden mix o celkovém objemu 25 µl obsahuje 12,5 µl konkrétního PCR mixu, 0,4 µl primeru Fo (20 µM), 0,2 µl primeru Ro, 0,2 µl primeru Fiwt a 0,8 µl primeru Rimut, 2 µl DNA a 8,9 µl deionizované H<sub>2</sub>O. Pro celkově tři PCR mixy tedy bylo namícháno 1,2 µl Fo, 0,6 µl Ro, 0,6 µl Fiwt, 2,4 µl Rimut a 26,7 µl deionizované H<sub>2</sub>O. Tento mix se řádně zvortexoval, zcentrifugoval a rozpipetoval po 10,5 µl do třech označených PCR zkumavek. Do zkumavky č. 1 byl přidán PCRBIO HS Taq DNA Polymerase, do zkumavky č. 2 byl přidán EmeraldAmp GT PCR Master Mix a do zkumavky č. 3 byl přidán gb Basic PCR Master Mix. Do všech byla poté přidána DNA zdravého jedince, která nevykazuje mutaci V600E (použitá DNA byla z bukálního stěru). Všechny tři zkumavky byly řádně zvortexovány a zcentrifugovány a následně vloženy do cykleru. Reakce PCR-ARMS měla přesně nastavený teplotní profil (tabulka č. 1).



Tabulka č. 1: Teplotní profil reakce

	<b>Krok</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>1</b>	počáteční denaturace	95 °C	5 min	1
<b>2</b>	denaturace	94 °C	20 s	40
	anealing	66 °C	20 s	
	extenze	72 °C	1 min	
<b>3</b>	terminální extenze	72 °C	5 min	1

#### **4.4 Příprava gelové elektroforézy**

##### **Reagencie a jejich skladování**

Crystal 10x TBE Buffer – prášek – pokojová teplota

10x TBE – roztok připravený z Crystal 10x TBE Buffer – pokojová teplota

pracovní roztok 1X TBE – pokojová teplota

agarózové tablety – pokojová teplota

##### **Postup**

10x TBE pufr byl připraven rozpuštěním prášku Crystal 10x TBE Buffer v deionizovaná H<sub>2</sub>O a doplněním touto H<sub>2</sub>O na celkový objem 1 litr.

Pracovní roztok 1x TBE byl připraven tak, že do skleněné láhve o objemu 0,5 l bylo pomocí odměrného válce nalito 50 ml 10x TBE pufru, a poté přidáno 450 ml destilované vody.

Před samotnou gelovou elektroforézou byl připraven agarózový gel. Čtyři agarózové tablety o hmotnosti 0,5 g byly v plastové kádince smíchány s 50 ml 1xTBE pufru, aby výsledný gel byl 4 %. Tablety se nechaly rozpustit v pufru, a poté byla kádinka vložena do mikrovlnné trouby, kde po několika zahříváních vznikl gel. Gel bez bublin byl nalit na elektroforetickou podložku s hřebenem a nechán ztuhnout. Po ztuhnutí

byly vyjmuty hřebeny a gel i s elektroforetickou podložkou byl vložen do elektroforetické vany s TBE pufrem tak, aby všechny jamky byly ponořeny.

#### 4.5 Gelová elektroforéza se zdravou DNA a třemi různými PCR mixy

Do prvních třech jamek bylo napipetováno 10  $\mu$ l každého PCR produktu smíchaného s 1  $\mu$ l barvy Midori Green Direct. Do čtvrté jamky bylo napipetováno 5  $\mu$ l markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU smíchaného s 1  $\mu$ l barvy Midori Green Direct.

Elektroforéza byla spuštěna na přibližně 10 minut při napětí 100-135 V. Průběh elektroforézy bylo možné díky iluminátoru Mupid<sup>TM</sup> a LED Illuminator sledovat průběžně.

#### 4.6 Amplifikace mutované DNA

Postup byl úplně stejný jako v kapitole 4.3. Dále jsem již nepracovala s PCR mixem gb Basic PCR Master Mix. Také byl upraven objem mutované DNA – místo 2  $\mu$ l byl do mixu přidán 1  $\mu$ l a díky tomu byl upraven i objem deionizované H<sub>2</sub>O, aby výsledný objem byl stále 25  $\mu$ l. Dále jsem upravila teplotní profil reakce (tabulka č. 2).

Tabulka č. 2: Teplotní profil reakce

	<b>Krok</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>1</b>	počáteční denaturace	95 °C	5 min	1
<b>2</b>	denaturace	94 °C	15 s	40
	anealing	66 °C	15 s	
	extenze	72 °C	30 s	
<b>3</b>	terminální extenze	72 °C	5 min	1

#### 4.7 Gelová elektroforéza s mutovanou DNA

Gelová elektroforéza byla připravena stejně jako v kapitole 4.4 a 4.5. Byla spuštěna na přibližně 10 minut při napětí 100-135 V. Průběh elektroforézy bylo možné díky iluminátoru Mupid<sup>TM</sup> a LED Illuminator a barvě sledovat průběžně. Díky detekčnímu

zařízení FastGene® Gelpic LED Box byl gel zdokumentován a jeho obrázek č. 8 je uveden v kapitole 5.3.

#### **4.8 Amplifikace DNA s různými koncentracemi (gradient DNA)**

Nyní byly použity opět dva komerční mixy pro PCR – PCRBIO HS Taq DNA Polymerase (zkumavky 1-6) a EmeraldAmp GT PCR Master Mix (zkumavky 8-13). Chtěla jsem vyzkoušet, jakou minimální koncentraci musí mít mutovaná DNA, aby byla detekovatelná. Pro každý kit bylo připraveno 6 PCR zkumavek. V posledních zkumavkách (č. 6 a č. 13) byl připraven mix, aby z nich mohl poté být rozpipetován. Každý mix obsahoval celkem 75  $\mu$ l PCR mixu PCRBIO HS Taq DNA Polymerase nebo EmeraldAmp GT PCR Master Mix (po 12,5  $\mu$ l v každé reakci), 2,4  $\mu$ l primeru Fo (po 0,4  $\mu$ l v každé reakci), 1,2  $\mu$ l primeru Ro (po 0,2  $\mu$ l v každé reakci), 1,2  $\mu$ l primeru Fiwt (po 0,2  $\mu$ l v každé reakci) a 4,8  $\mu$ l primeru Rimut (po 0,8  $\mu$ l v každé reakci). Přehled objemů primerů a PCR mixu je uveden v tabulce č. 3. Oba dva mixy byly pečlivě zvortexovány a zcentrifugovány. Poté byly mixy rozpipetovány po 14,1  $\mu$ l do zbývajících pěti zkumavek (1, 2, 3, 4, 5 a 8, 9, 10, 11, 12). Do zkumavek 1 a 8 bylo napipetováno 0,25  $\mu$ l mutované DNA, do zkumavek 2 a 9 bylo napipetováno 0,5  $\mu$ l mutované DNA, do zkumavek 3 a 10 byl napipetován 1  $\mu$ l mutované DNA a do zkumavek 4 a 11 byly napipetovány 2  $\mu$ l mutované DNA. Do zkumavek 5 a 12 byl napipetován 1  $\mu$ l zdravé DNA bez mutace jako zdravá kontrola a zkumavky 6 a 13 zůstaly bez DNA jako negativní kontrola PCR reakce. Do všech zkumavek byl následně napipetován příslušný objem deionizované H<sub>2</sub>O tak, aby výsledný objem mixu v jedné PCR zkumavce byl 25  $\mu$ l. Příslušné objemy DNA a deionizované H<sub>2</sub>O jsou uvedeny v tabulce č. 4. Všechny zkumavky byly poté zvortexovány, zcentrifugovány a vloženy do cykleru se stejným teplotním profilem jako v kapitole 4.6.

Tabulka č. 3: Přehled objemů primerů a PCR mixu

<b>počet vzorků</b>	<b>1</b>	<b>6</b>
PCR mix (μl)	12,5	75
Fo (μl)	0,4	2,4
Ro (μl)	0,2	1,2
Fiwt (μl)	0,2	1,2
Rimut (μl)	0,8	4,8
celkem (μl)	14,1	84,6

Tabulka č. 4: Přehled objemů DNA a deionizované H<sub>2</sub>O

<b>zkumavka</b>	<b>DNA [μl]</b>	<b>H<sub>2</sub>O [μl]</b>
1	0,25	10,65
2	0,5	10,4
3	1	9,9
4	2	8,9
5 (zdravá kontrola)	1	9,9
6 (negativní kontrola)	0	10,9
7	marker	
8	0,25	10,65
9	0,5	10,4
10	1	9,9
11	2	8,9
12 (zdravá kontrola)	1	9,9
13 (negativní kontrola)	0	10,9

#### **4.9 Gelová elektroforéza s různými koncentracemi DNA**

4 % agarózový gel byl připraven tak, že čtyři agarózové tablety o hmotnosti 0,5 g byly v plastové kádince smíchány s 50 ml 1xTBE pufru, aby výsledný gel byl 4 %. Tablety se nechaly rozpustit v pufru, a poté byla kádinka vložena do mikrovlnné trouby, kde po několika zahříváních vznikl gel. Pak bylo do tekutého gelu přidáno 15 μl barvy

Midori Green Advanced DNA Stain o objemu 15  $\mu$ l, která se v gelu rozmíchala. Gel se poté nalil do elektroforetické podložky s hřebeny a dal se ztuhnout do temna (aby gel rychleji ztuhl, může se dát i do lednice). Když gel ztuhl, přenesl se do elektroforetické vany. Výhoda barveného gelu je, že se jednotlivé PCR produkty nanáší na gel přímo. Do jamek bylo napipetováno po 20  $\mu$ l každého PCR produktu. Do prvních šesti jamek byly napipetovány PCR produkty v pořadí 1-6, do sedmé jamky bylo napipetováno 5  $\mu$ l markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU a do dalších šesti jamek byly napipetovány PCR produkty 8-13. Obrázek č. 9 je uveden v kapitole 5.4.

#### **4.10 Opakování amplifikace DNA**

Tentokrát byl použit pouze PCR mix EmeraldAmp GT PCR Master Mix. PCR mixy byly namíchány pro čtyři reakce. Přesně podle rozpisu (tabulka č. 5) byly namíchány tři mixy s DNA o objemu 1  $\mu$ l, negativní kontrola byla namíchána bez DNA a s deionizovanou H<sub>2</sub>O o objemu 10,9  $\mu$ l. Tentokrát byly použity oba vzorky mutované DNA, které byly k dispozici (A a B).

Tabulka č. 5: Rozpis reagensí v jednom ze tří mixů s DNA

<b>počet vzorků</b>	<b>1</b>
PCR mix ( $\mu$ l)	12,5
Fo ( $\mu$ l)	0,4
Ro ( $\mu$ l)	0,2
Fiwt ( $\mu$ l)	0,2
Rimut ( $\mu$ l)	0,8
DNA ( $\mu$ l)	1
H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	9,9
celkem ( $\mu$ l)	25

#### **4.11 Gelová elektroforéza opakované amplifikace DNA**

Příprava 4 % agarózového gelu probíhala stejně jako v kapitole 4.4 a 4.5, takže barva Midori Green Direct byla přidána až po proběhlé PCR-ARMS reakci do zkumavek s PCR produkty. Barva byla také přidána k markeru 100 bp DNA LADDER

H3RTU. Do jamek bylo napipetováno po 10  $\mu$ l v pořadí marker, PCR produkt s mutovanou DNA A, PCR produkt s mutovanou DNA B, PCR produkt se zdravou DNA a PCR mix bez DNA jako negativní kontrola. Obrázek č. 10 je v kapitole 5.5.

## 5 Výsledky

### 5.1 *Koncentrace DNA*

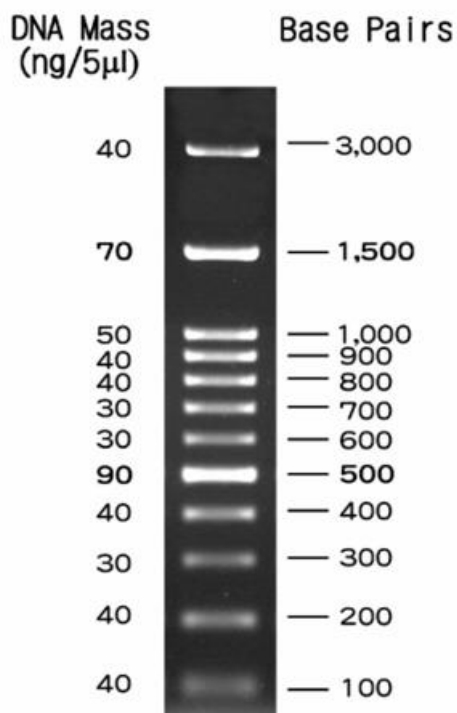
K dispozici jsem měla dva vzorky s mutovanou DNA (V600E) označené A a B. Jako zdravou DNA (bez mutace) jsem používala DNA s LIČ 30/17 (tabulka č. 6). I přes opakované měření se nepodařilo naměřit koncentraci DNA V600E B, zřejmě se pohybovala pod detekčním limitem fluorometru..

Tabulka č. 6: Naměřené koncentrace DNA

<b>Název</b>	<b>Koncentrace</b>
DNA V600E A	72,2 ng/μl
DNA V600E B	0 ng/μl
DNA 30/17	45,1 ng/μl

### 5.2 *Gelová elektroforéza se zdravou DNA a třemi různými PCR mixy*

Kontrolní výsledný PCR produkt má velikost 200 bp. Pro srovnání byl použit marker 100 bp DNA LADDER H3RTU (obrázek č. 7). Různé PCR mixy vykazovaly stejný výsledek, u PCR mixu gb Basic PCR Master Mix byl ale výsledek nejméně zřetelný, proto dále pracuji jen s PCR mixy PCRBIO HS Taq DNA Polymerase a EmeraldAmp GT PCR Master Mix.



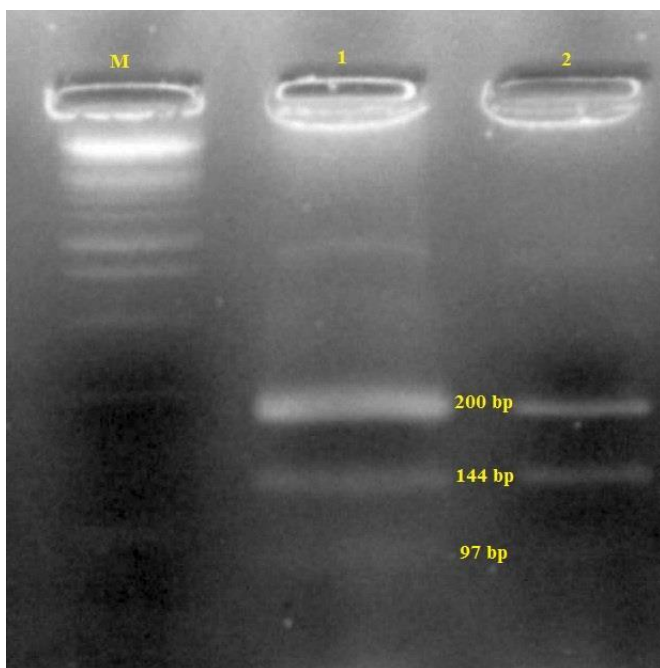
1.5 % TAE agarose gel

Obr. č. 7: 100 bp DNA LADDER H3RTU (Molecular Weight Marker). Velikosti PCR fragmentů na agarózovém gelu. Převzato z: <http://fgf-erk.com/index.php?a=agarosa>

### 5.3 Gelová elektroforéza s mutovanou DNA

Na obrázku č. 8 je gel, ve kterém je v první jamce napipetován marker 100 bp DNA LADDER H3RTU, v druhé jamce PCR produkt, kdy byl použit mix PCRBIO HS Taq DNA Polymerase a ve třetí PCR produkt využívající mix EmeraldAmp GT PCR Master Mix. Výsledný PCR produkt DNA s mutací V600E má velikost 144 bp. Kontrolní výsledný produkt má velikost 200 bp. Na obrázku je vidět, že oba komerční mixy fungují podobně, výsledek získaný pomocí EmeraldAmp GT PCR Master Mix je však zřetelnější, ucelenější a ostřejší.

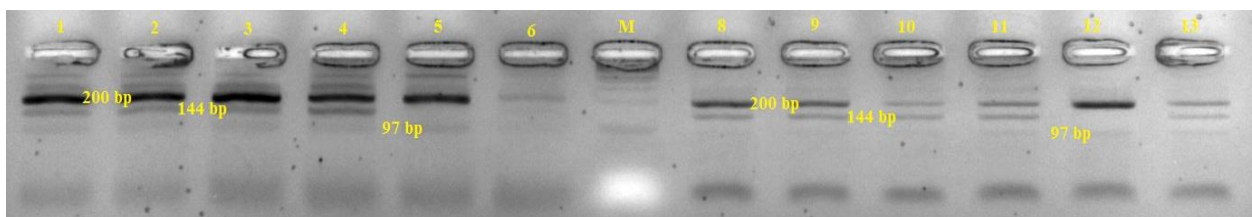




Obrázek č. 8: Agarózový gel. V první jamce (M) je marker 100 bp DNA LADDER H3RTU, v jamce 1 je napipetován PCR produkt amplifikovaný pomocí DNA mix PCR BIO HS Taq DNA Polymerase a v jamce 2 je napipetován PCR produkt amplifikovaný pomocí EmeraldAmp GT PCR Master Mix. V obou případech byla použita DNA V600E A a zřetelně jsou vidět PCR produkty o velikosti 200 bp, 144 bp a 97 bp.

#### **5.4 Gelová elektroforéza s různými koncentracemi DNA**

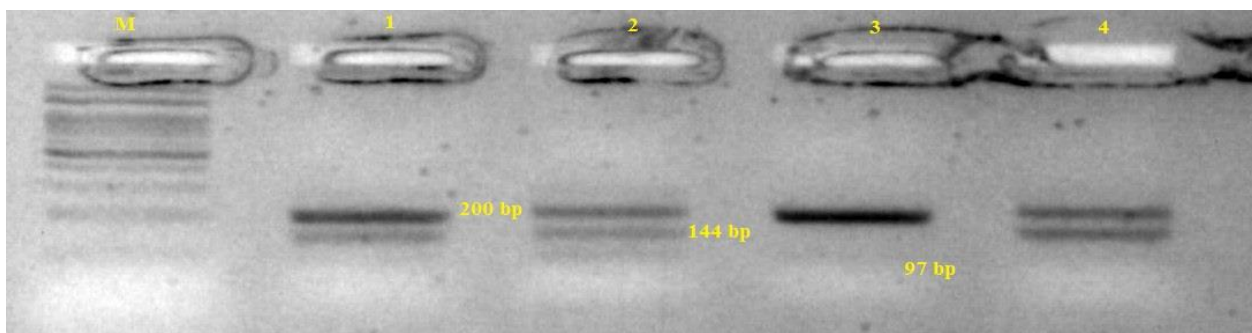
Podle předpokladu mělo vyjít, že v jamkách 1-4 a 8-11 budou PCR produkty o velikosti 200 bp a 144 bp, v jamkách 5 a 12 budou PCR produkty o velikosti 200 bp a 97 bp a jamky 6 a 13 budou prázdné. V jamce 7 (M) byl napipetován marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. Podle obrázku č. 9 byly bohužel jamky 6 a 13 kontaminované, zřejmě při práci s DNA v PCR boxu. Také se nepotvrdil koncentrační gradient, kdy proužky produktů 144 bp měly být zleva doprava silnější a místo toho jsou všechny vidět stejně. To dokazuje, že stačí malé množství mutované DNA a tento test bude pozitivní.



Obrázek č. 9: Agarózový gel. V jamkách 1-4 a 8-11 jsou PCR produkty s různou koncentrací mutované DNA. Ve všech jamkách jsou jasně vidět PCR produkty o velikosti 200 bp a 144 bp, méně zřetelně pak produkty o velikosti 97 bp. V jamkách 5 a 12 je napipetovaná zdravá DNA a jasně jsou vidět produkty o velikosti 200 bp a 97 bp. V jamkách 6 a 13 jsou přítomny negativní kontroly (tzn. do PCR mixu nebyla přidána žádná DNA). Jamka M označuje marker 100 bp DNA LADDER H3RTU.

### 5.5 Gelová elektroforéza opakované amplifikace DNA

Tento krok jsem udělala po nezdařeném pokusu popsaném v kapitole 5.4. Bohužel i v tomto experimentu (obrázek č. 10) byla negativní kontrola kontaminovaná mutovanou DNA. Mix s DNA V600E B, zřejmě obsahoval velice nízkou koncentraci mutované DNA, ačkoli se nám ji nepodařilo pomocí fluorometru změřit. Jelikož jsem si při této opakované práci dávala velký pozor, napadá mě jen odůvodnění, že mohlo dojít ke kontaminaci během přidávání vzorků do zkumavek. Metoda je tedy velice citlivá vzhledem ke kontaminaci.



Obrázek č. 10: Agarózový gel. V první jamce (M) je napipetovaný marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V jamce 1 je PCR produkt obsahující DNA V600E A a jsou zřetelně vidět PCR produkty o velikosti 200 bp a 144 bp. Jamka 2 obsahuje DNA V600E B. V jamce 3 je napipetovaná DNA bez mutace jako zdravá kontrola. Jsou zde vidět produkty o velikosti 200 bp a 97 bp. Negativní kontrola v jamce 4 je opět kontaminovaná.

## 6 Diskuze

Onemocnění maligním melanomem je velice agresivní a od roku 2008 patří Česká republika mezi 15 zemí s jeho nejvyšším výskytem (Genetický test – kožní melanomy, © 2016). V roce 2011 bylo v České republice nahlášeno 2044 nových případů onemocnění zhoubným melanomem (1086 mužů a 958 žen). Ve stejném roce zemřelo na zhoubný melanom 365 občanů České republiky. Incidence melanomu v České republice dlouhodobě roste. V České republice je melanom jedním z nejčastějších novotvarů – v roce 2011 byl 9. nejčastěji diagnostikovaným novotvarem. Zdrojem dat o epidemiologii zhoubných novotvarů v České republice je Národní onkologický registr a správcem je Ústav zdravotnických informací a statistiky v ČR (Zvolský, 2014). Vzhledem k závažnosti této problematiky a s cílem zvýšit povědomí veřejnosti o možnostech prevence byl také ustanoven Evropský den melanomu. V roce 2017 připadl na úterý 9. května.

Molekulární detekce mutací v BRAF genu je důležitá zejména vzhledem k diagnostice nádoru, výběru léčby a může také upřesnit prognózu onemocnění. Dalšími metodami detekce mutace jsou alelově-specifická real-time, COLD-PCR, pyrosekvenování a jiné (Huang et al., 2013). Další používané metody detekce mutace V600 je PCR a reverzní hybridizace kitem BRAF 600/601 StripAssay (Viennlab), popř. metoda real-time PCR kitem cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test (Roche) (Gen BRAF, © 2017).

V praktické části mé práce bylo cílem optimalizovat metodu PCR-ARMS pro detekci mutace V600E v genu BRAF. V laboratoři GENLABS s.r.o. jsem měla k dispozici tři různé PCR master mixy – PCRBIO HS Taq DNA Polymerase, EmeraldAmp GT PCR Master Mix a gb Basic PCR Master Mix. Nejdříve jsem provedla experiment se všemi těmito PCR master mixy a vyřadila gb Basic PCR Master Mix, protože v porovnání se dvěma zbylými byl výsledný PCR produkt hůře detekovatelný. Dále jsem provedla optimalizaci časového profilu, protože studie, ze které jsem čerpala (Huang, 2013) uváděla konkrétně u denaturace, anealingu a extenze čas 20 sekund. Já jsem u denaturace a anealingu ubrala na 15 sekund a čas extenze zvýšila na 30 sekund. Také jsem upravovala vstupní koncentraci DNA.

Různé vstupní koncentrace mutované DNA nepotvrdily, že čím větší koncentrace DNA v mixu je, tím zřetelnější jsou produkty PCR. Takže k testování stačí už od 0,25  $\mu$ l DNA s mutací. Příprava PCR mixů probíhá v dekonaminovaném PCR boxu a neměla by dovnitř vůbec přijít DNA, takže příště musím pracovat přesněji a bez chyb. Oba dva mixy bych doporučila pro stanovení mutace V600E v genu BRAF pomocí metody PCR-ARMS, ovšem v závěru práce pracuji výhradně s EmeraldAmp GT PCR Master Mixem, protože se mi výsledky amplifikace zdály zřetelnější v porovnání s kitem PCR BIO HS Taq DNA Polymerase.

Metoda PCR-ARMS je velice citlivá a při přípravě reakčních mixů musí být dodržena práce v čistém a sterilním prostředí. Velice jednoduše může dojít ke kontaminaci.

## **7 Závěr**

V teoretické části této práce bylo cílem shrnutí aktuálních informací o maligním melanomu, o mutaci V600E a genu BRAF a metodách vyšetření.

V praktické části práce jsem zvládla základní laboratorní metody – izolaci DNA z bukalního stěru i periferní krve, metodu PCR-ARMS pro detekci mutace V600E v genu BRAF a gelovou elektroforézu. Optimalizovaná metoda s DNA o koncentraci 0,25 µl, upraveným anealingem a PCR mixem EmeraldAmp GT PCR Master Mix se v budoucnu bude moci využívat v laboratoři k cílené diagnostice této mutace.

Optimalizaci metody PCR-ARMS pro detekci mutace V600E v genu BRAF považuji za úspěšnou.

## 8 Seznam literatury

- 1 ADJEI, A. A., 2001. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*, 93(14), 1062-1074.
- 2 AJMOVÁ, J., 2005. *Zhoubný melanom kůže*. [online]. [cit. 2017-08-10]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/vyvoj-incidence-mortality-zhoubneho-melanomu-ceske-republice-letech-1980-2011>
- 3 ARENGERGEROVÁ, M., PUZANOV, I., 2012. Mutace BRAF: nový přístup k cílené léčbě melanomu. *Klin Onkol*, 25(5), 323-328.
- 4 BORSKÁ, J., © 2015. *Ultrafialové záření a UV index* [online]. [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://www.geology.cz/mujkousekzeme/veda/dira-dosveta/ultrafialove-zareni>
- 5 BRDIČKA, R., 2014. *Genetika v klinické praxi I*. Praha: Galén. 126 s. ISBN 9788074921063.
- 6 BRDIČKA, R., DIDDEN, W., 2015. Genetika nádorových onemocnění. In: KLEIBL, Z. *Genetika v klinické praxi III*. Praha: Galén, 44-45 s. ISBN 978-80-7492-226-8.
- 7 ČIHÁK, R., 2004. *Anatomie 3*. 2. vydání. Praha: Grada. 692 s. ISBN 80-247-1132-X.
- 8 ČURN, V. et al., 2008. *Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (Solanum tuberosum L.)*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 53 s. ISBN 978-80-7394-135-2.
- 9 DAVIES, H., et al., 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954, doi: 10.1038/nature00766.
- 10 DIENSTBIER, Z., 2010. *Jak a proč si chránit kůži*. Praha: Liga proti rakovině Praha, 8 s. ISBN 978-80-254-8022-9.
- 11 DVOŘÁKOVÁ, L. et al., 2002. *Molekulárně genetická diagnostika v klinické medicíně* [online]. [cit. 2017-06-05]. Dostupné z:

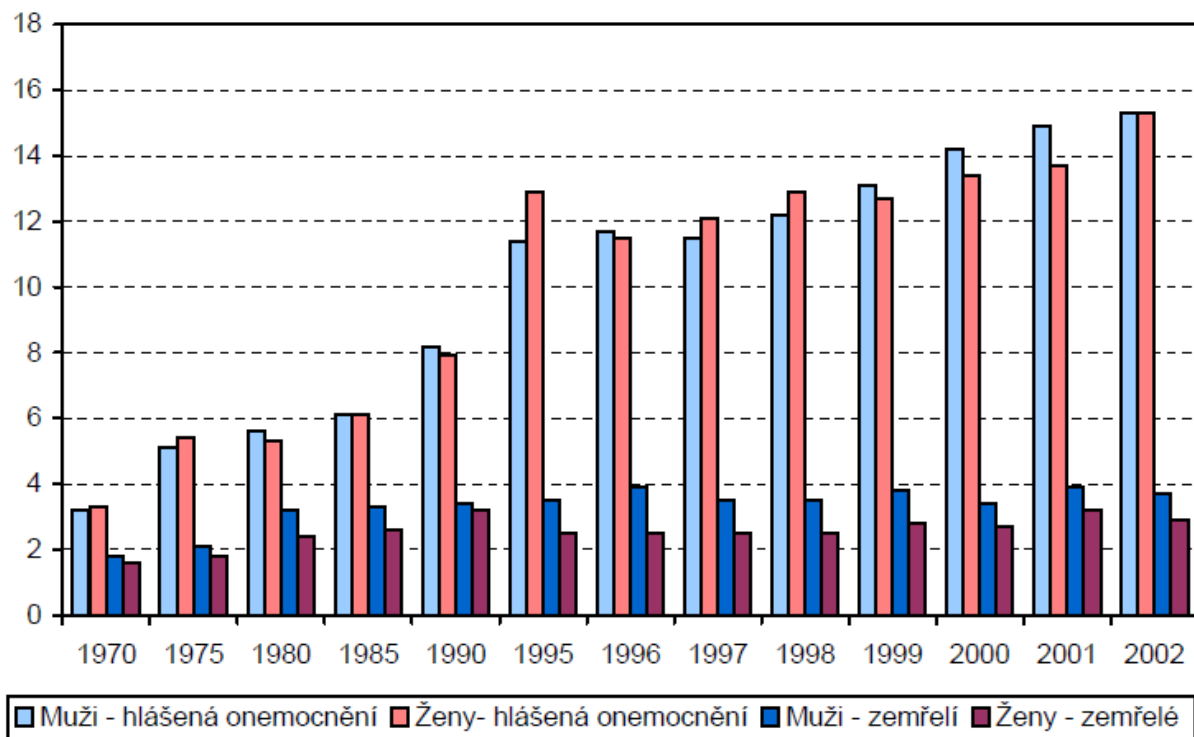
- <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/molekularne-geneticka-diagnostika-v-klinicke-medicine-146700>
- 12 FLAHERTY, K. T., 2012. *Vemurafenib: A First in Class Serine-Threonine Protein Kinase Inhibitor for the Treatment of Malignant Melanoma With Activating BRAF Mutations*. [online]. [cit. 2017-08-10]. Dostupné z: <http://www.medscape.com/viewarticle/771620>
  - 13 FORETOVÁ, L., et al., 2014. *Molekulární genetika v onkologii*. Praha: Mladá fronta a. s. 183 s. ISBN 978-80-204-3236-0.
  - 14 GARBER, J. E., OFFIT, K., 2005. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol*, 23(2), 276-292. doi: 10.1200/JCO.2005.10.042.
  - 15 GARNETT, M. J. et al., 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*, 6(4), 313-319, doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.022.
  - 16 *Gen BRAF*, © 2017. [online]. [cit. 2017-08-10]. Dostupné z: <http://www.biopsticka.cz/cz/sluzby/molekularni-genetika/diagnostika/BRAF.php>
  - 17 *Genetický test – kožní melanomy*, © 2016. [online]. [cit. 2017-08-10]. Dostupné z: <http://genlabs.cz/sluzby/geneticky-test-kozni-melanomy/>
  - 18 GIACCONE, G., SORIA, J. C., 2013. *Targeted Therapies in Oncology*. 2.vydání. CRC Press, 498 s.
  - 19 GOETZ, P., et al., 2006. Hereditární etiologie nádorových onemocnění a význam genetického poradenství a testování v onkologii. *Klinická onkologie*. 19(4), 44-47. ISSN 0862-495X.
  - 20 HUANG, T., et al., 2013. Sensitive detection of BRAF V600E mutation by Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR. *Biomarker Research*, 1(3), 1-6. doi: 10.1186/2050-7771-1-3.
  - 21 INAMDAR, G. S., et al., 2010. Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail. *Biochem Pharmacol*. 80(5), 624-637, doi: 10.1016/j.bcp.2010.04.029.
  - 22 *Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek*, © 2014. [online]. [cit. 2017-08-11]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyseliny/izolace-dna-pomoci-gravitacnich-kolonek/>



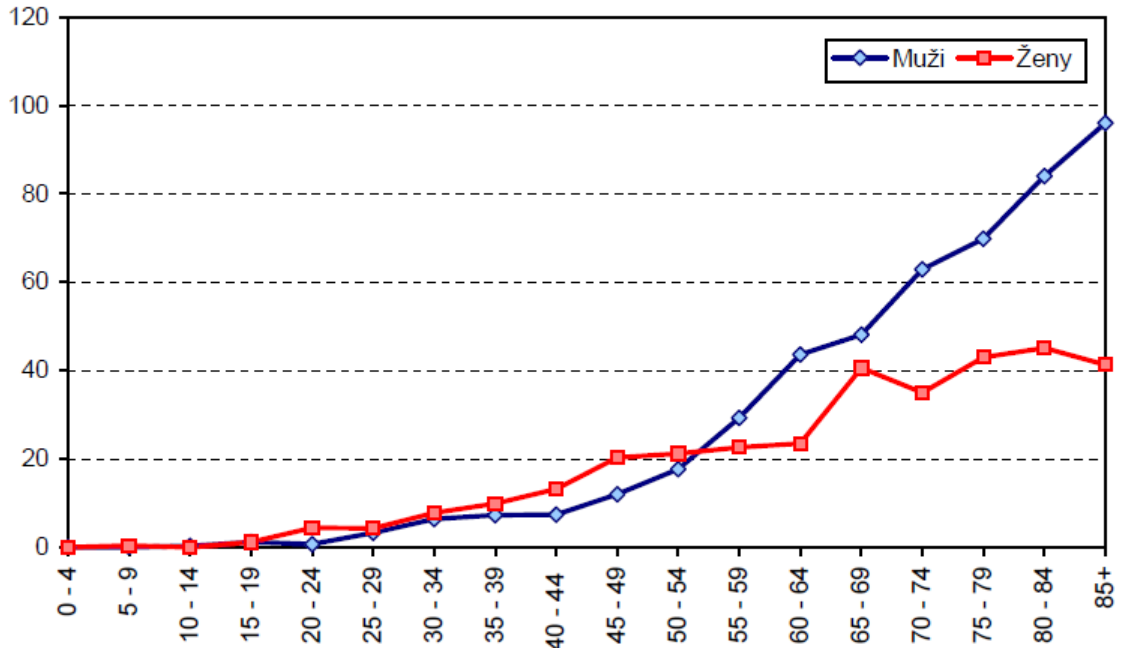
- 23 *Izolace genomové DNA ze savčích buněk, stanovení koncentrace DNA pomocí absorpční spektrofotometrie*, © 2011. [online]. [cit. 2017-06-15]. Dostupné z: <http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/Izolace%20genomov%C3%A9%20DNA.pdf>
- 24 JI, Z., et al., 2012. Targeting the RAS pathway in melanoma. *Trends Mol Med*, 18(1), 27-35, doi: 10.1016/j.molmed.2011.08.001.
- 25 KO, J. M., et al., 2010. Pathways to melanoma. *Semin Cutan Med Surg*, 29(4), 210-217, doi: 10.1016/j.sder.2010.10.004.
- 26 KRAJSOVÁ, I., 2014. Dabrafenib v léčbě metastazujícího melanomu. *Remedia*, 24, 215-219.
- 27 KRUŽICOVÁ, Z., 2010. Maligní melanom. [online]. [cit. 2017-08-10]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/maligni-melanom-450829>
- 28 LAZAROV, M., et al., 2002. CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nat Med*, 8(10), 1105-1114, doi: 10.1038/nm779.
- 29 *Maligní melanom kůže*, © 2005. [online]. [cit. 2017-08-09]. Dostupné z: <http://www.melanomy.cz/?touch=cojetomelanom>
- 30 MERCER, K. E., PRITCHARD, C. A., 2003. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta*, 1653(1), 25-40.
- 31
- 32 *Polymerázová řetězová reakce*, © 2014. [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/pcr/>
- 33 PRŮŠA, R. et al., 1998. *Multimediální učebnice DNA diagnostiky* [online] Praha: 2. lékařská fakulta UK [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>
- 34 *Qubit fluorometer*, © 2017. [online]. [cit. 2017-08-11]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Qubit\\_fluorometer](https://en.wikipedia.org/wiki/Qubit_fluorometer)
- 35 *Rakovina kůže*, © 2016. [online]. [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Rakovina\\_k%C5%AF%C5%BE](https://cs.wikipedia.org/wiki/Rakovina_k%C5%AF%C5%BE)

- 36 ROBERTS, P. J., DER, C., J., 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22), 3291-3310, doi: 10.1038/sj.onc.1210422.
- 37 STRACH, P., © 2017. *Rakovina kůže*. [online]. [cit. 2017-08-08]. Dostupné z: <http://www.strach.medikus.cz/o-nemocech/rakovina-kuze-169>
- 38 ŠTĚPÁN, R., © 2017. *Rakovina kůže* [online]. [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: <http://www.irakovina.cz/rakovina-kuze/>
- 39 TAN, W. W., 2017. *Malignant Melanoma* [online]. [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/280245-overview>
- 40 ZVOLSKÝ, M., 2014. *Vývoj incidence a mortality zhoubného melanomu v České republice v letech 1980-2011*. [online]. [cit. 2017-08-10]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/vyvoj-incidence-mortality-zhoubneho-melanomu-ceske-republice-letech-1980-2011>

## 9 Seznam příloh a obrázků



Příloha č. 1: Vývoj počtu hlášených nových onemocnění a počtu zemřelých na 100 000 obyvatel podle pohlaví na zhoubný melanom kůže, ČR, 1970-2002. Převzato z: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/zhoubny-melanom-kuze>



Příloha č. 2: Počet hlášených nových onemocnění na zhoubný melanom kůže na 100 000 obyvatel podle pohlaví a věkových skupin, ČR, rok 2002. Převzato z: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/zhoubny-melanom-kuze>

Obrázek č. 1: Ukázka normální a mutované sekvence BRAF genu v případě papilárního karcinomu štítné žlázy v exonu 15. Pozitivní vzorek pro mutaci BRAF vykazuje pozitivitu pro heterogenní tymidin-adeninovou transverzi v nukleotidové pozici 1799, která způsobí substituci kyseliny glutamové za valin v kodonu 600 (BRAF V600E mutace rs113488022). Převzato z:

[https://www.researchgate.net/publication/276465570\\_BRAF\\_overexpression\\_is\\_associated\\_with\\_BRAF\\_V600E\\_mutation\\_in\\_papillary\\_thyroid\\_carcinomas](https://www.researchgate.net/publication/276465570_BRAF_overexpression_is_associated_with_BRAF_V600E_mutation_in_papillary_thyroid_carcinomas)

Obrázek č. 2: Hlavní místa účinku cílených chemoterapeutik (žluté rámečky) na schematickém příkladu signálních drah aktivovaných receptorovými tyrosinkinázami (EGFR NEBO ERBB2/3). Zobrazená cílená chemoterapeutika působí jako inhibitory proteinových produktů způsobujících aberantní mitogenní stimulaci, inhibici apoptózy nebo diferenciaci. Tyto poruchy vznikají v důsledku amplifikací nebo aktivačních

mutací (\*) příslušných protoonkogenů kódujících jednotlivé proteinové komponenty přenosu signálu z receptorů lokalizovaných na cytoplazmatické membráně do buněčného jádra (zelené tvary). Podobný účinek mohou mít alterace (\*) tumor-supresorových proteinů (červené tvary), které jsou fyziologickými negativními regulátory zobrazených signálních drah. Převzato z: BRDIČKA, R., DIDDEN, W., 2015. Genetika nádorových onemocnění. In: KLEIBL, Z. *Genetika v klinické praxi III*. Praha: Galén, 45 s.

Obrázek č. 3: Schematické znázornění mechanismu účinku vemurafenibu u karcinomů nesoucích aktivační mutaci BRAF (V600E). Převzato z:  
<http://www.medscape.com/viewarticle/771620>

Obrázek č. 4: Odplavení DNA z kolonky z matrix do připravené sběrné zkumavky. Převzato z: <http://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyseliny/izolace-dna-pomoci-gravitacnich-kolonek/>

Obrázek č. 5: Princip polymerázové řetězové reakce. Převzato z:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

Obrázek č. 6: V jedné PCR zkumavce jsou přítomny čtyři specifické primery. Primer Fo a Ro generuje běžný fragment 200 bp zahrnující místo mutace. Primer Fo a Rimut generuje fragment o velikosti 144 bp specifický pro mutaci BRAF V600E. Primer Fiwt- a Ro generuje fragment o velikosti 97 bp specifický pro nemutovaný gen BRAF. Převzato z: HUANG, T., et al., 2013.

Obrázek č. 7: 100 bp DNA LADDER H3RTU (Molecular Weight Marker). Velikosti PCR fragmentů na agarózovém gelu. Převzato z: <http://fgf-erk.com/index.php?a=agarosa>

## 10 Seznam zkratek

ARMS	amplifikační refrakční mutační systém
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRIM2	BRAF inhibitors in melanoma 2
CR1	konzervativní doména
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky (European Medicines Agency)
ERK	extracellular receptor regulated kinase
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GAG	kyselina glutamová
GTG	valin
GTP	guanosine triphosphate
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LIČ	laboratorní identifikační číslo
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK/ERK kinase (mitogen-activated protein kinase-kinase)
MAP4K5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5
MEK	mitogen-activated protein kinase-kinase
NGS	sekvenování nové generace
PCR	polymerázová řetězová reakce
RAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene
RAS	intracelulární signální protein
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	ultrafialové záření