

Dokazovanje mutacij v genu *BRCA1*

z analizo talitvene krivulje produktov PCR

S. Novakovič, V. Stegel in P. Cerkovnik

Povzetek

Rak dojke je z nekaj več kot 1000 novimi bolnicami na leto na prvem mestu po številu obolelih žensk za rakastimi boleznimi v Sloveniji. Številka vključuje sporadične in dedne oblike raka na dojki. Dedne oblike raka na dojki so najpogosteje povezane z mutacijami v genih *BRCA1* in *BRCA2*, zato se številni strokovnjaki s tega področja zavzemajo za genetsko testiranje bolnikov, pri katerih obstaja sum na dedno obliko bolezni. Testiranje bolnic/-kov in njihovih sorodnikov je dokaj težavno zaradi zahtevnosti metod genetskega testiranja, stroškov testiranja ter nezadostnega poznavanja in predvidevanja vseh možnih vplivov dokazane mutacije pri nastanku raka na dojki. V tem delu predstavljamo osnovne metodološke podatke za odkrivanje petih različnih mutacij v genu *BRCA1* pri bolnicah/-kih s karcinomom dojke in njihovih sorodnikov. Mutacije 1806C>T, 300T>G, 300T>A, 310G>A, 5382insC določamo s polimerazno verižno reakcijo (PCR) v realnem času in analizo talitvene krivulje. Primerjava z neposrednim sekveniranjem je pokazala, da je uporabljena metoda dovolj občutljiva in hitra za dnevno rutinsko določanje mutacij v DNA, izolirani iz periferne krvi.

Uvod

V 5 do 10 % vseh primerov raka dojke gre za dedno obliko te bolezni. Od vseh dednih rakov dojke so ti posledica mutacij v genu *BRCA1* v približno 20 % do 40 % in v genu *BRCA2* v 10 % do 35 %. Incidenca raka dojke je pri nosilkah/-cih mutacij v genu *BRCA1* okrog 50 %. Poleg tega je pri nosilcih teh mutacij povečano tveganje za nastanek raka jajčnikov, širokega črevesa in prostate.

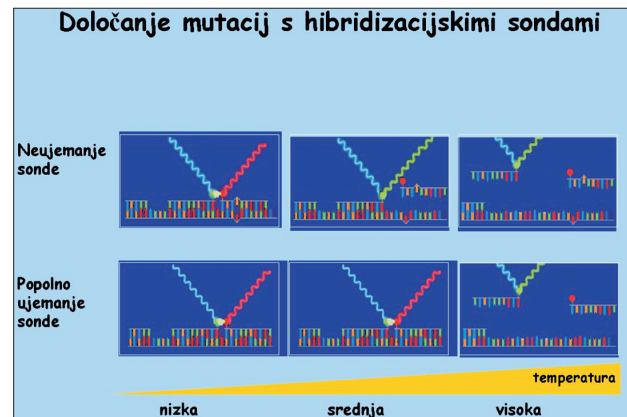
Če poznamo vrsto in mesto mutacij, jih lahko razmeroma preprosto in hitro dokažemo. Ena skupina metod za hitro določanje mutacij temelji na pomnoževanju tistih delov gena, kjer mutacijo pričakujemo, ter vezavi specifičnih sond na pomnoženo DNA. Iz nastalih razlik v talitveni krivulji pri nemutiranih in mutiranih genih potrdimo prisotnost mutacij. V tem prispevku prikazujemo določanje znanih mutacij v genu *BRCA1* – 1806C>T, 300T>G, 300T>A, 310G>A, 5382insC z uporabo PCR v realnem času.

Materiali in metode

Genomsko DNA smo izolirali iz periferne krvi preiskovancev z »DNA blood isolation kit« (Quiagen, Hilden, Nemčija). Primerje in sonde smo zasnovali in oblikovali v našem laboratoriju, sintetiziralo pa jih je podjetje TIB Molbiol (Berlin, Nemčija).

PCR v realnem času in analizo talitvene krivulje smo

opravili na Light Cyclerju (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Nemčija) po navodilih proizvajalca (Light Cycler Fast Start master hybridization probes, Roche Molecular Biochemicals). Če na kratko povzamem – DNA smo s pomočjo PCR pomnožili z našimi primerji. K mešanici smo dodali še specifične hibridizacijske sonde, ki so nosile fluorescentna barvila. Po končani PCR smo opravili talitveno analizo produktov, na katerih so bile vezane sonde, ter ugotovili prisotnost mutacij (slika 1).



Slika 1. Določanje mutacij na podlagi analize talitvene krivulje produktov PCR. Za tovrstno analizo uporabljamo specifični sonde, ki ju imenujemo »pritrđitvena« in »mutacijska« sonda. Na sondi so vezani sevalci, ki po vzburlenju oddajajo svetlobo različnih valovnih dolžin. Tako imenovana pritrđitvena sonda se veže tik pred mutacijo in po vzburlenju s spektrom vidne svetlobe oddaja svetlobo valovne dolžine v rdečem in infrardečem delu spektra. Ta energetska zadoščja za spodbujanje sevalca na sondi, ki se veže prek mesta, kjer je mutacija. Sevalec mutacijske sonde oddaja svetlobo v modrozelenem delu spektra. Modrozeleno svetlobo nastaja toliko časa, dokler sta sondi skupaj. Z višanjem temperature se v vzorcih z mutacijo sonda, ki se veže prek mesta, kjer je mutacija, prej sprosti zaradi nepopolnega ujemanja z verigo DNA. Tam, kjer mutacije ni, se sonda sprosti pozneje. Kot rezultat tega vidimo pri heterozigotih z mutacijo dva vrhova sekundarno inducirane svetlobe (enega pri nižji in enega pri višji temperaturi) in samo en vrh v vzorcih brez mutacije.

Rezultati in diskusija

Različne vrste raka so povezane z mutacijami v genih *BRCA1* in *BRCA2*. Med najpogostejšimi so rak dojke, jajčnikov, trebušne slinavke, prostate, jajcevodov, rak grla ter levkemije in limfomi pri odraslih. Kljub številnim vrstam raka, ki nastanejo kot posledica mutacij v omenjenih genih, so nosilke/-ci teh mutacij predvsem rizične/-i za nastanek raka dojke in/ali jajčnikov. Mutacije v genih *BRCA1* in

BRCA2 povečajo verjetnost nastanka raka dojk glede na normalno populacijo tudi za 10x. Tveganje za nastanek raka jajčnikov je pri nosilkah mutacij v genu *BRCA1* glede na normalno populacijo 5–7x večje, medtem ko je pri nosilkah mutacij v genu *BRCA2* nekoliko manjše in je 2–3x večje kot pri normalni populaciji.

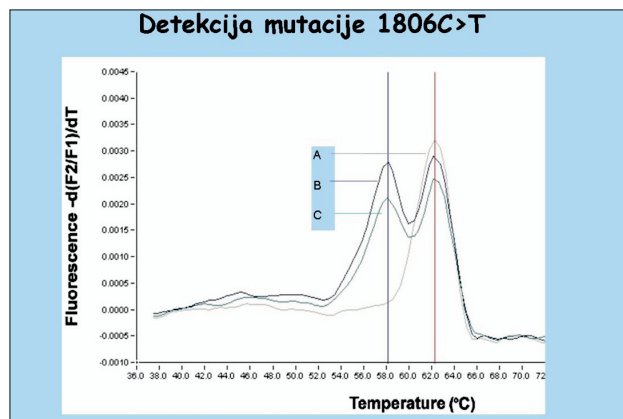
Upoštevajoč, da je slovenska populacija dokaj etnično omejena in da je rak dojk na prvem mestu od vseh rakastih bolezni pri ženskah v Sloveniji, smo leta 2001 začeli z genetskim svetovanjem in testiranjem oseb, ki so navajale več primerov raka dojk ali jajčnikov v družini.

Tabela 1. Mutacije pri slovenskih bolnikih, ki smo jih določali z metodo PCR v realnem času ter z analizo talitvene krivulje produktov.

Vrsta mutacije	Število preiskovancev	Število določenih mutacij	Št. LC pozitivnih/št. s sekv. reak. potrjenih*
1806C>T	177	12	12/12
300T>G	31	4	4/4
300T>A	5	0	0/2
310G>A	2	1	1/1
5382insC	17	4	4/4

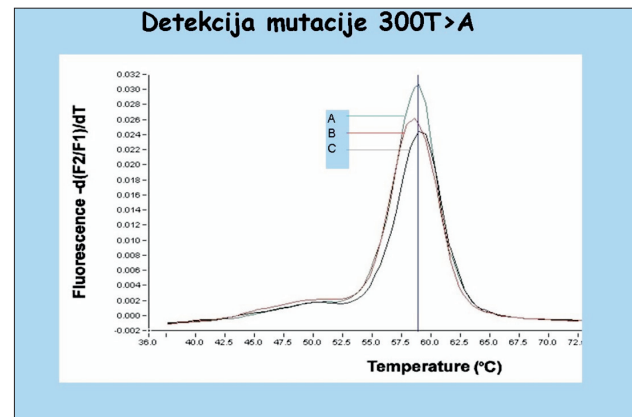
* Število pozitivnih vzorcev, ki smo jih določili z metodo PCR v realnem času in analizo talitvene krivulje produktov na Light Cyclerju (LC)/število vzorcev, ki smo jih potrdili s sekvenčno analizo.

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana določamo predvsem tiste mutacije, ki so se izkazale kot najpogostejše v slovenskih družinah. Mednje spadajo mutacije v genu *BRCA1* – 1806C>T, 300T>G, 300T>A, 310G>A, 5382insC – in pridobljena slovenska mutacija IVS162A>G v genu *BRCA2*. Metoda, ki smo jo uvedli za testiranje mutacij 1806C>T, 300T>G, 310G>A in 5382insC v genu *BRCA1*, popolnoma korelira z rezultati sekvenčne analize, ki je bila opravljena v Laboratory of Medical Genetics – Vrije University Brussels (tabela 1, slika 2). V primeru mutacije 300T>A pa s to metodo nismo uspeli potrditi



Slika 2. Analiza talitvene krivulje produkta PCR za mutacijo 1806C>T. Homozigotni vzorec brez mutacije, ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo, ima samo en vrh (A). Pozitivna kontrola za mutacijo (C) in preiskovani vzorec (B) sta heterozigota in imata dva vrhova.

prisotnosti mutacij, ki so jih sicer dokazali s sekvenčno analizo (slika 3).



Slika 3. Analiza talitvene krivulje produkta PCR za mutacijo 300T>A. Homozigotni vzorec brez mutacije, ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo, ima samo en vrh (A). Prav tako imata samo en vrh tudi pozitivna kontrola (C) in preiskovani vzorec (B). Rezultat te analize pokaže, da sta uporabljeni sonde za to mutacijo premalo občutljivi in da z njima mutacije ne moremo določati.

Sklep

Na podlagi naših rezultatov in rezultatov sodelovanja z laboratorijem iz Bruslja lahko sklenemo, da smo uspešno zasnovali in oblikovali primerje in sonde za dokazovanje mutacij 1806C>T, 300T>G, 310G>A in 5382insC v genu *BRCA1*. Po optimizaciji je metoda PCR v realnem času in analiza talitvene krivulje produktov izredno občutljiva (senzitivna) in kot taka uporabna za določanje mutacij. Čeprav smo primerje za mutacijo 300T>A pravilno izbrali in pripravili, metoda ni bila dovolj občutljiva in je torej neuporabna za rutinsko določanje te mutacije.

Viri

1. Roest PAM, Roberts RG, Sugino S, van Omen GJB, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutation. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1719–21.
2. Hayashi K, Wenz HM, Inazuka M, Tahira T, Sasaki T, Atha DH. SSCP analysis of point mutations by multicolor capillary electrophoresis. *Methods Mol Biol* 2001; 163: 109–26.
3. Myer RM, Lumelsky N, Lerman LS, Maniatis T. Detection of single base substitution in total genomic DNA. *Nature* 1985; 313: 495–8.
4. Foy CA, Parkers HC. Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clin Chem* 2001; 47: 990–1000.
5. Wilhelm J, Pingout A. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem* 2003; 4: 1120–8.
6. Gerard P, Pindolia MS, Worsham MJ. A rapid and sensitive approach to mutation detection using real-time polymerase chain reaction and melting curve analyses, using *BRCA1* as example. *Mol Diagn* 1999; 4: 241–6.
7. DeVita TV, Hellman S, Rosenberg AS, editors. Principles and practice of Oncology 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

8. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302: 643–6.
9. Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1215–23.
10. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 1997; 336: 1401–8.