

# DOKAZOVANJE MUTACIJ V BRCA1 GENU Z ANALIZO TALITVENE KRIVULJE PCR PRODUKTOV

Srdjan Novaković, Vida Stegel, Mateja Krajc, Janez Žgajnar,  
Nikola Bešić, Marko Hočevar, Cvetka Bilban Jakopin,  
Katarina Lokar

Onkološki inštitut Ljubljana

## 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 dojk. Dedne oblike raka dojke so najpogostejše povezane z mutacijami v *BRCA1* in *BRCA2* genih. 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 in nezadostnega poznavanja in predvidevanja vseh možnih vplivov dokazane mutacije pri nastanku raka dojke. V tem delu predstavljamo osnovne metodološke podatke za odkrivanje petih različnih mutacij v *BRCA1* genu pri bolnicah/kih s karcinomom dojke in njihovih sorodnikih. Mutacije 1806C>T, 300T>G, 300T>A, 310G>A, 5382insC določamo s pomočjo polimerazne verižne reakcije (PCR) v realnem času in analizo talitvene krivulje. Primerjava z direktnim sekveniranjem je pokazala, da je uporabljena metoda dovolj občutljiva in hitra za dnevno rutinsko določanje mutacij v DNA izolirani iz periferne krvi.

## Uvod

Pet do 10% vseh primerov raka dojk so dedna oblika te bolezni. Od vseh dednih rakov dojk so le-ti posledica mutacij v genu *BRCA1* v približno 20% do 40% in v genu *BRCA2* v 10% do 35%. Incidenca raka dojk je pri nosilkah/cih mutacij v genu *BRCA1* okrog 50%. Poleg tega imajo nosilci teh mutacij povečano tveganje za nastanek raka jajčnikov, širokega črevesa in prostate.

V primeru, da poznamo vrsto in mesto mutacije, jih lahko relativno enostavno 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 prikazu-

jemo 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 s pomočjo »DNA blood isolation kit« (Quiagen, Hilden, Germany). Primerje in sonde smo zasnovali in oblikovali v našem laboratoriju, sintetizirala pa jih je firma TIB Molbiol (Berlin, Germany).

PCR v realnem času in analizo talitvene krivulje smo opravili na Light Cycler-ju (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) po navodilih proizvajalca (Light Cycler Fast Start master hybridization probes, Roche Molecular Biochemicals). Če na kratko povzamem - DNA smo pomnožili s pomočjo PCR 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.

## Rezultati in diskusija

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

**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
300 T>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 Cycler-ju (LC)/število vzorcev, ki smo jih potrdili s sekvencno analizo

2001 začeli z genetskim svetovanjem in testiranjem oseb, ki so navajale več primerov raka dojk ali jajčnikov v družini.

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana določamo prvenstveno tiste mutacije, ki so se izkazale kot najbolj pogoste v slovenskih družinah. Med te sodijo 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). V primeru mutacije 300T>A pa s to metodo nismo uspeli potrditi prisotnosti mutacij, ki so jih sicer dokazali s sekvenčno analizo.

## Zaključek

Na osnovi naših rezultatov in rezultatov sodelovanja z laboratorijem iz Bruslja lahko zaključimo, 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 in literatura

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 7<sup>th</sup> 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. Struwing 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.