

DETEKCE BODOVÝCH MUTACÍ V KIRSTEN *RAS 2* GENU METODOU LOCKED NUCLEIC ACIDS CLAMPED PCR

MARTIN BERÁNEK^a, JAN BUREŠ^b, MARTIN ŠÁCHA^c, LUKÁŠ SÁKRA^c, MILOŠ RAJMAN^c, PAVEL JANDÍK^d, EMIL RUDOLF^e a OLFERT LANDT^f

^a Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, ^b 2. Interní klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, ^c Chirurgická klinika, Krajská nemocnice Pardubice, ^d Chirurgická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, ^e Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy Hradec Králové, ^f TIB MOLBIOL, Berlin, SRN
beranek@lfhk.cuni.cz

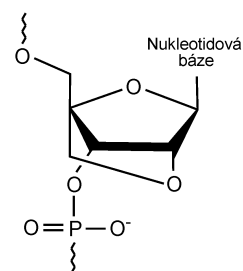
Došlo 28.2.07, přijato 9.5.07.

Klíčová slova: DNA, gen *K-ras*, polymerasová řetězová reakce, somatické mutace, kolorektální karcinom

Úvod

LNA molekuly (locked nucleic acids, tedy volně přeloženo nukleové kyseliny s „uzamčenou“ konformací) patří mezi syntetická analoga přirozených nukleotidů, která lze chemicky spojit v LNA oligonukleotidové řetězce. Vzniklé oligomery disponují řadou strukturních i funkčních odlišností oproti přirozeným řetězcům nukleových kyselin. Důležitou součástí každého LNA monomeru je methylenový můstek mezi 2'-hydroxylovou skupinou a 4'-uhlíkem furanosového kruhu (oxy-LNA), viz obr. 1. Hydroxylovou skupinu na 2'-uhlíku je možno též substituovat skupinou thiolovou (thio-LNA) nebo aminovou (amino-LNA). Methylenový můstek určující bicyklický charakter LNA nukleotidů fixuje ribosu v 3'-endo konformaci, což významně zvyšuje termodynamickou a biologickou stabilitu komplementárně vznikajících LNA/DNA či LNA/RNA dvoušroubovic v porovnání s jejich nemodifikovanými analogy^{1,2}. Začleněním jediného LNA nukleotidu do sekvence oligomeru lze po hybridizaci s komplementárním řetězcem zvýšit teplotu tání výsledné dvoušroubovice o 1–3 °C (cit.³).

Vyšší afinita ke komplementárním sekvencím, větší odolnost vůči účinkům nukleas, a následně delší biologické



Obr. 1. Chemická struktura oxy-locked nucleic acids (LNA)

ký poločas v porovnání s přirozenými analogy jsou důležité aspekty potenciálního využití LNA oligonukleotidů nejen v léčbě malignit, virových infekcí, autoimunitních onemocnění či alergií⁴, ale také v klinické diagnostice. Fluorescenčně značené sondy konstruované na bázi LNA oligomerů se používají při FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) analýzách nebo při detekci bodových mutací pomocí polymerasové řetězové reakce v reálném čase (real-time PCR, ve zkratce rt-PCR)³. Neznačené LNA oligomery jsou součástí kotvicích sond (tzv. LNA-capture probes) při vyšetření jednonukleotidových polymorfismů v mikrotitračních destičkách a při detekci somatických mutací, které provázejí maligní transformaci buněk v různých biologických tkáních^{5–7}.

Somatické bodové mutace v genu *K-ras* (Kirsten *ras 2* gen, lokalizace 12p12.1) se objevují u 30–50 % případů sporadického kolorektálního karcinomu; onemocnění provázeného genetickými změnami v mnoha protoonkogenech, tumor supresorových genech a genech opravných (reparových). Mutace v genu *K-ras* byly prokázány nejen v nádorové tkáni, ale též ve stolici⁸ a v krevní plasmě postižených osob⁹. Genetické změny vázané především na kodony 12 a 13 jsou jednou z klíčových událostí při transformaci buněk benigního střevního adenomu v zhoubný kolorektální karcinom¹⁰.

Konstrukcí plně komplementárních krátkých syntetických oligonukleotidů vůči „zdravým“ alelám genu *K-ras*, které byly vytvořeny na bázi PNA molekul (peptide nucleic acids, základ oligomeru tvoří 2-aminoethylglycinový řetězec) a jejich přidáním do reakční směsi lze takto zvýhodnit amplifikaci alel mutantních. Díky vytvoření komplementární „svorky“ mezi PNA oligomerem a alelami s normální sekvencí byl tento děj označen jako PCR clamping. Pomocí této modifikace metody PCR byla s velkou citlivostí a specifícností zjištěna přítomnost mutantních alel genu *K-ras* ve vzorcích cholangiokarcinomu, karcinomu pankreatu¹¹, endometria¹² a plic¹³. Relativními nevýhodami PNA oligomerů jsou nižší rozpustnost a precipitace během skladování, nižší teplota tání a v některých aplikacích též vyšší nespecifické pozadí při rt-PCR. Cílem naší studie bylo využít diagnostické možnosti neznačených LNA oligonukleotidů pro detekci mutací genu *K-ras* metodou rt-PCR clamping ve vzorcích malignizovaných tumorů tlustého střeva.

Experimentální část

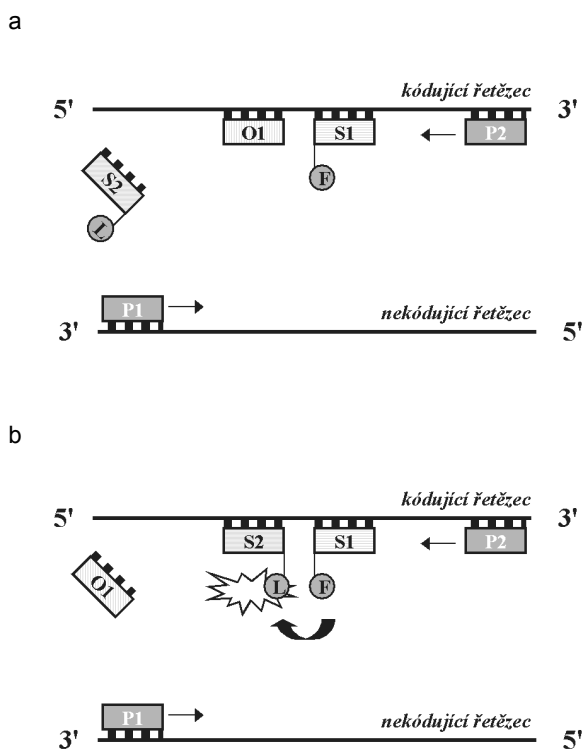
Do studie bylo zařazeno 133 vzorků primárních sporadických střevních adenokarcinomů pacientů Chirurgické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové, Chirurgické kliniky Krajské nemocnice Pardubice a 2. Interní kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Každý kolorektální karcinom byl klasifikován klinicky dle TNM stupnice (zkratka z anglických slov tumor, node a metastasis) a histologicky dle stupně buněčné diferenciaci. Kontrolní skupinu tvořilo 20 bioptických vzorků morfologicky normální střevní sliznice osob s negativním koloskopickým vyšetřením. Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a veškerý biologický materiál byl získán s informovaným souhlasem pacientů. Všechny vzorky tkání pocházely z čerstvých resektátů či vzorků čerstvě bioptovaných. Bezprostředně po odběru byly vzorky v plastových zkumavkách uloženy do mrazicího boxu na teplotu $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ani v jednom případě nebyl použit vzorek po fixaci ve formalínu nebo zalitý v parafinovém bločku.

Stabilizovaná buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu SW480 ($p53^{-/-}$, $APC^{-/-}$) byla získána z American Type Culture Collection (ATCC), USA. Tato linie obsahuje bodovou mutaci GGT \rightarrow GTT (G12V) v kodonu 12 genu *K-ras*. Buňky byly kultivovány v Dulbekově modifikovaném Eaglově médiu (Gibco, USA) obohaceném o 10% fetální hovězí sérum (Gibco, USA), penicilin G (100 U ml^{-1}) a streptomycin (100 mg ml^{-1}). Inkubace probíhaly v inkubátoru s řízenou atmosférou (5% CO_2) při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Buněčné kultury byly pasážovány dvakrát týdně pomocí 0,05% roztoku trypsin/EDTA dle protokolu společnosti ATCC.

DNA byla ze vzorků tumorů a z buněčného sedimentu linie SW480 izolována standardní fenol-chloroformovou extrakční metodou¹⁴. Vyšetření pomocí rt-PCR byla provedena v přístroji LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics, SRN). Reakční objem ve skleněných kapilárách byl 10 μl . Každá kapilára obsahovala 60 ng DNA templátu, 1 μl reakční směsi LightCycler DNA Master HybProbe (Roche), chlorid hořečnatý (finální koncentrace ve směsi 5 mmol l^{-1}), fluorescenčními značkami opatřené hybridizační sondy S1 a S2 (každá s finální koncentrací $0,3\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$), oxy-LNA oligomer O1 ($0,1\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$) a dva primery P1 a P2 ($0,5\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$). Sondy S1 a S2 hybridizovaly ke kódujícímu řetězci ve vzájemné vzdálenosti dva nukleotidy – pro účinný přenos fluorescenční rezonanční energie (FRET, fluorescence resonance energy transfer) mezi použitými fluorochromy. Sonda S1 byla na 3'-konci značena fluoresceinem (donor-fluorochrom s excitačním maximem 497 nm a emisním maximem 525 nm); sonda S2 byla na svém 5'-konci značena fluorescenční značkou LC RED 705 (akceptorový fluorochrom s emisním maximem 705 nm , Roche) a její hydroxylová skupina na 3'-uhlíku byla blokována fosforylací (v sekvenci sondy S2 označeno symbolem PH-3') pro zabránění polymerace. Stejným způsobem byl opatřen i 3'-konec použitého oxy-LNA oligomeru O1. Oba primery (P1 primer: $5\text{'-AGG CCT GCT GAA AAT GAC TG-3'}$

a P2 primer: $5\text{'-GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGC A-3'}$), sondy (S1, donor fluorescence: $5\text{'-CGT CCA CAA AAT GAT TCT GAA TTA GCT GTA TCG TCA AGG CAC T-fluorescein-3'}$; sonda S2, akceptor fluorescence: $5\text{'-LC RED 705-TTG CCT ACG CCA CAA GCT CCA A-PH-3'}$) a oxy-LNA oligomer O1 ($5\text{'-CCT ACG CCA CCA GCT CC-PH-3'}$) byly syntetizovány v TIB MOLBIOL, SRN podle návrhu Chen a spol.¹¹. Délka amplifikovaných PCR produktů byla 164 bp. Pozice nasedání primerů, sond a LNA oligomeru O1 na řetězce DNA schematicky znázorňují obr. 2a,b. Teplotní podmínky pro rt-PCR byly následující: iniciační denaturace 10 minut při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ následovaná 45 amplifikačními cykly (denaturace 5 s při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, hybridizace primerů 10 s při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, elongace 7 s při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$). Celková doba analýz se pohybovala okolo 60 minut.

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z nádorové buněčné linie SW480. Negativní amplifikační kontrolu



Obr. 2. Schematické znázornění pozic primerů (P1 a P2), sond (S1 a S2) a oxy-LNA oligomeru (O1) v exonu 1 genu *K-ras*; obr. 2a ukazuje situaci, kdy je ve vzorku přítomna DNA s normální sekvencí v genu *K-ras* a oligomer O1 díky vyšší komplementaritě vytěsňuje při optimální teplotě sondu S2 z vazby na DNA templát, což vede k ztrátě možnosti přenosu fluorescenční rezonanční energie mezi dvojicí fluorochromů vázaných na koncích hybridizačních sond, tj. fluoresceinu (F) jako donoru fluorescence a LC 705 (L) jako akceptoru fluorescence. Na obr. 2b je znázorněna situace, kdy v přítomnosti mutantní alely genu *K-ras* (v kodonu 12) přednostně hybridizuje sonda S2 a po přenosu fluorescenční rezonanční energie dochází k emisi záření fluorochromu LC 705 a k jeho následnému zachycení na detektoru

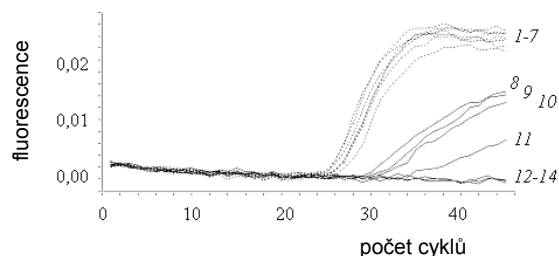
tvářila reakční směs bez přítomnosti DNA templátu. K vyloučení možnosti inhibice rt-PCR byl každý vzorek DNA amplifikován paralelně s a bez přítomnosti LNA molekul v reakční směsi. Pro ověření výsledku a pro bližší specifikaci zjištěného typu bodové mutace byla stanovena nukleotidová sekvence PCR produktů s použitím soupravy GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit a kapilárního sekvenátoru CEQ 8000 (Beckman Coulter, USA).

Ředící řada vzorků pro zjištění citlivosti metody byla připravena sériovým ředěním DNA pocházející z linie SW480 extrakty DNA kontrolní skupiny s normální sekvencí genu *K-ras* (sekvence byly předem ověřeny stanovením nukleotidové sekvence v exonu 1). Vytvořená ředící řada obsahovala tento podíl mutantních alel v 60 ng DNA templátu: 33 %; 6,7 %; 1,3 %; 0,27 %; 0,05 %; 0,01 %.

Výsledky a diskuse

Amplifikace produktů z oblasti 1. exonu genu *K-ras* pomocí rt-PCR proběhla ve všech DNA vzorcích extrahovaných z nádorové i nenádorové (kontrolní) tkáně. Selektivní amplifikace mutantních alel při LNA-clamped rt-PCR prokázala přítomnost bodové mutace v genu *K-ras* u 45 vyšetřených karcinomů (34 %). Frekvence výskytu mutací ve sledovaném souboru vzorků je v souladu s výsledky našich předchozích experimentů¹⁵. Amplifikační křivky typické pro mutantní alely genu *K-ras* ukazuje obr. 3.

Následná konfirmace provedená stanovením nukleotidové sekvence PCR produktů umožnila blíže specifikovat všechny detegované mutace. Přestože jsme pro LNA-

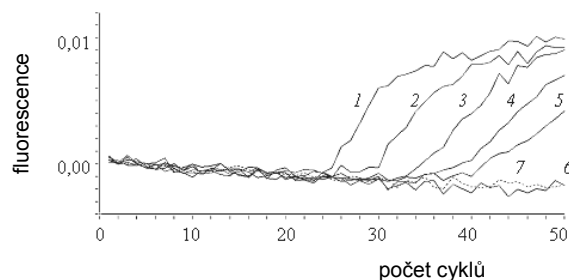


Obr. 3. **Amplifikační křivky real-time PCR;** oblast 1. exonu genu *K-ras* byla amplifikována v přítomnosti fluorescenčních hybridizačních sond umožňujících vizualizaci vznikajících PCR produktů. Přerušovanými čarami 1–7 jsou znázorněny amplifikace bez přítomnosti LNA oligomeru v reakční směsi, plnými čarami 8–14 jsou vyznačeny amplifikace totožných vzorků DNA při LNA-clamped rt-PCR. Ve čtyřech případech zde byly detegovány bodové mutace v genu *K-ras*. Stanovením nukleotidové sekvence byly následně zjištěny mutace G12D (tomuto vzorku odpovídá amplifikační křivka 8), G12S (křivka 9), G12V (křivka 10) a G13D (křivka 11). Ve třech případech byly mutace vyloučeny (nedošlo k amplifikaci, křivky 12–14). Vzhledem k přítomnosti jak mutantní, tak normální sekvence v DNA extraktech získaných z kolorektálních karcinomů jsou amplifikace prováděné bez přítomnosti oxy-LNA oligomeru silnější a počty cyklů rt-PCR nutných pro detekci fluorescenčního signálu nižší

clamped rt-PCR použili fluorescenční sondu navrženou primárně pro mutantní typ GGT→TGT (G12C), který byl zachycen ve dvou vzorcích, použitá metoda byla schopna spolehlivě detegovat taktéž substituce GGT→GAT (G12D, 17 případů), GGT→GTT (G12V, 16 případů), GGT→AGT (G12S, 4 případy) a GGT→GCT (G12A, 2 případy), a to ve frekvencích blízkých závěrům větších populačních studií¹⁶. Bodové mutace v genu *K-ras* analyzované metodou rt-PCR clamping ve vzorcích karcinomu pankreatu a cholangiokarcinomu jsou prokazovány výhradně v 12. kodonu genu¹¹. Konstrukce použitých sond nám však v případě kolorektálního karcinomu umožnila zachytit rovněž genetické změny v kodonu 13. Záměna GGC→GAC (G13D) byla v našem souboru vzorků detegována celkem ve čtyřech případech.

Mutace v kodonech 12 a 13 představují u kolorektálních karcinomů 90 % všech genetických změn prokazatelných v genu *K-ras*. Dosud provedené studie ukázaly, že transverze GGT→GTT jsou významným prognostickým faktorem pro vyšší výskyt pooperačního relapsu této choroby. Naopak, nejčastější záměna GGT→GAT bývá detegována spíše v méně rozvinutém stádiu tumoru a pravděpodobně nijak neovlivňuje délku přežití¹⁶.

Jedním ze stěžejních cílů naší práce bylo optimalizovat amplifikaci mutantních alel genu *K-ras* ve vzorcích kolorektálních karcinomů. Klíčovým předpokladem pro cílenou amplifikaci mutantních sekvencí bez rizika falešně negativních či falešně pozitivních výsledků je množství LNA molekul přidávané do reakční směsi. Optimální koncentrace LNA pro rt-PCR clamping (0,1 $\mu\text{mol l}^{-1}$) byla při stejném množství DNA templátu v reakční směsi dvacetkrát nižší oproti používaným koncentracím PNA oligomerů¹¹. Tento fakt svědčí o řádově vyšší účinnosti námi pou-



Obr. 4. **Určení citlivosti metody LNA-clamped rt-PCR;** amplifikační křivka 1: v 60 ng DNA templátu bylo zastoupeno 20 ng mutantních alel genu *K-ras* z linie SW480 (33 %); křivka 2: 4 ng (6,7 %); křivka 3: 0,8 ng (1,3 %); křivka 4: 0,16 ng (0,27 %); křivka 5: 0,03 ng (0,05 %); křivka 6: 0,006 ng (0,01 %, bez amplifikace). Díky LNA clamping nebyly amplifikovány normální alely genu *K-ras*. Proto i přes stejné výchozí množství DNA templátu stoupá počet cyklů potřebný k detekci fluorescenčního signálu podle snižujícího se množství mutantních alel ve vzorcích ředící řady. Citlivost metody je přibližně 0,03 ng. Vzorek bez DNA templátu (negativní kontrola) je znázorněn přerušovanou čarou (křivka 7)

žité modifikace PCR clamping.

Vyšetřením vzorků morfologicky normální střevní sliznice jsme nezaznamenali žádné amplifikační křivky při rt-PCR ani jiné nespecifické produkty na elektroforetickém gelu. Negativní výsledek potvrdilo též sekvenování PCR produktů amplifikovaných v reakčních směsích bez přítomnosti LNA oligonukleotidů.

Na základě ředící řady popsané v Experimentální části byla určena citlivost naší vyšetřovací metody. Nejnižší amplifikovatelné množství mutančních alel obsažené v 60 ng DNA matrice bylo 30 pikogramů (0,05 %). Určení detekčního limitu znázorňuje obr. 4. Citlivost této jednostupňové metody je v souladu s pracemi využívajícími pro rt-PCR PNA oligomery^{11,17}.

Závěr

Několik autorů popsalo možnost detekce velmi malých množství cirkulujících nádorových buněk v krevní plasmě, žluči, pankreatické šťávě, sputu nebo v sentinelových uzlinách na základě přítomnosti mutací v genu *K-ras* metodou PNA-clamped rt-PCR (cit.^{11,13,18}). Podobně i naše modifikace využívající LNA oligonukleotidy k cílenému zablokování amplifikace normálních alel genu *K-ras* umožňuje specifickou detekci malých množství mutančních alel v kodonech 12 a 13. Představuje rychlou a spolehlivou alternativu pro vyšetření mutací ve vzorcích DNA pocházejících přímo z nádorové tkáně nebo jiného biologického materiálu. Pro bližší identifikaci nalezených mutací je vždy nezbytné stanovit nukleotidovou sekvenci získaných PCR produktů.

Seznam zkratk

bp	počet párů bází
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FRET	fluorescence resonance energy transfer
LNA	locked nucleic acids
PNA	peptide nucleic acids
rt-PCR	polymerasová řetězová reakce v reálném čase
TNM	mezinárodní klasifikace maligních tumorů (z anglického Tumor, Node, Metastasis)

LITERATURA

1. Braasch D., Jensen S., Liu Y., Kaur K., Arar K., White M., Corey D.: *Biochemistry* 42, 7967 (2003).
2. Kurreck J., Wyszko E., Gillen C., Erdmann V. A.: *Nucleic Acids Res.* 30, 1911 (2002).
3. Grannemann S., Landt O., Breuer S., Blomeke B.: *Clin. Chem.* 51, 1523 (2005).
4. Chan J. H. P., Lim S., Wong W. S.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 533 (2006).
5. Ørum H., Jakobsen M. H., Koch T., Vuust J., Borre M.: *Clin. Chem.* 45, 1898 (1999).
6. Jacobsen N., Fenger M., Bentzen J., Rasmussen S. L., Jakobsen M. H., Fensholt J., Skouv J.: *Clin. Chem.*

- 48, 657 (2002).
7. Prix L., Uciechowski P., Bockmann B., Giesing M., Schuetz A. J.: *Clin. Chem.* 48, 428 (2002).
8. Moerkerk P., Arends J. W., van Driel M., de Bruine A., de Goeij A., ten Kate J.: *Cancer Res.* 54, 3376 (1994).
9. Ryan B. M., Lefort F., McManus R., Daly J., Keeling P. W., Weir D. G., Kelleher D.: *Gut* 52, 101 (2003).
10. Andreyev J., Cunningham D.: *Clin. Oncol.* 19, 286 (2001).
11. Chen C. Y., Shiesh S. C., Wu S. J.: *Clin. Chem.* 50, 481 (2004).
12. Wallen M., Tomas E., Visakorpi T., Holli K., Maenpaa J.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 55, 343 (2005).
13. Behn M., Thiede C., Neubauer A., Pankow W., Schuermann M.: *J. Pathol.* 190, 69 (2000).
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
15. Beránek M., Bureš J., Palička V., Jandík P., Langr F., Nejedlá E.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 37, 723 (1999).
16. Andreyev J., Norman A. R., Cunningham D., Oates J. R., Clarke P. A.: *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 675 (1998).
17. Luo J. D., Chan E. C., Shih C. L., Chen T. L., Liang Y., Hwang T. L., Chiou C. C.: *Nucleic Acid Res.* 34, e12 (2006).
18. Taback B., Bilchik A. J., Saha S., Nakayama T., Wiese D. A., Turner R. R., Kuo C. T., Hoon D. S. B.: *Int. J. Cancer* 111, 409 (2004).

M. Beránek^a, J. Bureš^b, M. Šácha^c, L. Sákra^c, M. Rajman^c, P. Jandík^d, E. Rudolf^e, and O. Landt^f
^aDepartment of clinical biochemistry and diagnostics, Faculty of Medicine and Faculty Hospital Hradec Králové, ^bDepartment of internal medicine, Faculty of Medicine and Faculty Hospital Hradec Králové, ^cDepartment of surgery, Regional Hospital Pardubice, ^dDepartment of surgery, Faculty of Medicine and Faculty Hospital Hradec Králové, ^eDepartment of medical biology and genetics, Faculty of Medicine and Faculty Hospital Hradec Králové, ^fTIB MOLBIOL, Berlin, Germany):
Detection of Point Mutations in Kirsten ras 2 Gene Using Locked Nucleic Acids Clamped PCR

The aim of the study was to examine diagnostic possibilities of LNA (locked nucleic acids) -clamped PCR for detection of somatic mutations in the *K-ras* gene in 133 samples of human malignant colorectal tumors. Selective real-time PCR amplification of mutant alleles of the *K-ras* gene (codon 12 and 13) revealed the presence of mutations in 45 samples of the tumors. The detection limit of the used method for *K-ras* mutant alleles was 0.03 ng. LNA-clamped PCR suppressing amplification of the wild-type alleles of the *K-ras* gene provides a very sensitive and specific detection of mutations present in DNA samples of colorectal carcinomas.