

TECHNOLOGIE DIGITÁLNÍ PCR PRO VYŠETŘENÍ DELEČNÍHO POLYMORFISMU V GENU *GSTM1*

MARTIN BERÁNEK^{a,b}, ZDENĚK FIALA^c, JAN KREMLÁČEK^d, VLADIMÍR PALIČKA^a a LENKA BORSKÁ^d

^a Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, ^b Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, ^c Ústav hygieny a preventivní medicíny, ^d Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze
beranek@lfhk.cuni.cz

Došlo 12.5.16, přijato 20.5.16.

Klíčová slova: digitální PCR, *GSTM1*, polymorfismus, genotoxicita, delece, nulová alela

Úvod

Glutathion S-transferasa M1 (*GSTM1*; EC 2.5.1.18) je cytosolický enzym, který se katalyticky podílí na biotransformaci xenobiotik v mnoha lidských tkáních. Tento konjugací enzym je kódován genem *GSTM1* lokalizovaným na 1. chromosomu v pozici 1p13.3. Gen je součástí genového klastru o velikosti 100 kb, jenž se skládá z pěti vzájemně homologních genů *GSTM1-GSTM5*. Přibližně polovina lidské populace obsahuje rozsáhlou deleci 20 kb zahrnující kompletní gen *GSTM1* (cit.^{1,2}). Tato delece podmiňuje nulovou alelu, *GSTM1*0*; běžná populační alela se označuje *GSTM1*1*.

Nulový genotyp *GSTM1*0/*0* způsobuje díky absenci funkčního enzymu výrazně pomalejší eliminaci karcinogenních látek z organismu. Je proto považován za rizikový genetický faktor při rozvoji aplastické anémie³, maligních nádorů jater⁴, plic⁵, střev⁶, hlavy a krku⁷. Zvýšené riziko maligních procesů souvisí zejména s vyššími koncentracemi genotoxických aduktů vznikajících mezi deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) a molekulami DNA. Tvorba těchto aduktů je vystupňována u osob s nulovým genotypem vystavených dlouhodobé expozici PAU (cit.^{8–10}), včetně silných kuřáků¹¹.

Překvapivě málo studií se zabývá riziky PAU u heterozygotních nosičů alely *GSTM1*0*, přestože i u nich byla zaznamenána zvýšená genotoxicita a mutagenita¹². Nodostatek těchto studií je způsoben především analytickými důvody. Doposud používané vyšetřovací metody založené na polymerasové řetězové reakci (PCR) jsou schopny velmi obtížně odlišit osoby s heterozygotním genotypem

*GSTM1*0/*1* od jedinců *GSTM1*1/*1*. Výjimkou je kvantitativní real-time PCR, při které lze nižší počet genových dávek *GSTM1* určit z vyššího počtu reakčních cyklů potřebných k překonání meze detekce (*C_t*, cycle threshold). Pro dostatečnou spolehlivost této metody je však nutná velmi dobrá kvalita extrahované DNA, vysoká účinnost PCR, normalizace výsledku analýzy *GSTM1* vůči genům s konstantním počtem kopií v diploidních buňkách a sofistikované matematické algoritmy k vyhodnocení příslušného genotypu. Přesto bývají výsledky u 1–3 % analyzovaných vzorků uzavírány jako nehodnotitelné^{13,14}.

Cílem naší studie bylo navrhnout pracovní postup pro jednoznačnou a spolehlivou genotypizaci *GSTM1* použitelnou v molekulární diagnostice. Pro tento účel byla vybrána technologie digitální PCR (dPCR), při níž se provádí absolutní kvantifikace molekul templátové DNA. Při dPCR je každá molekula DNA individuálně amplifikována v příslušném reakčním segmentu – jamce, mikrokomůrce či v kapičce vodné fáze rozptýlené v oleji (podle systému a jeho výrobce). Pokud v daném segmentu došlo k amplifikaci, je díky přítomnosti hydrolyzačních či hybridizačních sond ve směsi zachycen na detektoru pozitivní fluorescenční signál, tento segment je v softwaru označen číslicí 1. Není-li v segmentu přítomna molekula templátu a nedošlo k její amplifikaci, je každý takový segment hodnocen číslicí 0. Celkové množství pozitivně hodnocených segmentů odpovídá absolutnímu počtu templátových molekul DNA ve směsi, který se následně vztahuje na příslušnou objemovou jednotku. V případě heterozygota *GSTM1*0/*1* by množství templátových molekul DNA obsahujících jeden funkční gen *GSTM1* (tedy jednu genovou dávku) mělo být poloviční než u homozygotů *GSTM1*1/*1* se dvěma genovými dávkami.

Experimentální část

Vyšetřovaný soubor tvořilo 50 extraktů genomové DNA získaných od 25 mužů a 25 žen s mediánem věku 47 roků (rozsah 20–82 roků). K extrakci DNA z krevních buněk byla použita souprava QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, SRN. Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a každý účastník podepsal před svým zařazením informovaný souhlas.

Ke genotypizaci bylo použito zařízení QX100 Droplet Digital PCR System, Bio-Rad, USA. Amplifikační směs (25 µl) obsahovala 12,5 µl 2× koncentrovaného ddPCR Supermixu (Bio-Rad, USA), 100 ng genomové DNA, amplifikační primery ve finální koncentraci 900 nmol l⁻¹ a hydrolyzační sondy o koncentraci 250 nmol l⁻¹. Pro hodnocení amplifikace byl použit program QuantaSoft verze 1.7.4 (Bio-Rad, USA). Absolutní množství *GSTM1* bylo následně normalizováno vůči β -globinovému referenčnímu genu, který v každé diploidní buňce disponuje dvěma genovými dávkami.

Sekvence primerů a sond byly následující: přímý (forward) primer pro *GSTM1* 5'-CACCTGCATTTCGTCATGTGAC-3', reverzní primer pro *GSTM1* 5'-AAGCAAGAGCAGA-

GAGGAGAC-3', hydrolyzační sonda pro *GSTM1* 5'-FAM-TTCAGTCCGTGCCATGAGCAGGCACABHQ1-3', přímý primer pro β -globin 5'-GAGGGTTTGAAGTCCAA-CTCCTAA-3', reverzní primer pro β -globin 5'-CAGGGTGAGGTCTAAGTGATGACA-3' a hydrolyzační sonda pro β -globin 5'-HEXCAGTGCCAGAAGAGCCAAGGACAGGT-BHQ1-3'.

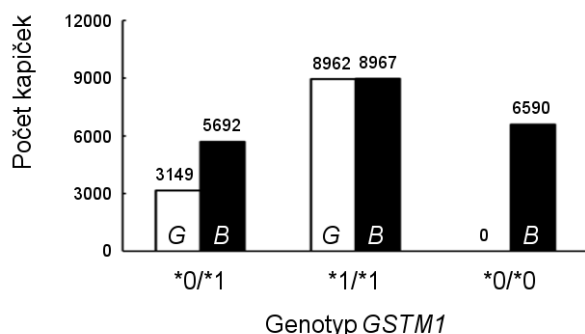
K porovnání dat odpovídajících jednotlivým genotypům byl použit Studentův *t* test. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při hodnotách $P < 0,05$.

Výsledky a diskuse

Digitalní PCR provedená ve více než desetitisíci kapičkách vodné fáze rozptýlených v oleji (droplet digital PCR) umožnila určení genotypu v genu *GSTM1* u všech vyšetřených osob. Záznam analýzy DNA pomocí dPCR a hodnocení podle počtu kapiček s proběhlou amplifikací genu *GSTM1* je zobrazen na obr. 1.

U pěti osob s genotypem *GSTM1**1/*1 byl poměr počtu kopií *GSTM1* vůči β -globinovému genu $1,01 \pm 0,02$. Tento výsledek odpovídal přítomnosti dvou funkčních alel genu *GSTM1*, resp. dvěma jeho genovým dávkám v diploidních buňkách. Heterozygotní jedinci s genotypem *GSTM1**0/*1 ($n=23$) měli v buňkách jen jednu funkční alelu *GSTM1**1, proto byl u nich zjištěn poměr genových dávek *GSTM1*/ β -globin $0,50 \pm 0,03$ ($P < 0,001$). A konečně, jedinci s genotypem *GSTM1**0/*0 ($n=22$), tedy s delecí přítomnou na obou párových chromosomech, nevykazovali při digitální PCR žádné známky amplifikace genu *GSTM1*.

Prevalence rizikové alely *GSTM1**0 byla v našem souboru osob 67 % a korespondovala s výsledky zjištěnými v jiných studiích^{12,14}. Frekvence jednotlivých genotypů *GSTM1**1/*1 (10 %), *0/*1 (46 %) a *0/*0 (44 %) odpovídaly Hardy-Weinbergově rovnováze.



Obr. 1. Záznam analýzy DNA provedené pomocí dPCR pro různé genotypy *GSTM1*. G představuje počet kapiček s amplifikací genu *GSTM1* a B počet kapiček odpovídající amplifikaci β -globinového genu

Digitální PCR lze považovat za techniku, která dokáže jednoznačně určit příslušný genotyp v rámci delečního polymorfismu v genu *GSTM1*. Předpokládáme, že její unikátní schopnost selektivní amplifikace jednotlivých molekul DNA bude v budoucnu využitelná i k analýze dalších rozsáhlých delecí, např. v genu *GSTT1* pro nádorovou diagnostiku¹⁵, *JAG1* u Alagillova syndromu¹⁶, *FECH* u porfyrií¹⁷, *DSG4* u hypotrichózy¹⁸, *HOIL1* u imunodeficitů¹⁹, *PH1* u primární hyperoxalurie²⁰, *POLR3B* u leukodystrofie²¹ nebo *ABCC2* u Dubin-Johnsonova syndromu²². Vyšetřovací přístup založený na digitální PCR byl již úspěšně použit k diagnostice ztrát heterozygosity v onkosupresorových genech *NF1* a *BRCA2* (cit.^{23,24}).

Závěry

Digitální PCR je vhodnou a spolehlivou technologií pro určení genotypu v rámci delečního polymorfismu v genu *GSTM1*, jenž kóduje cytosolický enzym důležitý pro biotransformaci xenobiotik.

Tato studie byla finančně podpořena prostředky projektu PRVOUK P37/09 a P37/11 Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

LITERATURA

- Xu S., Wang Y., Roe B., Pearson W. R.: J. Biol. Chem. 273, 3517 (1998).
- Cotton S. C., Sharp L., Little J., Brockton N.: Am. J. Epidemiol. 151, 7 (2000).
- Lee K. A., Kim S. H., Woo H. Y., Hong Y. J., Cho H. C.: Blood 98, 3483 (2001).
- Harada S., Abei M., Tanaka N., Agarwal D. P., Goede H. W.: Hum. Genet. 75, 322 (1987).
- Seidegard J., Pero R. W., Miller D. G., Beattie E. J.: Carcinogenesis 7, 751 (1986).
- Zhong S., Wyllie A. H., Barnes D., Wolf C. R., Spurr N. K.: Carcinogenesis 14, 1821 (1993).
- Trizna Z., Clayman G. L., Spitz M. R., Briggs K. L., Goepfert H.: Am. J. Surg. 170, 499 (1995).
- Brescia G., Celotti L., Clonfero E., Neumann G. H., Forni A., Foà V., Pisoni M., Ferri G. M., Assennato G.: Arch. Toxicol. 73, 431 (1999).
- Topinka J., Sevastyanova O., Binková B., Chvátalová I., Milcová A., Lněničková Z., Nováková Z., Solanský I., Šrám R. J.: Mutat. Res. 624, 9 (2007).
- Topinka J., Binková B., Mračková G., Stávková Z., Beneš I., Dejmeš J., Leníček J., Šrám R. J.: Mutat. Res. 390, 59 (1997).
- Godschalk R. W. L., Dallinga J. W., Wikman H., Risch A., Kleinjans J. C. S., Bartsch H., Van Schooten F. J.: Pharmacogenetics 11, 389 (2001).
- Nørskov M. S., Frikke-Schmidt R., Bojesen S. E., Nordestgaard B. G., Loft S., Tybjaerg-Hansen A.: Pharmacogenomics J. 11, 292 (2011).

13. Brasch-Andersen C., Christiansen L., Tan Q., Haagerup A., Vestbo J., Kruse T. A.: *Hum. Mutat.* **24**, 208 (2004).
14. Timofeeva M., Jäger B., Rosenberger A., Sauter W., Wichmann H. E.: *Clin. Biochem.* **42**, 500 (2009).
15. Marín F., García N., Muñoz X., Capellà G., González C. A., Agudo A., Sala N.: *J. Mol. Diagn.* **12**, 300 (2010).
16. Krantz I. D., Colliton R. P., Genin A., Rand E. B., Li L., Piccoli D. A., Spinner N. B.: *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 1361 (1998).
17. Boggon T. J., Murray J., Chappuis-Flament S., Wong E., Gumbiner B. M., Shapiro L.: *Science* **296**, 1308 (2002).
18. Bazzi H., Martinez-Mir A., Kljuic A., Christiano A. M.: *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **10**, 222 (2005).
19. Boisson B., Laplantine E., Prando C., Giliani S., Israelsson E., Xu Z., Abhyankar A., Israël L., Trevejo-Nunez G., Bogunovic D., Cepika A. M., MacDuff D., Chrabieh M., Hubeau M., Bajolle F., Debré M., Mazzolari E., Vairo D., Agou F., Virgin H. W., Bossuyt X., Rambaud C., Facchetti F., Bonnet D., Quartier P., Fournet J. C., Pascual V., Chaussabel D., Notarangelo L. D., Puel A., Israël A., Casanova J. L., Picard C.: *Nat. Immunol.* **13**, 1178 (2012).
20. Coulter-Mackie M. B., Lian Q., Applegarth D., Toone J.: *Mol. Genet. Metab.* **86**, 172 (2005).
21. der Knaap M. S., van Spaendonk R. M., Wolf N. I., Bernard G.: *Orphanet. J. Rare Dis.* **10**, 69 (2015).
22. Kanda D., Takagi H., Kawahara Y., Yata Y., Takakusagi T., Hatanaka T., Yoshinaga T., Iesaki K., Kashiwabara K., Higuchi T., Mori M., Hirota T., Higuchi S., Ieiri I.: *Drug Metab. Pharmacokinet.* **24**, 464 (2009).
23. Rübber A., Bausch B., Nikkels A.: *Mol. Cancer* **5**, 36 (2006).
24. Cochran R. L., Cravero K., Chu D., Erlanger B., Toro P. V., Beaver J. A., Zabransky D. J., Wong H. Y., Cidado J., Croessmann S., Parsons H. A., Kim M., Wheelan S. J., Argani P., Park B. H.: *Hum. Pathol.* **45**, 1546 (2014).

M. Beránek^{a,b}, Z. Fiala^c, J. Kremláček^d, V. Palička^a, and L. Borská^d (^a*Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Faculty of Medicine, Charles University and Faculty Hospital Hradec Kralove*, ^b*Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove*, ^c*Institute of Hygiene and Preventive Medicine*, ^d*Institute of Pathological Physiology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Czech Republic*): **The Technology of Digital PCR for Analysis of The Deletion Polymorphism in the *GSTM1* Gene**

Glutathione S-transferase M1 is a cytosolic enzyme important for the biotransformation of xenobiotics in various human tissues. The aim of this study was to perform genetic analysis of deletion polymorphism in the *GSTM1* gene by using the technology of digital PCR. For genotyping, the QX100 Droplet Digital PCR System was used. The absolute quantity of *GSTM1* copies was normalized to the β -globin reference gene. In our experimental group, the prevalence of *GSTM1**0 null variant was 67 %. Frequencies of *GSTM1**1/*1 ($n=5$), *GSTM1**0/*1 ($n=23$), and *GSTM1**0/*0 ($n=22$) genotypes were 10 %, 46 %, and 44 %, respectively. Digital PCR seems to be an available and reliable technology for *GSTM1* deletion polymorphism genotyping.