

Ugotavljanje genskih sprememb pri raku želodca* Identification of genes alterations in stomach cancer*

Andreja Gojkovič**, Mojca Grošelj***

Ključne besede
želodec novotvorbe – genetika
adenokarcinom – genetika
polimerazna verižna reakcija
mikrosatelitska zaporedja

Key words
stomach neoplasms – genetics
adenocarcinoma – genetics
polymerase chain reaction
microsatellite repeats

Izvleček. Žlezni rak (adenokarcinom) želodca je pogosto maligno obolenje v Sloveniji. Po Laurenovi razvrstitvi ga delimo na intestinalno, dobro diferencirano, in difuzno, slabo diferencirano obliko. Poti nastanka obeh oblik naj bi se razlikovali po značilnem zaporedju genetskih sprememb. V naši raziskavi smo želeli na izbranem vzorcu intestinalne in difuzne oblike adenokarcinomov želodca ugotoviti izgubo alela nekaterih zaviralnih genov (*APC*, *p53*, *Rb*, *nm23* in *DCC*) in ugotoviti morebitno razliko med obema oblikama. Hkrati smo želeli uvesti novo, najsoodobnejšo metodo preiskovanja izgube alelov. Proučevali smo vzorce tumorskega in zdravega tkiva želodca, odvzete sedemnajstim naključno izbranim bolnikom z rakom želodca, operiranim v letu 1997. Za pomnoževanje mikrosatelitnih zaporedij zaviralnih genov smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo. Dobljene PCR-pridelke smo analizirali po načelu kapilarne elektroforeze s pomočjo avtomatskega genskega analizatorja. Za gen *APC* smo ugotovili izgubo heterozigotnosti v 17 %, za gen *p53* v 50 % in za gen *DCC* v 100 % primerov. Pri genih *Rb* in *nm23* nismo ugotovili izgube heterozigotnosti. Ugotovili smo razliko v pojavljanju genskih sprememb pri intestinalni in difuzni obliki. Naša raziskava je dala osnove za nadaljnje iskanje najugodnejših pogojev za izvedbo obsežnejše multipleks verižne reakcije s polimerazo in za njeno uporabo pri preiskavi še neraziskanih genov.

Abstract. Stomach cancer (gastric adenocarcinoma) is a common malignant disease in Slovenia. The Lauren's classification distinguishes between a well differentiated intestinal type and a poorly differentiated diffuse type of the disease, which differ in their development and the characteristic sequence of genetic changes. The purpose of this first study done on a selected sample of Slovene patients was to investigate the allele loss of several tumor suppressor genes (*APC*, *p53*, *Rb*, *nm23* and *DCC*) and thus distinguish between the intestinal and diffuse type of gastric adenocarcinoma in the Slovene population. Another aim of this work was to introduce the newest method for investigating the allele loss. Seventeen randomly selected frozen samples of adenocarcinomas and adjacent normal tissues were obtained from 17 patients treated by surgery in 1997. The polymerase chain reaction was used for multiplying microsatellite sequences of the tumor suppressor genes. The obtained PCR products were analysed with the capillary electrophoresis in the automatic gene analyser. Loss of heterozygosity was found in 17% of samples for *APC*, in 50% for *p53*, and in 100% for *DCC*. There was no loss of heterozygosity for *Rb* and *nm23*. Differences in genetic alterations between the intestinal and diffuse type of adenocarcinoma in the Slovene population were identified. The results represent a good starting point for the multiplex polymerase chain reaction using a larger set of genetic markers, and for its application in the research of some other, not yet investigated tumor suppressor and mismatch repair genes.

*Objavljeno je skrajšano delo, ki je bilo nagrajeno s Prešernovim priznanjem za študente v letu 1998.

**Andreja Gojkovič, štud. med., Inštitut za biokemijo, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

***Mojca Grošelj, štud. med., Inštitut za biokemijo, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

Uvod

Razširjenost raka želodca

Rak želodca je v Sloveniji pogosto maligno obolenje. Po podatkih Registra raka za leto 1995 zavzema četrto mesto pri moških (8 % vseh rakov oz. 310 novih primerov na leto) in peto mesto pri ženskah (6 % vseh rakov oz. 222 novih primerov na leto) (1). Čeprav incidenca raka želodca v Sloveniji zadnja desetletja upada (upadanje incidence se zadnja leta umirja), je v primerjavi z razvitimi evropskimi državami še vedno visoka. V evropskih državah je delež raka želodca pri moških 3,5–18,4 % vseh rakov ter pri ženskah 2,3–15,3 % vseh rakov (2). Rak želodca ostaja pogost v državah vzhodne Evrope, srednje Amerike in na Japonskem; najnižjo incidenco pa beležijo v Švici in Franciji ter na Danskem (3).

Izvor raka želodca

Prehrana ima pomembno vlogo pri nastanku raka želodca. Razvoj raka pospešujejo nitrati in nitriti v hrani in vodi, prevelika poraba soli, prekajeno meso ter vložena zelenjava. Sveža zelenjava in sadje, ki vsebuje veliko vitamina C, pa njegov razvoj zavirata (4).

Večje tveganje za razvoj obolenja predstavljajo tudi nekateri genetski dejavniki (krvna skupina A, pojav bolezni pri bližnjih sorodnikih) (4, 5).

Ugotovljeno je pogostejše pojavljanje raka želodca pri kroničnem atrofičnem gastritisu, perniciozni anemiji in želodčni polipozi (4, 6). V novejšem času povezujejo rak želodca z okužbo z bakterijo *Helicobacter pylori* (7).

Razvrstitev raka želodca

Žlezni rak (adenokarcinom) predstavlja 95 % primerov raka želodca, ostali maligni tumorji so redki (4, 7). Ločimo zgodnji rak (bolezen je omejena na sluznico in podsluznico) in napredovali rak želodca (vrašča skozi podsluznico v mišično plast ali globlje) (8).

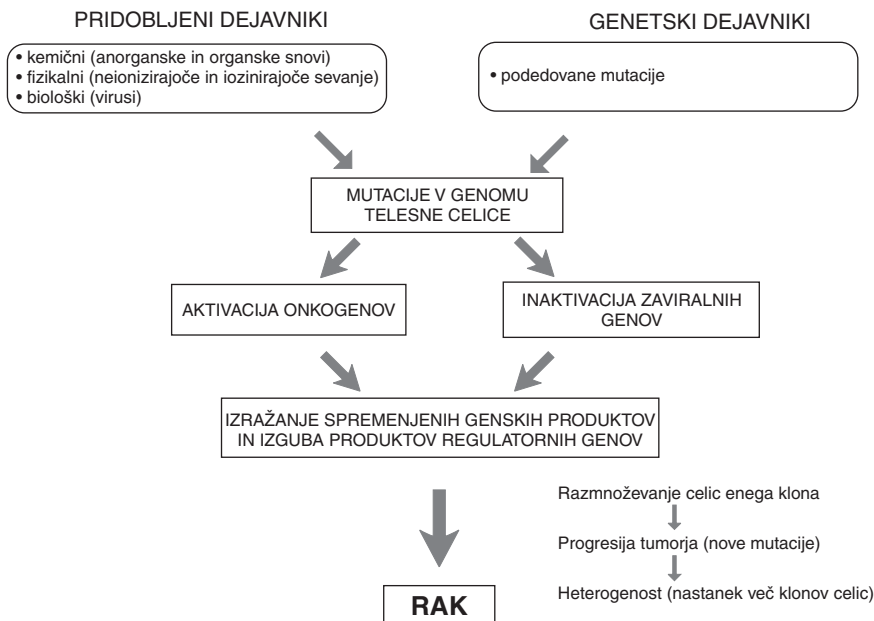
Makroskopsko delimo rak želodca po Borrmannovi razvrstitvi v štiri tipe: tip 1 – polipoidni tumor, tip 2 – razuljeseni neinfektivni tumor, tip 3 – razuljeseni infiltrativni tumor, tip 4 – difuzno infiltrativni tumor in neopredeljeni tumor (8).

Patohistološko razvrščamo rak želodca po različnih razvrstitvah (8–10). V Evropi in tudi pri nas se je najbolj uveljavila Laurenova razvrstitev (1965), ki deli rak želodca glede na način rasti in invazivnost na intestinalno, difuzno in mešano obliko, kadar procesa ne moremo uvrstiti v nobeno od skupin (9, 11). Pri intestinalni, bolj diferencirani obliki, pride predhodno do metaplazije želodčne sluznice v črevesno sluznico. Difuzna, slabše diferencirana oblika, pa naj bi nastala neposredno iz celic želodčne sluznice (4). Mingova histološka razvrstitev deli rak želodca na ekspanzivno, infiltrativno ter mešano obliko (12).

Razširjenost bolezni označujemo po TNM-razvrstitvi s stadijem (I–IV). T označuje globino vraščanja tumorja (T_0 – T_4), N prizadetost bezgavk (N_0 – N_2) in M oddaljene zaseve (M_0 – M_2) (9).

Splošno o kancerogenezi

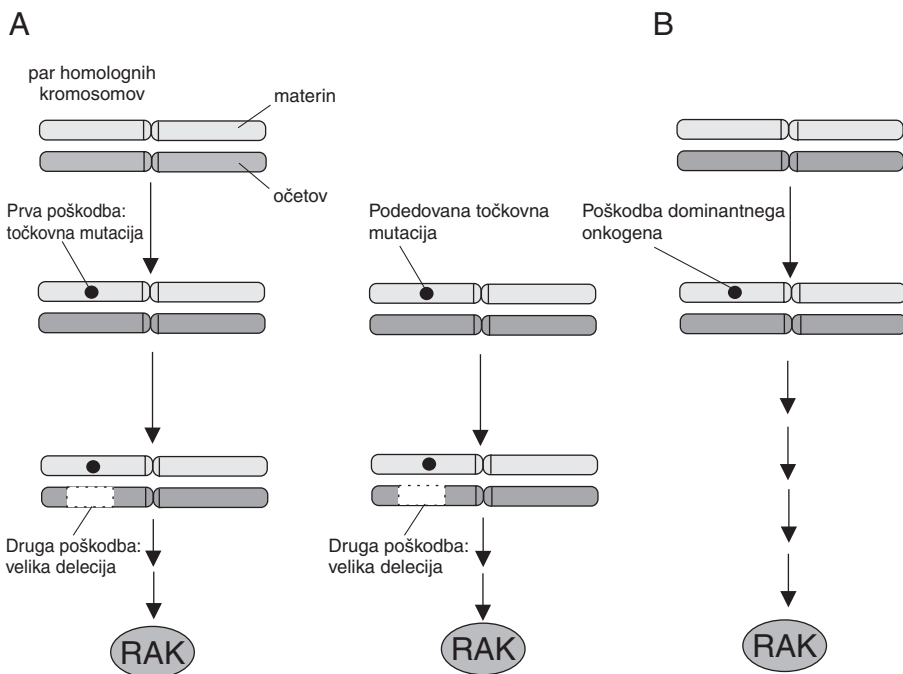
Kancerogeneza je večstopenjski proces, ki nastane zaradi sprememb celičnega genoma. Vodi v nebrzdano razmnoževanje celic (slika 1). Raziskave v molekularni genetiki so odkrile, da genske poškodbe prizadenejo dva razreda genov, ki so pomembni za kancerogenezo: protoonkogene in antionkogene oz. zaviralne (tumorsko supresorske) gene (13).



Slika 1. *Mehanizem nastanka raka.*

Protoonkogeni so sestavni del celičnega genoma ter pospešujejo celično rast in diferenciacijo. Njihovi produkti so rastni dejavniki, receptorji za rastne dejavnike, beljakovine, ki prenašajo signale, in dejavniki prepisovanja DNA (14). Genska poškodba povzroči spremembo protoonkogenov v onkogen, kar povzroči ali pretirano izražanje gena (preveč sicer normalne beljakovine v celici) ali pa biosintezo nenormalne, preveč aktivne beljakovine. To je eden od pogojev za maligno preobrazbo celice. Onkogeni se izražajo dominantno, zato je za spremembo protoonkogenov v onkogen dovolj mutacija le enega alela (slika 2) (15).

Zaviralni geni, nasprotno od onkogenov, zavirajo celično rast in diferenciacijo. Njihovi produkti delujejo na površini celice, uravnavajo prenos signalov rastnih dejavnikov in uravnavajo prepisovanje DNA (14). Zaviralni geni se izražajo recesivno, zato je za izgubo njihove aktivnosti potrebna mutacija obeh alelov (slika 2) (15).



Slika 2. Razlika v izražanju mutacij zaviralnih genov in protoonkogenov. Vsak gen je v človeškem genomu navzoč v dveh kopijah (na očetovem in materinem kromosomu homolognega kromosomskega para). A: za inaktivacijo zaviralnega gena sta potrebni dve genski poškodbi – podedovano ali pridobljeno mutacijo v zaviralnem genu razkrije šele mutacija, pridobljena na njegovem drugem alelu (recesivnost zaviralnih genov). B: za aktivacijo dominantnega onkogenega je dovolj že ena poškodba (dominantnost onkogenov).

Za maligno preobrazbo celice ni dovolj nastanek le enega onkogenega, temveč je potrebna aktivacija več protoonkogenov in izguba aktivnosti več zaviralnih genov (13, 14).

Kancerogeneza pri raku želodca

Correa je postavil hipotezo, da nastane rak želodca preko več vmesnih stopenj (16). Prva sprememba normalne želodčne sluznice naj bi bila površinski gastritis, ki napreduje v kronični atrofični gastritis, intestinalno metaplazijo, displazijo in končno preide v intestinalno obliko raka želodca. Ves ta proces se odvija več let pod vplivom zunanjih in notranjih dejavnikov, ki povzročajo genetske spremembe (17).

Pri razvoju raka želodca nastajajo številne genetske spremembe (18):

- genetska nestabilnost,
- ponovna aktivacija telomeraze v zgodnjih fazah,
- inaktivacija nekaterih zaviralnih genov in genov za celične adhezine,
- aktivacija nekaterih onkogenov in
- povečano izražanje rastnih dejavnikov ali citokinov pri napredovanju bolezni.

Genetska nestabilnost

Z izrazom genetska nestabilnost označujemo somatske mutacije mikrosatelitnih zaporedij (mikrosatelitna nestabilnost), ki nastanejo zaradi napak pri podvajanju DNA (18). Mikrosatelite, poleg minisatelitov in satelitov, uvrščamo v visoko ponavljajočo se DNA, ki ima obliko kratkih nukleotidnih zaporedij in se v genomu ponavlja v številnih identičnih ali sorodnih kopijah. Mikrosateliti so po genomu naključno razporejeni in jih najdemo povprečno na vsakih 6 kilobaznih parov. Dolžina njihovega osnovnega motiva je od 2 do 6 baznih parov, število ponovitev pa je manjše od sto. Polimorfne mikrosatelite imenujemo male tandemske ponovitve ali STR (okr. angl. *short tandem repeat*) lokusi. Polimorfizem temelji na različicah v številu ponovitev osnovnega motiva, posledica pa je visoka variabilnost v dolžinah posameznih alelov, zato govorimo o dolžinskem polimorfizmu. Čim bolj je lokus polimorfen, večja je njegova informativnost (19).

Ponovna aktivacija telomeraze

Telomeraza je ribonukleoproteinski encim, ki sintetizira telomerno DNA v zarodnih tkivih in nesmrtnih tumorskih celicah, v normalnih somatskih celicah pa je neaktivna.

Ugotovljeno je, da v celicah raka želodca prvotno pride do skrajšanja telomere, kar vodi v kromosomsko nestabilnost. Kasneje pride do ponovne aktivacije telomeraze, kar stabilizira telomere in prispeva k celični nesmrtnosti (18).

Onkogeni

V razvoj in napredovanje raka želodca je vpletenih mnogo onkogenov. Najpogostejše se pri raku želodca pojavlja gen *c-met*, ki zapisuje receptor za rastni dejavnik jetrnih celic oz. HGF (okr. angl. *hepatocyte growth factor*) in je pri ostalih tumorjih prebavil redek (20). Ostali vpleteni geni, ki se še pojavljajo, so *K-sam* (zapisuje receptor, ki pripada družini receptorjev za rastni dejavnik fibroblastov oz. FGF (okr. angl. *fibroblast growth factor*), *c-erbB2* (zapisuje površinski receptor za epidermalni rastni dejavnik oz. EGF (okr. angl. *epidermal growth factor*), *K-ras* (zapisuje GTP-vezočo beljakovino) (18, 21).

Zaviralni (tumorsko supresorski) geni

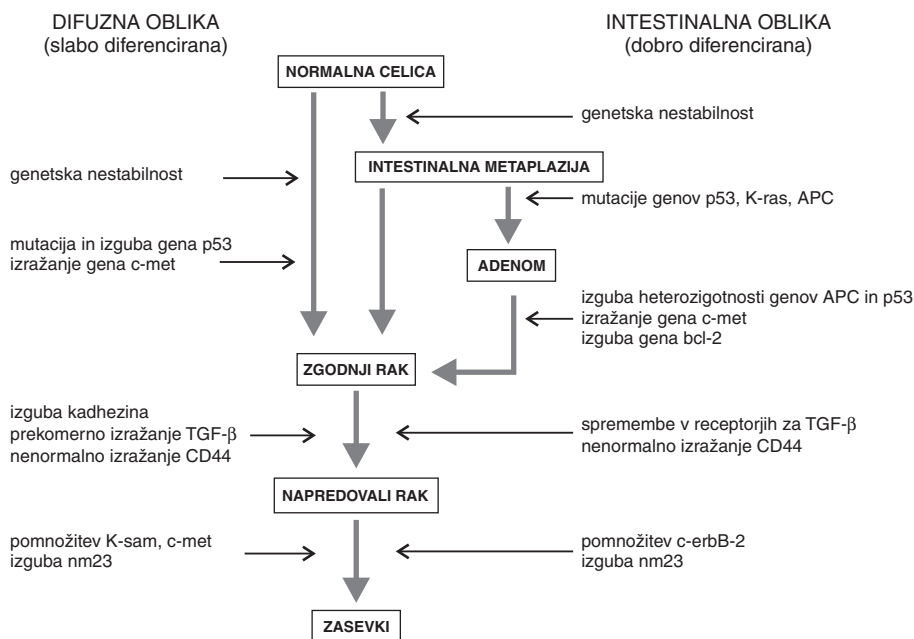
Alela zaviralnih genov lahko vsebujeta enako število baznih parov (homozigotnost) ali pa se njuna dolžina razlikuje (heterozigotnost). Dolžina posameznega alela je namreč odvisna od vsebnosti visoko ponavljajoče se DNA. Prva stopnja v izgubi aktivnosti zaviralnih genov je mutacija enega alela, ki je lahko dedna ali pa nastane spontano. Da se mutacija izrazi, je potrebna izguba drugega normalnega alela. Ta pojav imenujemo izguba heterozigotnosti (angl. *loss of heterozygosity*, LOH). Vzrok za izgubo drugega alela je lahko izguba kromosoma ali pa kromosomska delecija (13).

V dosedanjih raziskavah so ugotovili povezanost z rakom želodca za naslednje zaviralne gene:

- *p53* (gen, ki zapisuje 53 kilodaltonov veliko beljakovino, vključeno v uravnavanje celičnega cikla) (18, 22),
- *APC* (okr. angl. *adenomatous polyposis coli*) (18, 23),
- *DCC* (okr. angl. *deleted in colorectal carcinomas*) (18) in
- *nm23* (gen, ki zapisuje nukleotidno difosfatno kinazo) (18, 24).

Pri intestinalni in difuzni obliki raka želodca pride najpogosteje do izgube alela ali mutacije gena *p53* (22). Izguba heterozigotnosti ali mutacija genov *APC* ter *DCC* je značilna za intestinalno, dobro diferencirano obliko raka želodca (17, 22). Pojav zasevkov pri bolnikih z rakom želodca povezujejo z zmanjšanim izražanjem gena *nm23* (18, 24).

Dosedanje raziskave kažejo, da naj bi se poti nastanka intestinalne in difuzne oblike raka želodca razlikovali (17, 21, 25). Vsaka oblika naj bi imela svoje značilno zaporedje genetskih sprememb. Na začetku naj bi prišlo pri obeh do nastanka genetske nestabilnosti, nato pa naj bi se pri vsaki obliki vključili različni genski mehanizmi, kot je prikazano na sliki 3 (25).



Slika 3. Domnevni genetski poti nastanka dobro in slabo diferencirane oblike raka želodca. *P53*, *APC*, *nm23* – zaviralni geni; *c-met*, *K-ras*, *bcl-2*, *c-erbB2*, *K-sam* – onkogeni; *TGFβ* – rastni dejavnik fibroblastov; *CD44* – adhezijska molekula.

Molekulska analiza onkogenov in zaviralnih genov lahko napove potek bolezni, kar je še posebej pomembno pri zgodnjih oblikah raka. Zato bi uvajanje dognanj molekulske genetike v klinično prakso olajšalo in izboljšalo prepoznavo raka, izboljšalo napoved poteka bolezni in pripomoglo k odkrivanju novih načinov zdravljenja (18).

Namen naloge

V svetu je do sedaj potekalo že mnogo raziskav o nastanku raka želodca, vendar vloga zaviralnih genov še ni v celoti raziskana. Kljub visoki pogostnosti raka želodca v Sloveniji raziskav na tem področju pri nas še ni bilo.

Zato smo se odločili, da na izbranem vzorcu adenokarcinomov želodca ugotovimo, kateri geni kažejo večjo pogostnost sprememb pri sporadičnih primerih. Pri tem smo želeli ugotoviti morebitne razlike v genskih spremembah med dobro in slabo diferencirano obliko.

Na izbranem vzorcu dobro diferenciranih adenokarcinomov (intestinalna oblika) in slabo diferenciranih adenokarcinomov (difuzna oblika) smo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo in avtomatskega genskega analizatorja v izbranih lokusih nekaterih zaviralnih genov (*APC*, *p53*, *Rb*, *nm23*, *DCC*) ugotavljali izgubo alela.

Ob tem smo želeli uvesti najsodobnejšo metodo preiskovanja izgube genske heterozigotnosti, ki bi bila že sama po sebi informativna za onkologa, omogočila pa bi tudi nadaljnje, poglobljene raziskave zaviralnih in popravljivih genov pri različnih vrstah raka.

Metode dela

Bolniki

Tabela 1. Klinične značilnosti bolnikov in histopatološki rezultati vzorcev. M – moški spol, Ž – ženski spol; L – mesto tumorja v želodcu, zg. tretj. – zgornja tretjina želodca, sr. tretj. – srednja tretjina želodca, sp. tretj. – spodnja tretjina želodca, cel. – celoten želodec; B – Borrmannova razvrstitev; Lauren – Laurenova razvrstitev, INT – intestinalna oblika, DIF – difuzna oblika, ME – mešana oblika; Ming – Mingova razvrstitev, EKSP – ekspanzivna oblika, INF – infiltrativna oblika, ME – mešana oblika; OS – stanje okolne sluznice, PG – površinski gastritis, KAG – kronični atrofični gastritis, IM – intestinalna metaplazija, NP – ni podatka.

Primer št.	Starost (leta)	Spol	L	B	Lauren	Ming	Stadij	OS
1	62	M	sr. tretj.	3	INT	ME	II	KAG
2	70	Ž	sr. tretj.	3	INT	ME	II	PG
3	69	M	sp. tretj.	1	ME	EKSP	II	PG
4	74	Ž	zg. tretj.	3	DIF	INF	III	KAG, IM
5	70	M	sr. tretj.	2	INT	ME	II	KAG, IM
6	65	Ž	cel.	3	DIF	INF	III	KAG
7	69	M	cel.	2	INT	INF	III	KAG, IM
8	59	M	sr. tretj.	2	INT	ME	IV	KAG
9	64	M	sr. tretj.	3	ME	INF	IV	NP
10	32	M	sr. tretj.	2	INT	ME	III	PG
11	67	M	zg. tretj.	1	INT	ME	II	KAG, IM
12	62	M	cel.	3	ME	INF	III	KAG, IM
13	62	M	sp. tretj.	3	INT	EKSP	II	PG
14	68	M	sr. tretj.	3	ME	INF	III	KAG, IM
15	63	M	sp. tretj.	1	INT	ME	I	KAG, IM
16	64	M	sp. tretj.	3	ME	INF	III	KAG, IM
17	36	Ž	cel.	4	DIF	INF	IV	KAG

V raziskavo je bilo vključenih 17 naključno izbranih bolnikov z rakom želodca, ki so bili operirani v letu 1997 v Sloveniji. Vsakemu bolniku je bil odvzet vzorec tumorskega tkiva iz središča tumorja (0,1–1,0 g) ter vzorec zdravega tkiva želodca (0,1–1,0 g). Vzorci tumorskih in zdravih tkiv so bili histološko pregledani in potrjeni na Oddelku za patologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani. Zamrznjeni so bili v tekočem dušiku in shranjeni pri temperaturi –70°C.

Raziskovalna naloga je bila izvedena v okviru projekta J1-8762-0381 (Molekularna genetika v biomedicinskih raziskavah, nosilec prof. dr. R. Komel), za katerega je bilo pridobljeno predhodno soglasje Republiške komisije za medicinsko etiko. Vsi vzorci so bili označeni s šifro, tako da je bila zagotovljena tajnost podatkov. Klinične značilnosti bolnikov ter histopatološke rezultate vzorcev prikazujemo v tabeli 1.

Osamitev DNA

Načelo

DNA je zelo stabilna molekula, zato jo lahko osamimo iz različnih bioloških materialov: iz krvi, mišic, skeletnega materiala in drugih tkiv. Osamitev poteka iz svežih tkiv, lahko pa tudi iz primerno skladiščenih arhivskih tkiv. V našem primeru je potekala osamitev DNA iz sveže zamrznjenih tkiv, ki so bila shranjena pri temperaturi -70°C .

Postopek

Tkivo, zamrznjeno pri -70°C , smo stehali, dali v terilnico, napolnjeno s tekočim dušikom, in ga s pestilom strli v prah. Po potrebi smo dolivali tekoči dušik. Strto tkivo smo dali v epruvetko Eppendorf, prilili približno 0,6 ml pufera K in s plastičnim batkom homogenizirali. Nato smo dolili pufer K do vrha epruvetke (1,2 ml/100 mg tkiva). Epruvetke smo v stresalnem inkubatorju stresali 15 ur pri 50°C .

Vsebinsko epruvetk smo nato razdelili na dva dela. Vsakemu delu smo dodali približno 0,6 ml zmesi fenola, kloroforma in izoamilalkohola ter močno pretresli. Vsebinsko epruvetk smo centrifugirali 15 minut pri 13.200 obratih na minuto. S pipeto smo previdno odstranili zgornjo, vodno fazo z DNA, in jo prenesli v svežo epruvetko. Nato smo zgoraj opisane postopke fenolne ekstrakcije še enkrat ponovili. Dobljenemu volumnu vzorca smo dodali enak volumen zmesi kloroforma in izoamilalkohola ter močno pretresli. Vsebinsko epruvetk smo centrifugirali 10 minut pri 13.200 obratih na minuto. S pipeto smo zopet odstranili zgornjo vodno fazo z DNA in jo prenesli v svežo epruvetko. Enemu volumnu vzorca smo dodali pol volumna amonijevega acetata ter dva in pol volumna 100 % etanola. Vsebinsko epruvetk smo rahlo pretresli, da se je DNA izoblikovala v meduzico, in jo shranili 24 ur pri -20°C .

Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 20 minut pri 13.500 obratih na minuto pri 4°C . Odlili smo tekočino in na dnu epruvetke je ostala oborina, ki smo ji dodali 1 ml ledenega 75 % etanola. Epruvetko smo pretresli, da je oborina splavala. Vzorce smo ponovno centrifugirali 15 minut pri 13.500 obratih na minuto pri 4°C . Previdno smo odlili tekočino in s pipeto posrkali preostanke tekočine. Sprano oborino smo osušili v vakuumu. Preostanku (oborjeni in sprani DNA) smo dodali 30 μl dvakrat destilirane vode in ga raztapljali 24 ur pri 4°C . Naslednji dan smo tako pripravljene vzorce raztopin DNA zamrznili pri -20°C .

Koncentracijo DNA v vzorcih smo izmerili spektrofotometrično z merjenjem absorbnosti svetlobe valovne dolžine 260 nm (A_{260}). Za določitev koncentracije DNA smo uporabili podatek, da je pri koncentraciji DNA 1 $\mu\text{g/ml}$ absorbnost svetlobe valovne dolžine 260 nm enaka 1 enoti ($A_{260} = 1$ enota) (26).

Za določitev čistosti vzorca smo izmerili še absorbnost pri 280 nm in določili razmerje A_{260}/A_{280} , ki mora biti med 1,5 in 2,0, sicer navzočnost prevelikih količin primesi (predvsem beljakovin) moti nadaljnje analize.

Elektroforeza na agaroznem gelu

Z elektroforezo na agaroznem gelu smo preverili vsebnost genomske DNA v vzorcih po končani osamitvi DNA (0,5 % agarozni gel) in ugotavljali navzočnost PCR-pridelkov po verižnem pomnoževanju DNA (2 % agarozni gel).

Načelo

Pri elektroforezi potujejo odseki DNA, ki so zaradi fosfodiesterских vezi negativno nabiti, z električnim tokom po določenem mediju (nosilcu) od katode proti anodi. Različno veliki odseki potujejo z različno hitrostjo in se tako med seboj ločujejo po dolžini. Hitrost potovanja skozi medij je odvisna od koncentracije snovi, iz katere je medij sestavljen, velikosti in oblike odsekov DNA ter električne poljske jakosti. Po določenem času bodo krajši odseki prepotovali daljšo pot, daljši odseki pa krajšo. S spreminjanjem koncentracije medija lahko med seboj ločimo odseke DNA različnih redov velikosti. Agarozna elektroforeza omogoča ločitev odsekov DNA dolžine od 300 do 10.000 baznih parov (27).

Raztopini agaroznega gela dodamo etidijev bromid (EtBr). EtBr se vrine v strukturo dvojnovidne molekule DNA in povzroči, da DNA fluorescira ob osvetlitvi z ultravijolično svetlobo (UV) valovne dolžine 203 nm.

Postopek

Pripravili smo 2 % ali 0,5 % agarozno raztopino in jo segrevali, dokler ni postala prosojna. Raztopini za 2 % agarozni gel smo dodali 6 μ l EtBr, raztopini za 0,5 % agarozni gel pa 4 μ l EtBr. Pripravljeno raztopino smo vlili v plitvo posodo z že nameščenimi glavničkami. Po 20 minutah, ko se je gel strdil, smo odstranili glavničke in posodo namestili v elektroforezno kadičko. Elektroforezno kadičko smo napolnili z 1 $\times$ TAE-pufrom.

Za elektroforezo genomske DNA smo zmešali 2 μ l elektroforetskega barvila BFB (bromofenol modro), 8 μ l 1 $\times$ TAE-pufra in 2 μ l vzorca genomske DNA. Za elektroforezo PCR-pridelkov smo zmešali 2 μ l elektroforetskega barvila BFB in 10 μ l PCR-pridelkov. Pripravljene vzorce smo vnesli v žepke. Elektroforeza genomske DNA je tekla 20 minut pri napetosti 120 voltov, elektroforeza PCR-pridelkov pa 60 minut pri napetosti 70 voltov.

Genomsko DNA in PCR-pridelke smo pogledali in fotografirali pod ultravijolično svetlobo valovne dolžine 203 nm na UV-transiluminatorju.

Verižna reakcija s polimerazo

V naši raziskavi smo z verižno reakcijo s polimerazo oz. PCR (okr. angl. *polymerase chain reaction*) pomnoževali mikrosatelitna zaporedja, ki označujejo izbrane gene (*APC*, *p53*, *DCC*, *Rb* in *nm23*) po postopkih, ki so opisani v literaturi (28). Najprej smo na naključno izbranih vzorcih (šest parov vzorcev) izvedli PCR enega, izbranega mikrosatelitnega zaporedja (monoPCR). S tem smo določili najugodnejše pogoje za sestavo in izvedbo multipleks PCR.

Načelo

Verižna reakcija s polimerazo je metoda, ki nam omogoča pomnožitev specifičnih področij genoma. Po končani reakciji dobimo milijon ali več kopij pomnoženega odseka DNA (29, 30).

PCR temelji na značilnostih podvajanja molekule DNA. DNA-polimeraza uporablja kot vzorec za sintezo komplementarnih verig enoverižni DNA, ki ju dobimo s segrevanjem dververišne DNA na temperaturo 95°C. To fazo imenujemo razdvajanje (angl. *denaturation*).

Za začetek sinteze komplementarnih verig potrebuje polimeraza majhen odsek dvoverižne DNA. Ta odsek nam priskrbita začetna oligonukleotida (angl. *primers*), dolga približno 20 baznih parov, ki se specifično vežeta na komplementarni zaporedji enoverižnih DNA in določita mesto začetka sinteze komplementarnih verig (faza prileganja). Za prileganje začetnih oligonukleotidov (angl. *primer annealing*) je potrebna temperatura med 45 in 75°C, odvisno od njihovega nukleotidnega zaporedja in od pomnoževane DNA. Na ta način usmerimo DNA-polimerazo v sintezo točno določenega, za nas zanimivega področja DNA. V reakcijsko zmes dodamo dva različna začetna oligonukleotida, od katerih je prvi komplementaren odseku ene in drugi odseku druge verige. Izbrana začetna oligonukleotida pokrivata oz. omejujeta področje DNA, ki ga želimo pomnožiti.

Sledi faza podaljševanja (angl. *extension*), v kateri se novo nastajajoči verigi podaljšujejo v smeri od 5'-konca proti 3'-koncu. Na vsaki novo sintetizirani verigi nastane vezavno mesto za vezavo novega začetnega oligonukleotida. Faza podaljševanja poteka najpogosteje pri 72°C (30), ki je najugodnejša temperatura za delovanje temperaturno obstojne DNA-polimeraze.

Ker je PCR sestavljen iz 25- do 40-kratnega ponavljanja določenega temperaturnega cikla, je končni rezultat dogajanja eksponentno kopičenje značilnih tarčnih odsekov DNA. Zaradi ponavljanja razdvajanja pri 95°C uporabljamo termostabilni encim, *Taq* DNA-polimerazo, ki so jo pridobili iz termofilnih bakterij iz islandskih vrelcev vroče vode. Po zadnjem ciklu se celotna encimska reakcija največkrat ustavi z ohladitvijo reakcijske zmesi na 4°C (30).

Multipleks PCR je metoda, pri kateri hkrati pomnožujemo več odsekov DNA. To dosežemo z dodatkom več različnih parov začetnih oligonukleotidov v isto epruvetko (28). Tako dobljene PCR-pridelke lahko kasneje razlikujemo po dolžini.

Postopek

Pripravili smo 25 µl reakcijske zmesi za PCR, ki je vsebovala:

- 16,25 µl dvakrat destilirane vode;
- 1 µl vzorca DNA (25–50 ng);
- 2,5 µl 2 mM dNTP;
- 2,5 µl reakcijskega pufra PCR;
- 1,5 µl 25 mM MgCl₂;
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida a (25 pmol);
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida b (25 pmol);
- 0,25 µl *Taq* DNA-polimeraze (0,25 enote).

Za multipleks PCR smo pripravili 25 µl reakcijske zmesi, ki je vsebovala:

- 8,5 µl dvakrat destilirane vode;
- 5 µl 2 mM dNTP;
- 2,5 µl reakcijskega pufra PCR;
- 1,5 µl 25 mM MgCl₂;
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida a in b vsakega od izbranih mikrosatelitov, ki označujejo gene *APC*, *p53*, *Rb* in *nm23* (25 pmol);
- 0,5 µl *Taq* DNA-polimeraze (0,5 enote).

V vsako epruvetko smo dodali kapljico parafinskega olja, ki je preprečilo izhlapevanje reakcijske zmesi med reakcijo.

Za negativno kontrolo smo reakcijski zmesi namesto DNA dodali dvakrat destilirano vodo. Z epruvetko smo ravnali enako kot z vsemi ostalimi in jo zaprli šele, ko so bile vse ostale epruvetke že zaprte.

Epruvetke smo vložili v napravo za PCR (Techne PHC-2) in pognali ustrezni program:

- 1 cikel: 5 minut pri 95°C in 1 minuto pri 55°C;
- 22 ciklov: 30 sekund pri 94°C, 1 minuto pri 55°C in 30 sekund pri 72°C;
- 1 cikel: 10 minut pri 72°C ter
- ohladitev na 4°C.

Začetne oligonukleotide so nam izdelali in barvno označili s fluorokromi pri družbi Perkin Elmer. Barvno so nam označili le en začetni oligonukleotid vsakega para. Tako je bila označena le ena veriga DNA, kar nam je olajšalo zaznavo. Oligonukleotidi so bili barvno označeni po postopkih, ki so opisani v literaturi (31, 28).

Tabela 2. Nukleotidna zaporedja, dolžine pridelkov in barvne oznake začetnih oligonukleotidov. TET – zeleno fluorescentno barvilo; 6-FAM – modro fluorescentno barvilo; HEX – rumeno fluorescentno barvilo; *APC*, *p53*, *DCC*, *Rb* in *nm23* – zaviralni geni; ZO – začetni oligonukleotidi.

Izbrani ZO	Nukleotidno zaporedje	Barvna oznaka	Dolžina pridelka (bazni pari)
APC-1a	5'-GTAAGCAGGACAAGATGACAG-3'	TET	156–182
APC-1b	5'-GCTATTCTCTCAGGATCTTG-3'	neobarvan	
P53-2a	5'-AACAGCTCCTTTAATGGCAG-3'	6-FAM	140–175
P53-2b	5'-GAATCCGGGAGGAGGTTG-3'	neobarvan	
DCC-2a	5'-GATGACATTTCCCTCTAG-3'	HEX	150–210
DCC-2b	5'-GTGGTTATTGCCTTGAAAAG-3'	neobarvan	
Rb-1a	5'-CTCCTCCCTACTTACTTGT-3'	TET	266–306
Rb-1b	5'-AATTAACAAGGTGTGGTGGTACACG-3'	neobarvan	
Nm23-1a	5'-TTGACCGGGGTAGAGAACTC-3'	TET	94–104
Nm23-1b	5'-TCTCAGTACTTCCCGTGACC-3'	neobarvan	

Analiza PCR-pridelka s kapilarno elektroforezo

Načelo

PCR-pridelke smo ločevali po načelu kapilarne elektroforeze z napravo, ki jo imenujemo avtomatski genski analizator (angl. *Genetic Analyser*).

Vzorci nanašamo zaporedno in avtomatsko. Odseki DNA potujejo po tekočem mediju (polimeru) do optičnega okenca. To je mesto na kapilari, ki prepušča vzpodbujevalno svetlobo. Zaznava temelji na začetnih oligonukleotidih, ki so označeni s fluorescentnimi barvili (fluorokromi, npr. HEX, 6-FAM, TAMRA in TET). Med elektroforezo potujejo označeni odseki DNA po kapilari preko optičnega okenca, kjer laserski žarek spodbudi fluorokrome in ti pričnejo fluorescirati – oddajati vzbujeno svetlobo.

Fluorokromi imajo vrhove oddane svetlobe pri različnih valovnih dolžinah. Fluorescentni signal zaznavamo v barvi, ki jo dobimo s pomočjo ustreznega filtra. Sočasno lahko zaznavamo štiri različne tipe fluorescentnih barvil, kar nam omogoča sočasno zaznavanje različno fluorescentno označenih PCR-pridelkov. Hkrati lahko analiziramo največ tri, z različnimi fluorokromi označene PCR-pridelke, s četrtrim fluorokromom pa označimo notranji velikostni standard, ki predstavlja osnovo za avtomatsko določanje dolžin odsekov DNA oz. alelov (27).

V primeru, da se PCR-pridelki, označeni z enako barvo, dovolj razlikujejo po dolžini, pa lahko zaznavamo tudi večje število PCR-pridelkov. Tako lahko odseke DNA ločujemo na osnovi barv in dolžin. Slika, ki jo dobimo po končani ločitvi PCR-pridelkov, se imenuje elektroferogram.

Postopek priprave vzorcev

V Eppendorf epruvetko smo dali po 12 µl formamida, 0,5 µl notranjega velikostnega standarda in 1 µl PCR-pridelka. Epruvetke smo zaprli in oddali v ločevanje s kapilarno elektroforezo, kar so izvedli na avtomatskem genskem analizatorju (Perkin Elmer) na Inštitutu za sodno medicino Medicinske fakultete v Ljubljani.

Računanje alelnega razmerja

Računanje alelnega razmerja smo povzeli po delu Cawkwellove in sodelavcev (28). Alelno razmerje smo računali na podlagi elektroferograma, v katerem je količina pomnoženega odseka DNA (alela) prikazana kot površina vrha.

V primeru heterozigotnosti alelov smo dobili dva vrha. Izračunali smo razmerje površin obeh vrhov za tumorsko tkivo (T_1 , T_2) in ga primerjali z razmerjem površin obeh vrhov pri zdravem tkivu (N_1 , N_2).

$$\frac{T_1 : T_2}{N_1 : N_2}$$

T_1 vedno predstavlja površino nižjega vrha, N_1 pa ustrezno površino vrha pri enaki dolžini v parnem vzorcu zdravega tkiva. T_2 vedno predstavlja površino višjega vrha, N_2 pa

ustrezno površino vrha pri enaki dolžini v parnem vzorcu zdravega tkiva. V primeru, ko alelna razmerje presega rezultat 1,00, uporabimo naslednjo pretvorbo:

$$\frac{1}{\left(\frac{T_1 : T_2}{N_1 : N_2} \right)}, \text{ katere rezultat je med } 0,00 \text{ in } 1,00.$$

Končni rezultat, ki je manjši ali enak 0,50, se smatra kot dokaz za izgubo alela. Tako dopuščamo možnost, da vsebuje tumorsko tkivo 50 % normalnih celic.

V primeru homozigotnosti alelov alelnega razmerja ne moremo izračunati in tak rezultat smatramo za neinformativen. Tudi če se v elektroferogramu tumorskega tkiva prikažejo novi vrhovi, ki niso vidni v elektroferogramu zdravega tkiva, je rezultat neinformativen. Vzrok temu je mikrosatelitna nestabilnost opazovanega gena.

Računanje pogostnosti izgube heterozigotnosti

Računanje pogostnosti izgube heterozigotnosti smo povzeli po delu Cawkwellove in sodelavcev (28). Za računanje smo uporabili enačbo:

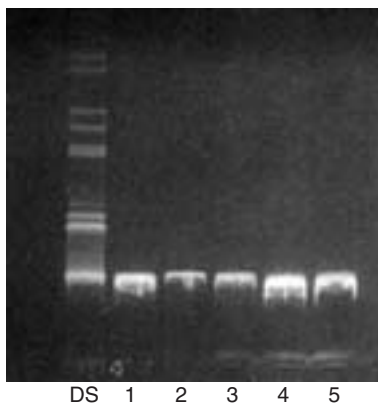
$$\frac{LOH}{(LOH + N)} \times 100\%$$

LOH – število primerov z izgubo heterozigotnosti

N – število heterozigotnih primerov, ko ni prišlo do izgube heterozigotnosti

Rezultati

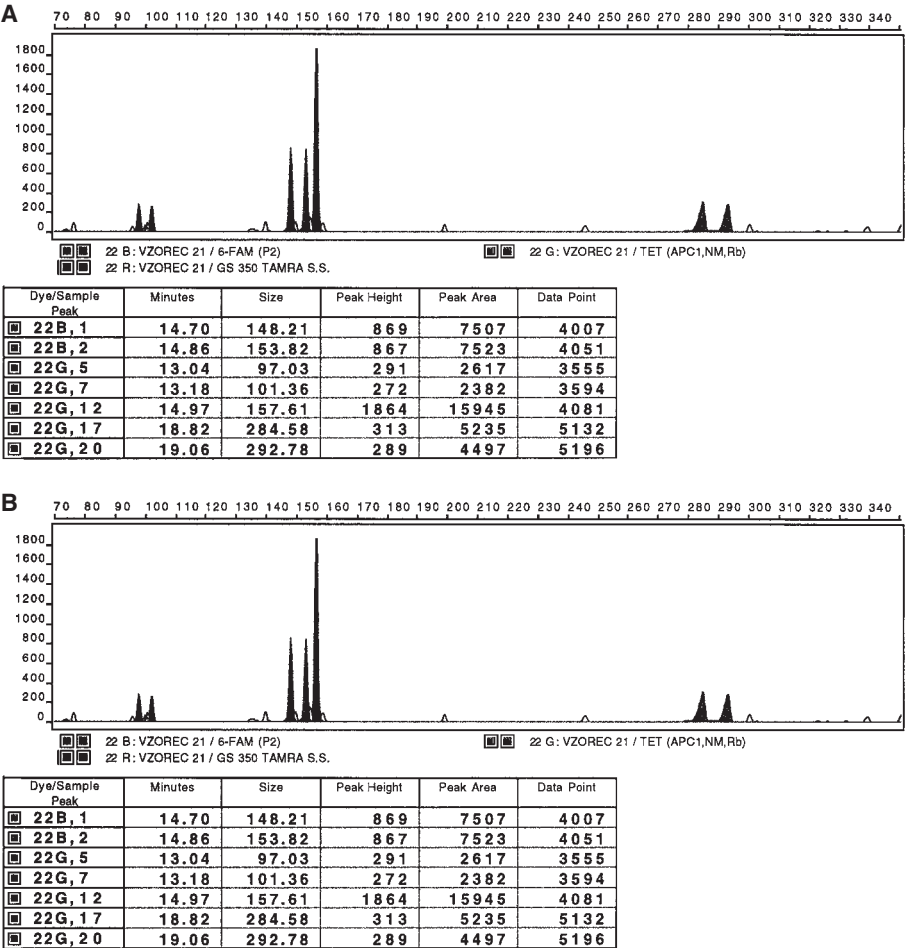
DNA smo osamili iz sveže zamrznjenih vzorcev tumorskega in zdravega tkiva. Vsebnost DNA v vzorcu smo preverili z elektroforezo na 0,5 % agaroznem gelu



Slika 4. Elektroforeza nekaj vzorcev osamljene DNA. DS – dolžinski standard; od 1 do 5 – vzorci osamljene DNA.

Osamljeni DNA smo izmerili koncentracijo in čistost z merjenjem absorbnosti ultravijolične svetlobe pri 260 in 280 nm. Koncentracije DNA so znašale od 0,1 do 10,0 µg/µl, čistost pa je ustrezala zahtevanemu razmerju (A_{260}/A_{280} je med 1,5 in 2,0).

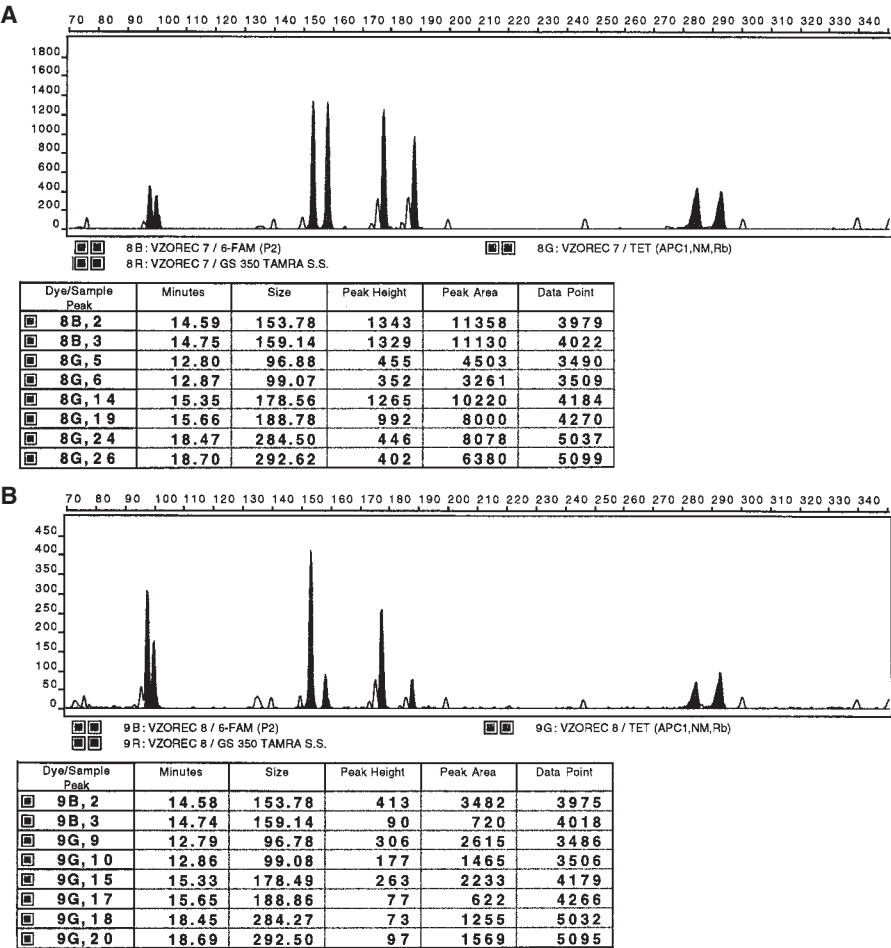
Izvedli smo multipleks PCR izbranih mikrosatelitnih zaporedij, ki označujejo gene *APC*, *p53*, *Rb* in *nm23*, za gen *DCC* pa smo izvedli monoPCR. PCR-pridelke smo ločevali



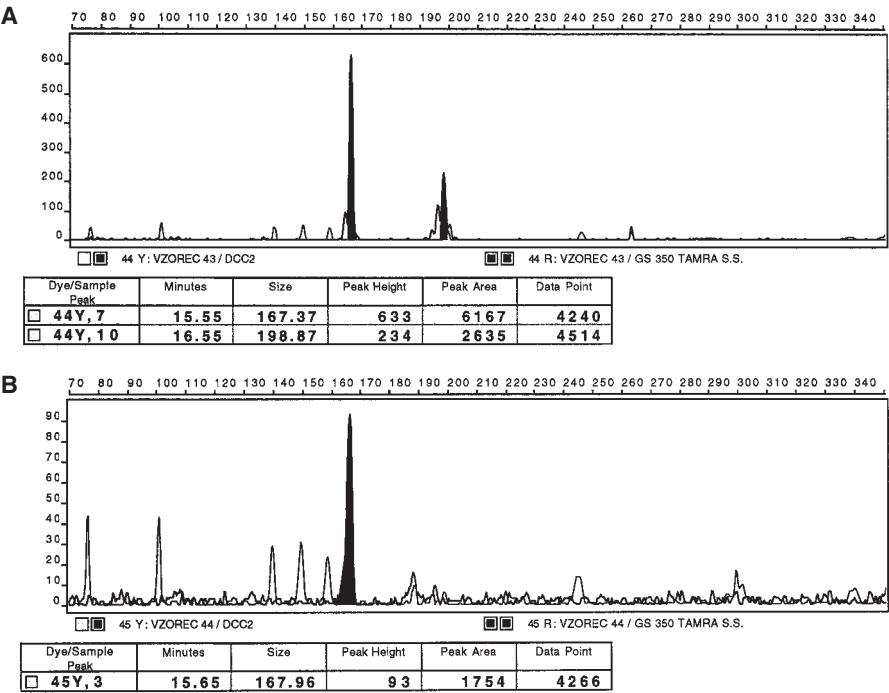
Slika 5. Elektroferogram prikazuje multipleks PCR (za mikrosatelitna zaporedja genov *APC*, *p53*, *Rb* in *nm23*) primera, označenega s številko 10. Elektroferograma zdravega tkiva (A) in tumorskega tkiva (B) sta si podobna – ni prišlo do genskih sprememb. Dokazana je homozigotnost *APC* (prisoten samo en vrh), vsi ostali (*nm23*, *p53*, *Rb*) pa so heterozigotni (prisotna dva vrhova). Na abscisi je prikazana dolžina pomnoženega odseka v baznih parih, na ordinati pa višina vrha. Dolžine mikrosatelitnih zaporedij alelov: *nm23* (97 bp, 101 bp), *APC* (157 bp), *Rb* (285 bp, 293 bp), *p53* (148 bp, 154 bp). Tabela pod elektroferogramom prikazuje dolžino odseka (angl. size) v baznih parih, višino vrha (angl. peak height) in površino vrha (angl. peak area).

z avtomatskim genskim analizatorjem, ki nam je izrisal ustrezne elektroferograme. Z avtomatskim analizatorjem smo preiskali 17 parov vzorcev, od katerih jih je bilo 12 primer-nih za nadaljnjo analizo, preostalih 5 (označenih s števkami 13–17) pa smo izločili.

Nekaj primerov elektroferogramov za posamezne pare vzorcev je prikazanih na slikah od 5 do 8.



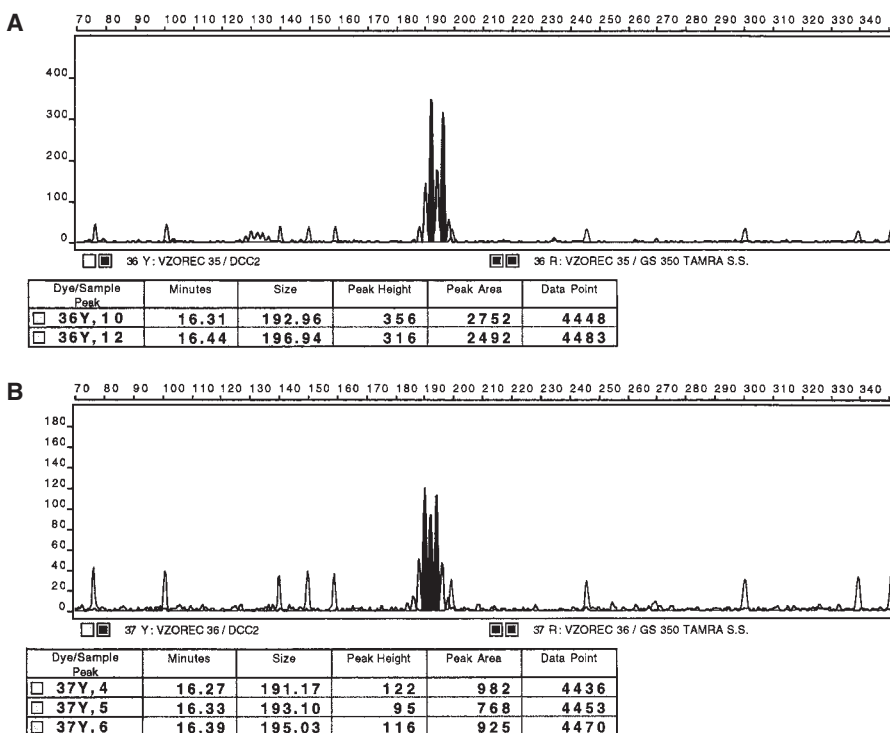
Slika 6. Elektroferogram prikazuje multipleks PCR (za mikrosatelitna zaporedja genov APC, p53, Rb in nm23) primera, označenega s številko 5. Elektroferograma zdravega tkiva (A) in tumorskega tkiva (B) sta različna. Vsi aleli so heterozigotni, za p53 in APC pa smo z izračunom alelnega razmerja dokazali izgubo heterozigotnosti. Na abscisi je prikazana dolžina pomnoženega odseka v baznih parih, na ordinati pa višina vrha. Dolžine mikrosatelitnih zaporedij alelov: nm23 (97 bp, 99 bp), APC (178 bp, 189 bp), Rb (284 bp, 293 bp), p53 (154 bp, 159 bp). Tabela pod elektroferogramom prikazuje dolžino odseka (angl. size) v baznih parih, višino vrha (angl. peak height) in površino vrha (angl. peak area).



Slika 7. Elektroferogram prikazuje monoPCR primera, označenega s številko 3. Primerjava elektroferogramov zdravega tkiva (A) in tumorskega tkiva (B) nam prikaže popolno izgubo heterozigotnosti DCC. Na abscisi je prikazana dolžina pomnoženega odseka v baznih parih, na ordinati pa višina vrha. Dolžina mikrosatelitnih zaporedij alelov: 168 bp in 199 bp. Tabela pod elektroferogramom prikazuje dolžino odseka (angl. size) v baznih parih, višino vrha (angl. peak height) in površino vrha (angl. peak area).

Tabela 3. Rezultati analize genskih sprememb pri raku želodca. APC, p53, Rb in nm23, DCC – zaviralni geni; Lauren – Laurenova razvrstitev, INT – intestinalna oblika, DIF – difuzna oblika, ME – mešana oblika; N – ni izgube heterozigotnosti; H – homozigotnost alelov, U – rezultat ni uporaben zaradi nepomnoževanja izbranega odseka DNA; LOH – izguba heterozigotnosti; MI – mikrosatelitna nestabilnost.

Primer št.	Lauren	APC	P53	Rb	Nm23	DCC
1	INT	N	U	U	U	U
2	INT	H	H	U	N	U
3	ME	N	H	U	N	LOH
4	DIF	N	H	N	N	U
5	INT	LOH	LOH	N	N	U
6	DIF	H	U	H	N	U
7	INT	H	LOH	N	N	MI
8	INT	H	N	N	N	U
9	ME	N	H	N	N	U
10	INT	H	N	N	N	U
11	INT	N	N	U	N	MI
12	ME	U	U	U	H	U



Slika 8. Elektroferogram prikazuje monoPCR primera, označenega s številko 7. Primerjava elektroferogramov zdravega tkiva (A) in tumorskega tkiva (B) nam prikaže pojav mikrosatelitne nestabilnosti gena DCC. Na abscisi je prikazana dolžina pomnoženega odseka v baznih parih, na ordinati pa višina vrha. Dolžina mikrosatelitnih zaporedij alelov: 193 bp in 197 bp. Tabela pod elektroferogramom prikazuje dolžino odseka (angl. size) v baznih parih, višino vrha (angl. peak height) in površino vrha (angl. peak area).

V primeru heterozigotnosti alelov v zdravem in tumorskem tkivu smo lahko izračunali alelno razmerje in tako dokazali morebitno izgubo alela oz. izgubo heterozigotnosti. V primeru heterozigotnosti v zdravem tkivu in homozigotnosti v tumorskem tkivu pa je prišlo do popolne izgube heterozigotnosti (slika 7). Dobljeni rezultati vseh vzorcev so prikazani v tabeli 3.

Pri difuzni obliki nismo ugotovili nobenega primera izgube heterozigotnosti (LOH). Pri mešani obliki smo v enem primeru ugotovili LOH za gen DCC. Največ genskih sprememb smo ugotovili pri intestinalni obliki: za gen APC smo v enem primeru ugotovili LOH; za gen p53 smo v dveh primerih ugotovili LOH in za gen DCC smo v dveh primerih ugotovili pojav mikrosatelitne nestabilnosti.

Pogostnost izgube heterozigotnosti smo izračunali za vsak posamezen gen po enačbi:

$$\frac{LOH}{(LOH + N)} \times 100\%$$

S tem smo izključili primere homozigotnosti (H) in mikrosatelitne nestabilnosti (MI). Rezultati izgube heterozigotnosti za posamezne gene so v tabeli 4.

Tabela 4. Rezultati izgube heterozigotnosti za posamezne gene. *APC*, *p53*, *Rb*, *nm23* in *DCC* – zaviralni geni; *LOH* – izguba heterozigotnosti; *N* – število heterozigotnih primerov, ko ni prišlo do izgube heterozigotnosti.

Gen	Delež LOH (%)	LOH/(LOH + N)
<i>APC</i>	17	1/6
<i>P53</i>	50	2/4
<i>Rb</i>	0	0/6
<i>Nm23</i>	0	0/10
<i>DCC</i>	100	1/1

Razpravljanje

Osamitev DNA

DNA smo osamili iz sveže zamrznjenih vzorcev tumorskega in zdravega tkiva 17 bolnikov. Pri postopku smo morali biti še posebno pozorni na natančno prenašanje vodne faze z DNA, da nismo prenesli zraven še usedline, ki je vsebovala primesi (predvsem beljakovine).

Osamljeni DNA smo spektrofotometrično izmerili koncentracijo in čistost. Primerna koncentracija DNA (vsaj 0,1 µg/µl) je bila pomembna za nadaljnje delo. Vzorcev s prenizko koncentracijo DNA namreč ne moremo uporabiti za pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo, ker ne bi dobili zadostne količine PCR-pridelka. Zelo koncentrirane raztopine DNA pa so preveč viskozne, kar otežuje delo z njimi, zato jih moramo prej redčiti. Razen tega lahko vsebujejo tudi preveč zaviralcev DNA-polimeraze. Tudi DNA, ki ni dovolj čista, ni primerna za nadaljnjo analizo, saj vsebuje primesi, ki motijo verižno reakcijo s polimerazo.

Koncentracije DNA v nekaterih naših vzorcih so bile previsoke, zato smo jih morali redčiti. Čistost DNA v naših vzorcih je ustrezala zahtevam, opisanim v Metodah dela.

Pogoji za verižno reakcijo s polimerazo

Izvedli smo multipleks PCR izbranih mikrosatelitnih zaporedij, ki označujejo gene *APC*, *p53*, *Rb* in *nm23*. Za gen *DCC* smo izvedli monoPCR. S tem smo izboljšali preglednost elektroferogramov, saj se mikrosatelitno zaporedje gena *DCC* po dolžini prekriva z mikrosatelitnimi zaporedji genov *APC* in *p53*.

Po analizi z avtomatskim genskim analizatorjem smo ugotovili, da v petih parih vzorcev (označenih s številkami 13–17) ni bilo pomnožitve izbranih odsekov DNA, zato smo jih morali izločiti iz nadaljnje analize. Prav tako ni bilo pomnožitve nekaterih mikrosatelitnih zaporedij posameznih genov v ostalih vzorcih, vendar podobne rezultate navajajo

tudi drugje (35). Do nepomnoževanja izbranih odsekov DNA je najverjetneje prišlo zaradi napak pri verižni reakciji s polimerazo (PCR).

Čeprav je postopek PCR v osnovi preprost, je uspešnost metode odvisna od številnih dejavnikov.

Zaradi same narave verižne reakcije s polimerazo je onesnaženje ena najpogostejših težav, povezanih s to metodo. Onesnaženje pomeni navzočnost neželenih DNA v reakcijski zmesi, ki se pomnožijo hkrati z našim vzorcem. Vsaj teoretično se količina DNA v vsakem ciklu reakcije podvoji, torej se začetna količina DNA eksponentno povečuje. Zanimljivo začetno onesnaženje lahko po pomnožitvi prekrije dobršen del rezultata (32). V naši raziskavi smo zato uporabljali negativno kontrolo (reakcijsko zmes, ki vsebuje vse reagente, razen genomske DNA), tako da smo lahko onesnaženje takoj zaznali in takšen primer ponovili.

Ostale najpogostejše težave pri PCR so (27):

- premalo želenega produkta, ki ga zato ne opazimo;
- nespecifično pomnoževanje. V genomu velikosti 10^9 baznih parov predstavlja 1000 baznih parov dolgo zaporedje komaj eno milijoninko DNA. Zato se lahko zgodi, da začetni oligonukleotidi prepoznajo tudi sorodna, nespecifična zaporedja, kar ima za posledico pomnožitev neželenih odsekov;
- oligomerizacija začetnih oligonukleotidov (tvorba dimerov in oligomerov).

Da bi preprečili nespecifično pomnoževanje in dobili zadostno količino želenega PCR-pridelka, smo morali poiskati najugodnejše pogoje za vse dejavnike, ki vplivajo na specifičnost reakcije.

Na specifičnost pomnoževanja vplivata količina in kakovost genomske DNA. Premajhna količina DNA ne bo omogočila nastanka zadostne količine PCR-pridelka, ki ga tako ne moremo zaznati oz. izmeriti. Če pa je količina DNA prevelika, lahko v zelo kratkem času pridobimo preveč PCR-pridelkov, tako da ne moremo izmeriti razmerja med njegovo količino in količino izhodiščne DNA. PCR-pridelki namreč v začetku naraščajo eksponentno s številom ciklov PCR, nato pa se krivulja izravna in doseže tako imenovani plato. Če je izhodiščne DNA preveč, glede na vse ostale sestavine reakcijske zmesi, bo plato dosežen že po poteku nekaj ciklov. Preveč izhodiščne DNA lahko pomeni tudi nevarnost večjega nastajanja nespecifičnih pridelkov.

Na specifičnost PCR v veliki meri vplivata tudi koncentracija začetnih oligonukleotidov in njihova sestava. Visoka koncentracija vodi v tvorbo nespecifičnih pridelkov in tvorbo dimerov. Prvi pogoj za uspešno pomnoževanje izbranega odseka DNA je pravilna izbira začetnih oligonukleotidov.

Prav tako vplivajo na specifičnost reakcije koncentracija magnezijevih ionov (Mg^{2+}), koncentracije deoksinukleotid trifosfatov, sestava reakcijskega pufra ter koncentracija in aktivnost polimeraze (27).

V naši raziskavi smo koncentracije začetnih oligonukleotidov, Mg^{2+} , deoksinukleotid trifosfatov, sestavo reakcijskega pufra, aktivnost in koncentracijo polimeraze ter količino DNA povzeli po delu Cawkwellove in sodelavcev (28).

Da dobimo zadostne količine želenega PCR-pridelka, moramo za vsako stopnjo reakcijskega cikla določiti določiti najugodnejšo temperaturo in seveda tudi trajanje posameznega cikla v reakciji. Čas trajanja razdvajanja ne sme biti predolg, saj lahko pride do razgradnje matrične DNA in PCR-pridelkov, hkrati pa lahko pride tudi do postopne izgube aktivnosti polimeraze. Temperatura prileganja je kritična točka verižne reakcije s polimerazo. Previsoka temperatura bo preprečila pomnoževanje, prenizka pa bo omogočila nespecifično prileganje začetnih oligonukleotidov in s tem zmanjšala količino želenega pridelka. Čas trajanja prileganja začetnih oligonukleotidov ne sme biti predolg, saj to navadno povzroči nastanek večje količine nespecifičnih pridelkov. Za fazo podaljševanja pa uporabimo temperaturo 72°C, saj je to najugodnejša temperatura za delovanje Taq-polimeraze (27).

V naši raziskavi smo zato spreminjali temperaturo in čas trajanja posameznih ciklov. Naredili smo monoPCR s posameznimi začetnimi oligonukleotidi mikrosatelitnih zaporedij za nekaj izbranih vzorcev pri različnih pogojih in na podlagi rezultatov določili najugodnejše pogoje za multipleks PCR. Poudariti je treba, da multipleks PCR pomeni kompromis med pogoji pomnoževanja zelo različnih alelov, tako glede njihove dolžine, kot tudi oligonukleotidnega zaporedja in s tem najugodnejše temperature prileganja začetnih oligonukleotidov. Obenem smo morali paziti, da v reakcijsko zmes nismo dali preveč ali premalo DNA. Z minimalnim številom ciklov (22 ciklov) smo hoteli zadržati količino PCR-pridelkov v območju eksponentne rasti, da bi lahko količinsko določevali razmerja posameznih alelov.

Pri tem smo nekoliko spremenili reakcijske pogoje, ki jih sicer navajajo Cawkwellova in sodelavci (28). Prav tako, kot omenjeni avtorji, smo pomnoževanje izvajali v 22 ciklih, kar naj bi, kot že rečeno, preprečilo nastajanje prevelike količine PCR-pridelkov. Ker pa smo pomnoževanje izvajali v manj natančni napravi Techne PHC-2, pri kateri prihaja do nihanja temperature okoli izbrane temperature prileganja začetnih oligonukleotidov, se je dejanski učinek 22 ciklov zmanjšal. Zato smo vsakemu dvostopenjskemu ciklu (razdvajanje, prileganje) dodali še tretjo stopnjo, to je podaljševanje. Poleg tega smo na koncu, po opravljenih 22 ciklih dodali še 7 minut končnega podaljševanja. To izboljšavo smo uvedli po predhodno opravljenih poskusih, ki so pokazali, da je na ta način mogoče tudi na cenejši in manj natančni napravi pridobiti zadostno, vendar ne preveliko količino PCR-pridelkov.

Menimo, da je do težav pri v začetku omenjenih petih parih vzorcev prišlo predvsem zaradi verjetne navzočnosti zaviralcev DNA-polimeraze v posameznih vzorcih. Z redčenjem raztopine DNA se temu sicer včasih lahko izognemo, vendar smo pri tem omejeni, saj predvsem pri sočasnem pomnoževanju (multipleks PCR) ne moremo reakcije izvajati s količino DNA, ki je pod tisto minimalno, ki smo jo pred tem ugotovili s poskusi. V takih primerih zato namesto multipleks PCR priporočamo izvedbo posamičnih mono-PCR, za vsak alel posebej. Tega v okviru te naloge nismo izvedli, saj je bil naš namen preizkusiti in uvesti metodo multipleks-PCR. Pri kritičnem presojanju naših rezultatov je treba upoštevati tudi dejstvo, da se človeška tkiva (v našem primeru tumorsko in zdravo tkivo) posameznikov med seboj razlikujejo, saj lahko vsebujejo različne količine tkivnih zaviralcev DNA-polimeraze. V tem pogledu se med seboj razlikujejo tudi vzorci enakih

tkiv posameznikov. Zato bi bilo treba za vsak par vzorcev, kjer nismo dobili rezultatov pomnoževanja, posebej določiti najugodnejše pogoje za PCR in morda tudi spremeniti sestavo reakcijske zmesi. Vse to presega obseg te naloge, hkrati pa je to ena izmed možnosti za nadaljnje raziskave. Idealno bi bilo namreč ugotoviti pogoje, kjer bi v vsakem primeru dobili rezultate, vendar je takšno »idealnost« tudi v literaturi težko zaslediti.

Primerjava rezultatov

Do sedaj je potekalo že nekaj raziskav o izgubi heterozigotnosti zaviralnih genov pri raku želodca (24, 33–36), toda še nihče ni izvedel multipleks PCR mikrosatelitnih zaporedij. Takšna raziskava pa je bila izvedena pri raku širokega črevesa in danke (28).

Rezultati naše raziskave so primerljivi z rezultati, dobljenimi z uporabo drugih metod, ki so opisani v literaturi. Za gen *APC* smo dokazali izgubo heterozigotnosti v 17 % primerov, v raziskavi v tujini pa so jo dokazali v 20 % primerov (36). Za gen *p53* smo v naši raziskavi dokazali izgubo heterozigotnosti v 50 % primerov, kar je podobno deležu, ki ga navajajo v literaturi (17, 18, 33). Za gen *DCC* smo v naši raziskavi ugotovili izgubo heterozigotnosti v 100 % primerov. Do takšnega rezultata smo prišli, ker smo dobili uporaben rezultat le v treh primerih, od tega pa sta bila dva primera neinformativna (mikrosatelitna nestabilnost). Tretji primer je pokazal popolno izgubo heterozigotnosti. V tujini so jo ugotovili v 50 % primerov (35). Za gen *nm23* nismo ugotovili izgube heterozigotnosti, čeprav je bilo deset primerov informativnih. To si razlagamo s tem, da smo imeli v raziskavo vključene le tri bolnike s četrtnim stadijem bolezni po TNM-razvrstitvi, od tega smo enega kasneje izločili iz nadaljnje analize. Zmanjšano izražanje zaviralnega gena *nm23* naj bi bilo namreč povezano s pojavom zasevkov (24), ki so prisotni šele pri bolnikih s četrtnim stadijem bolezni. V tujini so ugotovili izgubo heterozigotnosti v 8 % primerov (18, 24). Tudi pri genu *Rb* nismo ugotovili izgube heterozigotnosti. Nikjer v literaturi nismo zasledili raziskav o izgubi heterozigotnosti gena *Rb* pri raku želodca, zato naših rezultatov ne moremo primerjati.

Rezultati ugotavljanja genskih sprememb pri intestinalni in difuzni obliki so prav tako primerljivi z rezultati, opisanimi v literaturi. Pri difuzni obliki nismo ugotovili primera izgube heterozigotnosti, pri mešani obliki smo v enem primeru ugotovili popolno izgubo heterozigotnosti za gen *DCC*, največ genskih sprememb pa smo ugotovili pri intestinalni obliki. Ti rezultati se ujemajo z ugotovitvami, da je izguba heterozigotnosti genov *APC* in *DCC* značilna za intestinalno obliko (17, 22). Izguba heterozigotnosti za gen *p53* pa naj bi bila prisotna pri intestinalni in difuzni obliki (22), česar v naši raziskavi nismo potrdili. Vzrok temu je najverjetneje premajhno število primerov difuzne oblike raka želodca v naši raziskavi, na kar pa nismo mogli vplivati, saj so bili vzorci izbrani naključno, pred histološko opredelitvijo.

Sklep

Z raziskavo smo dosegli najpomembnejši namen, ugotoviti značilne zaviralne gene, ki pri naših bolnikih kažejo največjo pogostnost sprememb pri sporadičnih primerih raka želodca, in hkrati uvesti najsodobnejšo metodo preiskovanja izgube alelov.

Raziskava je dala osnove za nadaljnje iskanje najugodnejših pogojev za izvedbo izboljšanih multipleks PCR, v katere bi vključevali še druge, nove genske označevalce za dokazovanje izgube alelov.

V naslednjih raziskavah bi tako lahko na večjem številu vzorcev določili pogostnost genskih sprememb in z rezultati takšnih raziskav bi lahko statistično sklepali o pogostnosti sprememb pri vseh rakah želodca. To pa bi omogočilo uvajanje metode v klinično prakso kot pomembnega diagnostičnega testa, ki bi olajšal in izboljšal prepoznavo raka. Metoda bi lahko tudi izboljšala napoved poteka bolezni in pripomoglo k odkrivanju novih načinov zdravljenja.

Naslednje raziskave bi tako lahko vključile ostale, še neraziskane gene, ki so najverjetneje vključeni v nastanek raka želodca (ostali zaviralni geni in popravljalni geni). Prav tako pa bi lahko izvedli podobne raziskave tudi pri ostalih pogostih malignih obolenjih.

Zaključki

V naši raziskavi smo želeli na izbranih vzorcih adenokarcinomov želodca v izbranih lokusih nekaterih zaviralnih genov (*APC*, *p53*, *Rb*, *nm23*, *DCC*) ugotoviti izgubo alela in hkrati uvesti najsodobnejšo metodo preiskovanja izgube alelov. Pri tem smo poskušali ugotoviti tudi morebitno razliko v genskih spremembah med intestinalno in difuzno obliko raka želodca pri naših bolnikih.

Raziskava je obravnavala vzorce tumorskega in zdravega tkiva sedemnajstih bolnikov, vendar smo morali zaradi nepomnoževanja izbranih odsekov DNA pet parov vzorcev kasneje izločiti. Za vsak par vzorcev, kjer nismo dobili rezultatov, bi bilo treba posebej določiti najugodnejše pogoje za PCR in morda tudi spremeniti sestavo reakcijske zmesi, kar je ena izmed možnosti za nadaljnje raziskave.

Uvedli smo najsodobnejšo metodo preiskovanja izgube alelov s sočasnim verižnim pomnoževanjem (multipleks PCR) mikrosatelitnih zaporedij, ki označujejo različne zaviralne gene. Rezultati naše raziskave so za gena *APC* in *p53* primerljivi z rezultati raziskav v tujini, ne pa tudi za gene *DCC*, *nm23* in *Rb*. Ugotovili smo razliko v pojavljanju genskih sprememb pri intestinalni in difuzni obliki, vendar bi za potrditev te ugotovitve potrebovali večje število primerov.

Raziskava je nakazala nove možnosti za raziskovanje genskih sprememb tako pri raku želodca kot pri ostalih malignih obolenjih.

Zahvala

Raziskovalno nalogo sva opravili na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Zahvaljujeva se najinemu mentorju, prof. dr. Radovanu Komelu, za pomoč in strokovno vodstvo pri delu. Za pomoč se zahvaljujeva tudi vsem ostalim z Inštituta za biokemijo, še posebej mag. Katji Vouk in mag. Marku Vitasu, ki sta nama priskočila na pomoč v najtežjih trenutkih.

Hvala prof. dr. Stanetu Repšetu, dr. med., s Kliničnega oddelka za abdominalno kirurgijo KC, za koristne napotke pri pisanju naloge.

Zahvaljujema se mag. Robertu Juvanu, dr. med., s Kliničnega oddelka za abdominalno kirurgijo KC, za zbrane vzorce, in Alenki Kljun, ing. z Onkološkega inštituta, za histološke podatke o vzorcih.

Hvala doc. dr. Jožetu Balažicu, dr. med., in as. mag. Ireni Zupanič z Inštituta za sodno medicino, ki sta nama omogočila analizo vzorcev na avtomatskem genskem analizatorju.

Najlepša hvala Juriju Bednariku, ki nama je pomagal pri oblikovanju naloge in nama dal uporabne nasvete za pisanje besedila.

Hvala tudi Izi Ciglencečki, ki je popravila slovnične napake.

Zahvaljujema se tudi vsem ostalim, ki so kakorkoli pomagali pri nastajanju te naloge.

Literatura

1. *Incidenca raka v Sloveniji 1995*. Ljubljana: Onkološki inštitut – Register raka za Slovenijo, 1998: 11, 25.
2. *IARC Sci Publ 1997; 143: 446–745*.
3. *IARC Sci Publ 1997; 143: 972–3*.
4. Crawford JM. The Gastrointestinal Tract. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL Crawford JM, eds. *Pathologic basis of disease*. Philadelphia: Saunders, 1994: 779–83.
5. Haas JF, Schottenfeld D. Epidemiology of gastric cancer. In: Lipin M, Good R, eds. *Gastrointestinal tract cancer*. New York: Plenum Pub, 1978: 173–206.
6. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Belli J, Stemmermann GN. Pathologic and phenotypic features of gastric cancer. *Semin Oncol 1996; 23: 292–306*.
7. Peddanna N, Holt S, Verma RS. Genetics of gastric cancer. *Anticancer Res 1995; 15: 2055–64*.
8. Mazzeo F, Mozzillo N, Forestieri P. Cancer of the stomach. In: Veronesi U, ed. *Surgical oncology*. Berlin: Springer-Verlag, 1989: 544–77.
9. Hermanek P. Magenkarzinom – Typing, Grading, Staging. In: Gall FP, Hermanek P, Hornik D, eds. *Magenkarzinom. Epidemiologie, Pathologie, Therapie, Nachsorge*. München: Zuckschwerdt W, 1986: 57–60.
10. Giedl J. TNM-Validierungstudie Magenkarzinom: Histologische Klassifikation. In: Gall FP, Hermanek P, Hornik D, eds. *Magenkarzinom. Epidemiologie, Pathologie, Therapie, Nachsorge*. München: Zuckschwerdt W, 1986: 53–6.
11. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt of a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand 1965; 64: 31–49*.
12. Ming SC. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer 1977; 39: 2475–85*.
13. Trent RJ. *Molecular Medicine*. London: Churchill, 1993: 121–31.
14. Ellis MJC, Sikora K. Molecular biology of cancer. In: Cox TM, Sinclair J, eds. *Molecular Biology in Medicine*. Oxford: Blackwell Sci, 1997: 149–71.
15. Carbone DP. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Hosp Pract 1993; 28: 145–61*.
16. Correa P. The new era of cancer epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1991; 1: 5–11*.
17. Tahara E, Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H. Gene alterations in intestinal metaplasia and gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol 1994; 6: Suppl 1: 97–102*.
18. Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol 1996; 23: 307–15*.
19. Trent RJ. *Molecular Medicine*. London: Churchill, 1993: 179–83.
20. Kuniyasu H, Yasui W, Kitada Y, et al. Frequent amplification of the *c-met* gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun 1992; 189: 227–32*.
21. Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. *Cancer 1995; 75: Suppl 6: 1410–17*.
22. Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol 1993; 119: 265–72*.

23. Nakatsuru S, Yanagisawa A, Ichii S, et al. Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 559–63.
24. Nakayama H, Yasui W, Yokozaki H. Reduced expression of nm23 is associated with metastasis of human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 184–90.
25. Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19: 484–90.
26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pr, 1989: E6.
27. Šterlinko H. *Analiza DNA pri preverjanju starševstva: prednosti in slabosti različnih metod ločevanja z elektroforezo*. Diplomski naloga. Ljubljana: Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Oddelek za biologijo, 1998.
28. Cawkwell L, Lewis FA, Quirke P. Frequency of allele loss of *DCC*, *p53*, *RBI*, *WT1*, *NF1*, *NM23* and *APC/MCC* in colorectal cancer assayed by fluorescent multiplex polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1994; 70: 813–18.
29. Templeton NS. The polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 58–72.
30. Remick DG, Kunkel SL, Holbrook EA, Hanson CA. Theory and applications of the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: Suppl 1: 49–54.
31. Cawkwell L, Bell SM, Lewis FA, Dixon MF, Taylor GR, Quirke P. Rapid detection of allele loss in colorectal tumors using microsatellites and fluorescent DNA technology. *Br J Cancer* 1993; 67: 1262–7.
32. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1989; 7: 762–8.
33. Sano T, Tsujino T, Yoshida K, et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51: 2926–31.
34. Uchino S, Tsuda H, Noguichi M, et al. Frequent loss of heterozygosity at the *DCC* locus in gastric cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 3099–102.
35. Hayden JD, Cawkwell L, Sue-Ling H, et al. Assessment of microsatellite alterations in young patients with gastric adenocarcinoma. *Am Cancer Soc* 1997; 79: 684–7.
36. Hsieh LL, Huang YC. Loss of heterozygosity of *APC/MCC* gene in differentiated and undifferentiated gastric carcinomas in Taiwan. *Cancer Lett* 1995; 96: 169–74.

Prispelo 9. 2. 1999