

POUŽITÍ JEDNO-NUKLEOTIDOVÝCH POLYMORFIZMŮ U ANALÝZY MNOHOČETNÉHO MYELOMU

USE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN MULTIPLE MYELOMA ANALYSIS.

SLANÝ M.¹, ŠVÁCHOVÁ H.^{1,2}, HÁJEK R.^{1,3,4}

¹UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

²ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

³LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

⁴INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn

Klasifikace nádorových onemocnění a identifikace terapeutických cílů pro jejich léčbu vyžaduje důkladnou znalost a popis genetických změn. Analýza single nukleotidových polymorfizmů je cenným nástrojem pro detekci a charakterizaci genetických variací u nádorových onemocnění. Účelem této práce je podat souhrnný přehled o metodách detekce SNP aplikovatelných na výzkum MM.

Klíčová slova: genomika, jedno-nukleotidové polymorfizmy, signální dráhy, mnohočetný myelom.

Summary

Tumor classification and identification of targets for therapeutic applications requires very good knowledge and description of genetic changes connected to an illness. SNP analysis seems to be a valuable tool for detection and characterisation of genetic variations in cancer. The aim of this review is to summarise methods usable for SNP detection and its applicability for MM research.

Keywords: genomics, single nucleotide polymorphisms, signalling pathways, multiple myeloma.

Úvod

Vznik nádorového onemocnění je složitý, mnohastupňový proces. Pro vznik onemocnění je nutné aby buňka prošla procesem maligní transformace za účasti mnoha faktorů. Nádorová buňka se oproti normální liší především nekontrolovanou schopností dělit se. Na regulaci buněčného cyklu se podílí velké množství genů. Narušení určitých genů může "odblokovat" kontrolní mechanizmy buněčného cyklu a způsobit nekontrolované dělení dané buňky. V nádorových buňkách tudíž nacházíme mutace v určitých genech. Dalším charakteristickým znakem nádorové buňky je přítomnost různých chromozómových aberací (21, 12, 27), přičemž některé mohou být úspěšně využity jako prognostické znaky u nádorových onemocnění jako je Chronická myeloidní leukémie nebo Mnohočetný myelom (8, 25). Genetické změny probíhající v nádorové buňce zahrnují různé změny jako je bodová mutace, malé delece/inzerce, delece části chromozómů, translokace, změny počtu kopií genů nebo ztráta heterozygosity (LOH). Jednou z možných aplikací metod molekulární biologie pro studium genetických změn u nádorových onemocnění je detekce jednobodových nukleotidových polymorfizmů (SNP). SNP analýza je nástroj, který byl primárně zamýšlen využívat pro detekci genetických polymorfizmů asociovaných s nemocí (14). S rozvojem čipových technologií se SNP analýza začala používat jako alternativní technika ke komparativní genomové hybridizaci (CGH) pro defino-

vání LOH a počtu změn kopií genů (7, 30). Široká aplikace CGH na téměř všechny typy nádorů nám v posledních letech poskytla detailní znalost chromozómní přestavby u rozmanitých nádorových onemocnění (2, 1, 26). S definicí LOH a změn počtu kopií genů byla SNP analýza zahrnuta do oblasti patologie nádorových onemocnění jako jsou chronická myeloidní leukémie (CML) nebo mnohočetný myelom (MM) (18, 30). Možnost Použití polymorfizmů specifických genů jako prognostických znaků pro predikci léčebné odpovědi v oblasti farmakogenomiky je další možností jak tuto oblast aplikovat do klinické praxe (22, 29, 5). Účelem této práce je poskytnout souhrnný přehled metod SNP detekce a možnost jejich aplikace na studium MM.

Teoretické základy SNP

SNP je sekvenční variace vyskytující se při záměně některého z nukleotidů (A,T,C nebo G) v primární sekvenci DNA za nukleotid jiný. Jako SNP je považována taková nukleotidová záměna, která se v populaci vyskytuje s četností větší než 1%, jinak se jedná o jednobodovou mutaci (4). Téměř 90% variability lidského genomu je právě způsobeno SNP. Jako nejčastější záměna byla popsána výměna cytosinu (C) za thymin (T), což lze vysvětlit velmi vysokou incidencí deaminace 5-metylcytosinu na thymin v dinukleotidech CpG. SNP se může vyskytnout jak na kódující (gen) tak nekódující oblasti genomu. Více jak 99%

přehled

Metoda	Výhody	současné omezení	reference
Čipové matrice	(i) prověření velké škály polymorfizmů	(i) Specifita určena hybridizací - není možno rozlišit všechny polymorfizmy - problém detekovat SNP na nízké úrovni (ii) Každý nový SNP vyžaduje přípravu nové matrice (iii) vyžaduje současně PCR amplifikaci	Ji et al., 2004 Dinas et al., 2005 Kors et al., 2006
Real-time PCR	(i) uzavřená reakce - eliminace kontaminace - nevyžaduje elektroforetickou separaci (ii) amplifikace cílového místa (iii) jednokroková amplifikace a detekce	(i) omezené použití multiplexních reakcí (ii) Specifika určena hybridizací - není možno rozlišit všechny polymorfizmy (iii) specifické podmínky pro PCR reakci	De La Vega et al., 2005 Vandsted et al., 2007 Hosono et al., 2008
Extenze primeru	(i) Aplikovatelné pro MALDI-TOF, Nevyžaduje použití značení	(i) není možno detekovat jedno-nukleotidové repetice, inserce a delece	Blondal et al., 2003
Invader essay	(i) Izotermální reakce nevyžadující PCR (ii) uzavřená reakce - eliminace kontaminace (iii) jednokroková amplifikace a detekce	(i) omezené použití multiplexních reakcí (ii) neschopná detekovat malé delece a inserce (iii) vyžaduje velmi čisté sondy pro zamezení kontaminace	Hosono et al., 2008
Oligonukleotidová ligázová reakce	(i) Vysokokapacitní multilexní vlastnosti (ii) Vysoká úroveň citlivosti a specifity (iii) Detekce všech variant bodových mutací a malých delecí a insercí	(i) nutnost provést PCR před nebo po ligačním kroku	Zhang et al., 2008

Tabulka č. 1: Srovnání používaných technik pro identifikaci známých mutací a polymorfizmů

Metoda	Výhody	současné omezení	reference
Sekvenace	(i) analýza všech změn primární struktury DNA do velikosti 600 bp / reakce (ii) velmi přesná	(i) omezená detekce mutací s malou četností v populaci (ii) citlivá na kontaminující DNA	Chadwick et al., 1996 Lijavetzky et al., 2007
SSCP	(i) detekce mutací s nízkou četností (ii) rapidní,	(i) nepostihne 30% možných mutací (ii) nespecifikuje umístění polymorfizmu (iii) nemusí detekovat mutaci blízko častého polymorfizmu	Hayashi et al., 1991
DGGE, DHPLC	(i) detekce mutací s nízkou četností (ii) rapidní	(i) testování velké škály změn nepostihne 13 % polymorfizmů (ii) nutno použít oligonukleotid s GC svorkou (iii) technicky náročné reprodukovat výsledky (iv) nespecifikuje umístění polymorfizmu	Hayes et al., 1999 Underhill et al., 1997
Sekvenčně Specifická PCR	(i) metodicky a finančně nenáročné	(i) omezené použití multiplexních reakcí	

Tabulka č. 2: Srovnání používaných technik pro identifikaci neznámých mutací a polymorfizmů

genomové DNA je v lidské populaci shodné. Ovšem, i tak malá variabilita DNA hraje významnou roli v celkové charakteristice lidského organismu, jak odpovídá na nemoci, léčbu nebo vliv prostředí. Právě tato skutečnost dělá SNP cennými pro biomedicínský výzkum, vývoj farmaceutických produktů nebo diagnostiku.

Genetický fond každého člověka obsahuje jedinečné SNP vzory tvořené různými genetickými variacemi. Bylo zjištěno, že většina SNP není odpovědná za vlastní onemocnění. Namísto toho slouží jako biologické markery pro specifikaci místa na lidské genomové mapě asociovaného s nemocí, neboť jsou zpravidla umístěny blízko genu identifikovaného jako původce onemocnění. Tento postup, často používaný v nepřímé diagnostice dědičných chorob, je založen na analýze vazebné nerovnováhy genů. Příležitostně může být přítomnost SNP vlastním původcem onemocnění, což nám umožní vyhledat a izolovat odpovědný

gen. V případě onemocnění, u kterého byl identifikován defektní gen, lze prověřit DNA izolovanou ze souboru zdravých a postižených pacientů na přítomnost různých SNP vzorů a pomocí asociační studie identifikovat SNP vzor charakteristický pro přítomnost nemoci. Většina SNP nemá vliv na funkci buňky, ale některé mohou způsobit predispozici člověka k nemoci nebo ovlivnit jeho odpověď na podaný lék. Pro přehlednější charakterizaci polymorfizmů v lidském genomu byla SNP konsorciem vytvořena podrobná mapa (<http://snp.cshl.org>).

Metody detekce SNP

Pro detekci polymorfizmů jsou dostupné různé metodiky. Většina technik pro detekci polymorfizmů je variací hybridizačních nebo enzymatických technologií. V literatuře lze nalézt několik souhrnných prací popisujících tyto metody (19, 16). Klasickou metodou využívanou v různých

obměnách je polymerázová řetězová reakce (PCR), přičemž nejčastěji používanou modifikací pro klinickou aplikaci je Real-Time PCR využívající fluorescenčně značené sondy. V dnešní době se biomedicinský výzkum v oblasti klinických aplikací preferenčně zaměřuje na kvantitativní analýzu SNP pomocí čipových technologií. Použití SNP čipů umožňuje v jednom běhu analyzovat vzorek na velké množství polymorfizmů umístěných na různých pozicích v genomu, což snižuje spotřebu vstupního materiálu a dobu analýzy. Nevýhodou jsou technické nároky na přípravu matrice čipů, drahé přístrojové vybavení a hlavně možnost analyzovat pouze identifikované polymorfizmy. Další metody použitelné pro analýzu známých polymorfizmů jsou uvedeny v Tabulce č.1. Identifikace nových polymorfizmů je možná pomocí klasicky používaných metodik molekulární biologie (viz. tabulka č.2).

Specifické nastavení u MM

Genomická analýza nám zatím v klinické praxi neumožňuje předpovědět vývoj nemoci nebo reakci pacienta na specifickou léčbu. Právě Aplikace SNP čipových technologií by mohla být jednou z možností, jak vyřešit problém nevhodné léčby u MM. Hlavními kritérii pro výběr vhodné metody pro detekci SNP jsou citlivost, specifita, požadavky metody na vzorek a cena. Pro klinické aplikace je také dalším kritériem rychlost metody. Jako vstupní materiál pro klinickou analýzu polymorfizmů se používá genomová DNA izolovaná z periferní krve, kostní dřeně nebo specificky separovaných CD138+ buněk. Vůdčím projektem zaměřeným na charakterizaci polymorfizmů u MM je Bank on a cure (<http://myeloma.org/>). SNP analýza v tomto projektu je zaměřena na identifikaci predispozice k MM, predikci léčebné nebo toxické odpovědi u stávajících léků (Velcade, Thalidomid) a výběr vhodných léků a jejich kombinací pro léčbu MM.

Specifické problémy u MM

Využití SNP analýzy u MM má doajista uplatnění v oblasti studia nádorových onemocnění. Právě přítomnost polymorfizmu na genomu člověka je jedním z faktorů, který způsobuje odlišnost lidských jedinců. V dnešní době je jistá oblast genomické analýzy MM zaměřena na měření hladiny exprese vytypovaných genů, aby bylo možno stanovit obecný model pro předpověď výsledného efektu po podání nějakého léčebného přípravku. Z tohoto pohledu je nutné vzít v potaz vliv polymorfizmů při studiu MM. Právě přítomnost polymorfizmu v genu podílejícím se na meta-

bolické nebo signální dráze podaného léku může způsobit rozdílný efekt u jedinců zařazených do stejné analytické skupiny. Hlavním omezením pro úspěšnou aplikaci SNP do klinické praxe je zatím nedostatečná znalost interakcí v genech asociovaných s MM.

Význam metody u MM stávající

Charakteristické nastavení analýzy SNP u MM závisí na požadavcích a stavbě studie. Obecně lze říci, že čipovou platformu je výhodnější použít pro genomickou analýzu u již známých polymorfizmů asociovaných s onemocněním. Tento přístup přispívá ke snížení množství vstupního materiálu pro analýzu, což je pro klinické aplikace podstatné. Je nutné si ovšem uvědomit, že zatím není stanoveno obecné schéma sloužící k predikci rozvoje nemoci a léčebné odpovědi. Je nutné vybrat skupinu polymorfizmů s prediktivními vlastnostmi, než dojde k jejich aplikaci na čipovou platformu. K tomuto procesu nám poslouží právě nízko kapacitní metody pro detekci SNP jako je sekvenace nebo Real-time PCR. Stávající nastavení detekce polymorfizmů u MM je prozatím na experimentální úrovni. Současné práce jsou zaměřeny na validaci SNP jako prognostických znaků u vybraných kandidátních genů. V Tabulce č.3. jsou uvedeny vybrané geny, u kterých byla popsána asociace polymorfizmu s MM.

Geny opravy DNA	Riziko vývoje MM	Odpověď na léčbu thalidomidem
ATM	GSTT1	CYP2C19
MRE11A	MTR	CYP3A5
XRCC4	TNF-1	TNF-1
NBS1	HPSE	CD3EAP
RAD50	MDR1	XRCC3
	IL1A	ERCC2
	IL1B	

Tabulka č. 3: Polymorfizmy v genech asociovaných s prognózou u MM. Vybraný soubor genů u kterých byla popsána asociace s MM.

Závěr

Právě studium DNA polymorfizmů nám pomůže v budoucnu pochopit rozdíl mezi jednotlivci ve schopnosti absorbovat nebo odstranit specifický lék, či specifikovat vliv genetické predispozice na vedlejší efekty léčby. Z tohoto důvodu se další studium SNP jeví, také jako schůdná cesta pro vývoj různých systémů aplikovatelných do preventivní a léčebné medicíny. Hlavní snahou je proto charakterizovat dostatečné množství genů s klinicky významnou výpovědní hodnotou u MM.

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

Literatura

- Albertson DG, Ylstra B, Segraves R et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet.* 2000; 25:144-146.
- Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC et al. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet A.* 2005; 134(3):259-67.
- Blondal T, Waage BG, Smarason SV et al. A novel MALDI-TOF based methodology for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(24):e155.
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 2003; 33 Suppl:228-37. Review.
- Buda G, Maggini V, Galimberti S et al. MDR1 polymorphism influences the outcome of multiple myeloma patients. *Br J Haematol.* 2007; 137(5):454-6.
- De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment

- of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. *Mutat Res.* 2005; 573(1-2):111-35.
7. Dutt A, Beroukhi R. Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer. *Curr Opin Oncol.* 2007; 19(1):43-9.
 8. Goldman J. Monitoring minimal residual disease in BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Curr Opin Hematol.* 2005; 12(1):33-9.
 9. Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1991; 1(1):34-8.
 10. Hayes VM, Wu Y, Osinga J et al. Improvements in gel composition and electrophoretic conditions for broad-range mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(20):e29.
 11. Hosono N, Kubo M, Tsuchiya Y et al. Multiplex PCR-based real-time invader assay (mPCR-RETINA): a novel SNP-based method for detecting allelic asymmetries within copy number variation regions. *Hum Mutat.* 2008; 29(1):182-9.
 12. Howarth KD, Blood KA, Ng BL et al. Array painting reveals a high frequency of balanced translocations in breast cancer cell lines that break in cancer-relevant genes. *Oncogene.* 2007 Dec 17 [Epub ahead of print]
 13. Chadwick RB, Conrad MP, McGinnis MD et al. Heterozygote and mutation detection by direct automated fluorescent DNA sequencing using a mutant Taq DNA polymerase. *Biotechniques.* 1996; 20(4):676-83.
 14. Irizarry K, Kustanovich V, Li C et al. Genome-wide analysis of single-nucleotide polymorphisms in human expressed sequences. *Nat Genet.* 2000; 26(2):233-6.
 15. Ji M, Hou P, Li S, He N, Lu Z. Microarray-based method for genotyping of functional single nucleotide polymorphisms using dual-color fluorescence hybridization. *Mutat Res.* 2004; 548(1-2):97-105.
 16. Kirk BW, Feinsod M, Favis R et al. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(15):3295-311.
 17. Korsching E, Agelopoulos K, Schmidt H et al. Improvements in the analysis strategy make single nucleotide polymorphism analysis a powerful tool in the detection and characterization of amplified chromosomal regions in human tumors. *Pathobiology.* 2006; 73(1):18-25.
 18. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood.* 2008; 111(6):2962-72.
 19. Kwok PY Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001; 2:235-58.
 20. Lijavetzky D, Cabezas JA, Ibáñez A et al. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC Genomics.* 2007; 8:424.
 21. Mehrotra B, George TI, Kavanau K et al. Cytogenetically aberrant cells in the stem cell compartment (CD34+lin-) in acute myeloid leukemia. *Blood.* 1995; 86(3):1139-47.
 22. Neben K, Mytilineos J, Moehler TM et al. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood.* 2002; 100(6):2263-5.
 23. Patiño-García A, Sotillo-Piñero E, Modesto C, Sierrasesúmag L. Screening of the human tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene promoter polymorphisms by PCR-DGGE analysis. *Mutat Res.* 1999; 406(2-4):121-5.
 24. Ribas G, González-Neira A, Salas A et al. Evaluating HapMap SNP data transferability in a large-scale genotyping project involving 175 cancer-associated genes. *Hum Genet.* 2006; 118(6):669-79.
 25. Smejkalová J, Vranová V, Oltová A et al. Comparison of standard prognostic factors with the deletion of 13q14 detected by interphase fluorescence in situ hybridization on separated and unseparated bone marrow cells in multiple myeloma. *Cas Lek Cesk.* 2005; 144(7):483-8.
 26. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20:399-407.
 27. Stallings RL. Origin and functional significance of large-scale chromosomal imbalances in neuroblastoma. *Cytogenet Genome Res.* 2007; 118(2-4):110-5.
 28. Underhill PA, Jin L, Lin AA et al. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.* 1997; 7(10):996-1005.
 29. Vangsted A, Gimsing P, Klausen TW et al. Polymorphisms in the genes ERCC2, XRCC3 and CD3EAP influence treatment outcome in multiple myeloma patients undergoing autologous bone marrow transplantation. *Int J Cancer.* 2007; 120(5):1036-45.
 30. Walker BA, Leone PE, Jenner MW et al. Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood.* 2006; 108(5):1733-43.
 31. Zhang H, Yang X, Wang K et al. On-chip oligonucleotide ligation assay using one-dimensional microfluidic beads array for the detection of low abundant DNA point mutations. *Biosens Bioelectron.* 2008; 23(7):945-951.