

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FYZIKÁLNÍ A MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE
NORMÁLNÍ A MUTANTNÍ DNA ZA
PODMÍNEK ČÁSTEČNÉ DENATURACE

RICHARD CHUDOBA

PRAHA 2007

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze pod vedením školitele Prof. RNDr. Bohuslava Gaše, CSc. a v laboratoři molekulární genetiky a onkologie, Genomac International, s.r.o. pod vedením školitele-konzultanta RNDr. Marka Minárika, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

V Praze dne 4. května 2007



Rád bych poděkoval svému školiteli Prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc. a školiteli-konzultantovi RNDr. Marku Minárikovi, Ph.D. za trpělivé vedení mé diplomové práce a Ing. Lucii Fantové a dalším zaměstnancům Genomac International, s.r.o. za cenné rady k experimentální práci. Děkuji své rodině a svým přátelům za podporu v průběhu celého vysokoškolského studia.

Abstract

This work investigates the separation of DNA heteroduplexes under the conditions of partial denaturation using capillary gel electrophoresis. The separation is modelled using nearest-neighbourhood approximation. Fragments of K-RAS oncogene with point mutations and of MDR1 gene with a single nucleotide polymorphism are used as systems samples. Optimal separation conditions are investigated experimentally. By direct comparison of theoretical and experimental data, relative mobilities of homoduplex and heteroduplex fragments can be interpreted.

Based on acquired information, transformation function is proposed for evaluating electropherograms in the multicapillary array. Transformed migration times are then used to generate a temperature map of multicapillary array.

These findings together help to understand the theoretical background of mutant DNA separation in CE in multicapillary arrays as well as in other systems.

Abstrakt

Práce se zabývá studiem separace heteroduplexů DNA za podmínek částečné denaturace metodou kapilární gelové elektroforézy. Pro teoretickou simulaci separačního procesu je použita approximace *nearest-neighbourhood*. Jako modelové systémy jsou použity vzorky mutací onkogenu K-RAS a jednonukleotidový polymorfismus genu MDR1, u kterého je provedena experimentální optimalizace pro nalezení optimálních separačních podmínek. Přímým porovnáním teoretických a experimentálních dat jsou vysvětleny vzájemné mobility homoduplexních a heteroduplexních fragmentů.

Na základě získaných poznatků je navržena transformační funkce pro vyhodnocování elektroferogramů z multikapilárního pole. Hodnoty transformovaných migračních časů jsou zpětně využity pro vytvoření teplotní mapy multikapilárního pole.

Zjištěné skutečnosti představují úvodní poznatky sloužící k pochopení teoretických principů separace mutantní DNA za podmínek částečné denaturace pomocí CE v kapilárních polích či jiných metod.

Obsah

1	Úvod	9
2	Literární rešerše	10
2.1	Úvod do problematiky genetických variací	10
2.1.1	Jednonukleotidové polymorfismy a mutace	10
2.1.2	MDR1	11
2.1.3	K-RAS	11
2.2	Vybrané metody detekce SNP a bodových mutací	11
2.2.1	DNA sekvenace dle Sangera	12
2.2.2	Heteroduplexní analýza	12
2.2.3	Denaturing High-Performance Liquid Chromatography	12
2.2.4	Single-strand conformation polymorphism	13
2.2.5	High resolution melting analysis	13
2.2.6	Denaturant gel electrophoresis	14
2.2.7	Denaturant capillary electrophoresis	16
2.3	Základy teplotní denaturace DNA	18
2.3.1	Nevazebné interakce v DNA	18
2.3.2	Nearest-neighbourhood approximace	19
2.3.3	Způsoby znázornění tání duplexů	20
2.3.4	Termodynamická data homo- a heteroduplexů	20

OBSAH	6
2.3.5 Vliv koncentrace iontů na termodynamickou stabilitu homoduplexů	21
3 Cíle práce	22
4 Instrumentace a metodika	23
4.1 Přístroje a zařízení	23
4.1.1 MegaBACE 1000	23
4.1.2 Teplovýměnka PT232 s Pt čidlem	23
4.2 Chemikálie a vzorky	24
4.2.1 Fragment MDR1	24
4.2.2 Fragment K-RAS	24
4.3 Metodika	25
4.4 Software	25
5 Výsledky	26
5.1 Výpočty termodynamických parametrů dle modelu nearest-neighbourhood	26
5.2 Teoretická studie modelových systémů	30
5.2.1 Případ jednonukleotidové záměny (polymorfismu MDR1)	30
5.2.2 Případ vícenukleotidové záměny (mutace K-RAS)	32
5.3 Elektromigrační charakteristiky zvolených fragmentů	36
5.3.1 Teplotní optimalizace separace MDR1 systému	36
5.3.2 Normalizace elektroferogramů v multikapilárním poli	38
5.3.3 Vlastnosti temperovaného prostoru kapilárního pole	42
5.3.4 Teplotní mapa kapilárního pole	42

<i>OBSAH</i>	7
6 Diskuse	47
6.1 Termodynamické parametry mutací při heteroduplexní analýze	47
6.2 Pořadí píků při heteroduplexní analýze	48
6.3 Teplotní optimalizace separace MDR1 systému	50
6.4 Transformační funkce a teplotní mapa kapilárního pole	50
7 Závěr	52

Seznam zkratek

a.u.	libovolná jednotka
bp	pár bází
CDCE	Constant Denaturant Capillary Electrophoresis
CDGE	Constant Denaturant Gel Electrophoresis
CE	kapilární elektroforéza
CGCE	Cycling Gradient Capillary Electrophoresis
DCE	Denaturant Capillary Electrophoresis
DGE	Denaturant Gel Electrophoresis
DGGE	Denaturating Gradient Gel Electrophoresis
DHPLC	Denaturing High-Performance Liquid Chromatography
dsDNA	dvojvláknová DNA
HM	homoduplex
HT	heteroduplex
PCR	Polymerase Chain Reaction
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
ssDNA	jednovláknová DNA
RI-DFT-D	Resolution of Identity Density Functional Theory Augmented with an Empirical Dispersion Term
TEAA	triethylammonium acetát
TTGE	Temporal Temperature Gradient Electrophoresis
WT	normální typ / homoduplex normální DNA

Kapitola 1

Úvod

Sekvenace lidského genomu otevřela cestu k diagnostice dědičných chorob a včasné diagnostice a sledování progrese závažných onemocnění pomocí testování DNA na přítomnost genetických variací (např. mutací nebo jednonukleotidových polymorfismů SNP). Příkladem je karcinom tlustého střeva, kde byla prokázána řada DNA poruch onkogenů a tumor-supresorových genů.

Za standardní a téměř univerzální způsob mutační analýzy a SNP screeningu se považuje přímá DNA sekvenace. Její nevýhodou je nízká citlivost, pokud se mutantní DNA vyskytuje ve vzorku spolu s nadbytkem normální DNA, což je častý případ při testování vzorků tkání, např. biopsíí odebraných z tumorů. Nelze opomenout ani poměrně vysoké náklady. Za účelem zvýšení citlivosti a snížení nákladů byla vyvinuta řada alternativních metod pro mutační analýzu.

Metody založené na separaci normální a mutantní DNA v důsledku rozdílů v jejich denaturaci mají velký potenciál. Umožňují s vysokou citlivostí spolehlivě zachytit i nízké koncentrace mutantní DNA. Kvůli chybějícímu teoretickému modelu však dosud nejsou některé experimentální problémy vyřešeny, což brání širšímu nasazení těchto metod v klinické praxi. Nalezení takového teoretického modelu je hlavním cílem předkládané práce.

Kapitola 2

Literární rešerše

2.1 Úvod do problematiky genetických variací

2.1.1 Jednonukleotidové polymorfismy a mutace

Jednonukleotidové polymorfismy (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) představují nejčastější formu vrozené genetické variace lidského genomu. Jedná se vrozené o záměny (substituce) nukleotidů, které lze nalézt v kódujících (exonech) i nekódujících (intronech) částech genů. Od vrozených bodových mutací se liší tím, že většinou nemění aminokyselinovou sekvenci kódovaného proteinu, a jejich funkční důsledek proto není vždy zcela zřejmý. Často se vyskytuje v regulačních regionech, např. v místech vazeb transkripčních faktorů, čímž ovlivňuje genovou expresi. Dalším kritériem, vymezujícím SNP oproti DNA mutacím, je jejich častý výskyt v obecné populaci, který musí být alespoň 1%.

Bodové mutace představují změnu (substituci, deleci či inserci) jednoho nukleotidu v DNA, která vede ke změně aminokyselinové sekvence kódovaného proteinu. Zmutovaný protein bývá často nefunkční nebo neregulovatelný. Mutace lze dělit na vrozené (zárodečné, např. u syndromu cystické fibrózy) a získané (např. v důsledku působení záření nebo chemických karcinogenů). Vrozené mutace lze detektovat v kterémkoliv buňce těla (nejčastěji v krevních buňkách – lymfocytech), zatímco získané mutace se nacházejí pouze v poštižené tkáni (tumoru).

2.1.2 MDR1

Human multidrug-resistance gene (MDR1, též ABCB-1) kóduje intermebránový P-glykoprotein. Tento protein funguje jako membránový přenášeč, který aktivně čerpá xenobiotika z buňky. Jeho substrátová specifita je poměrně široká. Podílí se na odčerpávání celé řady léčiv (např. chemoterapeutik), což ovlivňuje jejich terapeutické účinky a způsobuje obtíže při léčbě rakoviny [13].

Nedávné studie odhalily řadu nukleotidových polymorfismů genu MDR1 [24]. U několika z nich byla vysledována závislost se změněnou funkční aktivitou P-glykoproteinu. Jedním z nejvýznamnějších je polymorfismus C3435T, který se nalézá v exonu 26, u kterého byla přímo prokázána změna substrátové specificity [27].

2.1.3 K-RAS

Gen K-RAS kóduje malý regulační G-protein p21Ras. Aktivovaný protein p21Ras zahajuje kinázovou kaskádu. Kinázy této kaskády se podílejí na regulaci metabolických dějů buňky či na aktivaci transkripčních faktorů nutných pro dělení buňky [19].

Bodové mutace v kodonech 12, 13 a 61 genu K-RAS zapříčinují permanentní aktivaci proteinu p21ras, což vede ke stálé růstové stimulaci buňky a následnému nekontrolovanému dělení, které končí vznikem tumoru. Nejčastěji se mutace objevuje v buňkách slinivky, tlustého střeva a plic [14].

2.2 Vybrané metody detekce SNP a bodových mutací

Následující metody jsou vhodné k detekci SNP a bodových mutací ve fragmentech DNA o délce řádově 100 bp. Vybrány byly především metody, které jsou založeny na termodynamické stabilitě DNA nebo na tvorbě sekundárních struktur [16, 21]. DNA sekvenace dle Sangera byla popsána jako srovnávací etalon ostatních metod.

2.2.1 DNA sekvenace dle Sangera

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors je název metody vyvinuté F. Sangerem pro elektroforetické sekvenování DNA [36]. Základem metody je provedení polymerasové řetězcové reakce (PCR) ve směsi, která obsahuje vedle deoxyribonukleotidů i dideoxyribonukleodity. Dideoxyribonukleotid inhibuje další prodlužování řetězce polymerasou při PCR. Směs fragmentů DNA se pak v gelu elektroforeticky separuje podle délky fragmentů. Původně se používaly dideoxyribonukleotidy radioaktivně značené ^{32}P a fragmenty DNA se separovaly plošnou gelovou elektroforézou. Nyní se používají fluorescenčně značené dideoxyribonukleotidy a elektroforetická separace probíhá v kapilárách [5].

2.2.2 Heteroduplexní analýza

Úsek DNA s výskytem bodové mutace se amplifikuje metodou PCR. Produkty PCR se následně zahřejí na teplotu 94 °C a postupně ochladí na 50 °C. Jsou-li ve vzorku přítomna podobná vlákna DNA lišící se v jednom či několika málo párech bází, vzniknou tímto postupem heteroduplexy. S tím se setkáme například u heterozygotních bodových mutací. Směs duplexů se následně separuje metodou gelové elektroforézy [30].

2.2.3 Denaturing High-Performance Liquid Chromatography

Metoda *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography* (DHPLC) [46] umožňuje detekci SNP či bodových mutací na základě různých retenčních časů při separaci homo- a heteroduplexů DNA. Separace probíhá v uspořádání iontově-párové chromatografie při teplotě částečné tepelné denaturace analyzovaných fragmentů DNA. Kolona obsahuje jako stacionární fázi porézní poly(styren-divinylbenzen). Mobilní fáze je složena z vody a organického rozpouštědla (např. acetonitrilu), a dále obsahuje iontově-párové činidlo (např. triethylammonium) spolu s malým protiontem (např. acetátem). V průběhu separace se postupně zvyšuje podíl organického rozpouštědla v mobilní fázi, což vede k postupné desorpci TEAA-DNA komplexů jednotlivých homo- a heteroduplexních forem ze stacionární fáze a tím i k jejich separaci.

Afinita komplexů s dsDNA ke stacionární fázi je způsobena nepolární interakcí. Celková retence dsDNA je dána počtem párů bází ve dvojšroubovici. Při separaci ssDNA hrají mnohem důležitější roli solvofobní interakce, separace proto více závisí na zastoupení a sekvenci bází než na délce vláken. Při teplotách, kdy dochází k částečné denaturaci (částečnému rozpletení) DNA, se uplatňují vlastnosti jak dsDNA, tak ssDNA.

Retenční časy při DHPLC jsou nejkratší pro heteroduplexy a vzrůstají s rostoucí teplotou tání dvojšroubovice. Detekce se obvykle provádí fluorescenčně, případně UV detektorem.

2.2.4 Single-strand conformation polymorphism

Metoda *Single-strand conformation polymorphism* (SSCP) [31] je založena na empirické skutečnosti, že i jednovlákновá DNA zaujímá v roztoku za jistých podmínek definovanou sekundární strukturu. Sekundární struktura je ovlivněna zejména teplotou, pH a složením pufru. Obecně platí, že nízké pH a teplota ji lépe zachovávají.

Záměna jednoho nukleotidu může tuto sekundární strukturu ovlivnit, takže fragmenty s různou sekvencí v místě SNP či bodové mutace se oddělí během gelové elektroforézy v nedenaturujícím prostředí v důsledku rozdílných hodnot efektivních průměrů.

Separace při SSCP byla původně prováděna plošnou gelovou elektroforézou. Nyní lze separaci provádět i pomocí kapilární gelové elektroforézy s fluorescenční detekcí. Při PCR reakci lze použít primery značené různými fluorescenčními značkami, takže lze snadno odlišit 5'-3' a 3'-5' vlákno.

2.2.5 High resolution melting analysis

Tato metoda je založena na měření závislosti helicity (míry spárování dvou vláken) dvojšroubovice fragmentu DNA na teplotě [20, 44, 47]. Obvykle i záměna jednoho nukleotidu ve fragmentu dvojšroubovice DNA ovlivní jeho termodynamickou stabilitu.

Při metodě se měří fluorescence vzorku obsahující interkalovanou fluorescenční značku* v závislosti na teplotě. Výsledkem jsou hysterezní křivky

*obvykle SYBR Green či LC Green

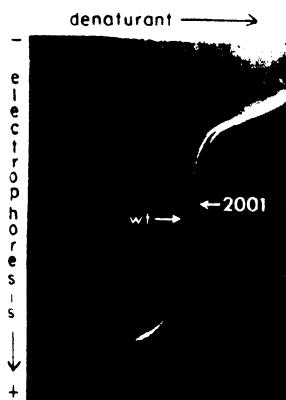
tání, které se po normalizaci intenzity fluorescence obvykle vyhodnocují v differenciálním tvaru. Na základě srovnání tvaru křivek a poloh inflexních bodů se standardním (známým) vzorkem je tedy možné určit sekvenci v místě polymorfismu či mutace.

Pokud má homoduplex s mutací téměř totožnou teplotu tání jako homoduplex normálního typu, lze citlivost metody zvýšit vytvořením heteroduplexů. Ke vzorku se přidá DNA normálního typu a směs se zahřeje. V případě, že vzorek obsahuje mutantní DNA, vzniknou heteroduplexy, které výrazným způsobem změní křivku tání analyzovaného vzorku.

2.2.6 Denaturant gel electrophoresis

Elektroforéza v denaturujícím gelu (DGE) představuje rodinu metod, které jsou založeny na elektromigračním dělení v důsledku změny termodynamické stability dvojšroubovice DNA po záměně jediného páru bází. Společným rysem této skupiny metod je migrace částečně denaturované DNA v gelu, přičemž mobilita fragmentu dvojšroubovice DNA velmi závisí na jeho aktuální helicitě – cím je helicita fragmentu DNA menší, tím menší je jeho mobilita, vizte obrázek 2.1. Výjimkou jsou fragmenty s nulovou helicitou, kdy se v důsledku nadměrné denaturace původní dvojšroubovice DNA rozpadne na samostatná vlákna, která se dále pohybují bez dalšího zadržování v gelu s mobilitou vyšší než v případě částečně denaturované dvojšroubovice. Délka fragmentu DNA vhodného pro DGE se pohybuje v rozmezí 100 až 300 párů bází [6].

Metody založené na denaturační elektroforéze jsou obecně použitelné jen pro detekci těch mutací, které se nacházejí v termodynamicky méně stabilní oblasti analyzovaného fragmentu DNA [45]. Pokud by se mutace nacházela v termodynamicky stabilnější části, bude při podmínkách částečné denaturace stabilnější části zcela denaturována méně stabilní část, což zapříčiní, že se mobility duplexů nebudou takřka lišit. Rovněž hrozí nebezpečí úplného rozpletení vláken dvojšroubovice. Pro překonání zmíněného omezení a rozšíření použitelnosti těchto metod bývá často použita metoda spojení vláken dvojšroubovice GC-svorkou (*GC-clamp*). GC-svorka je úsek DNA o délce přibližně 40 párů bází bohatý na guanin a cytosin, který se k analyzovanému fragmentu DNA obvykle připojuje při PCR (jeden primer je na 5' konci



Obrázek 2.1: Vliv míry denaturace dvojšroubovice DNA na její mobilitu; gel obsahuje vodorovný gradient denaturantu, podél horní hrany gelu byl rovnoměrně nanesen vzorek obsahující normální a mutantní typ a poté byla spuštěna elektroforéza ve svislém směru, po skončení elektroforézy byly polohy fragmentů DNA visualizovány (převzato z [18])

prodloužen o GC-svorku), nebo ligací k hotovým PCR produktům [6]. Fragmenty DNA spojené GC-svorkou mají hladší profily termodynamické stability u domén, které sousedí s GC-svorkou, což je pro elektroforetickou separaci žádoucí [39] (vizte dále).

Poprvé byla myšlenka elektroforézy DNA v částečně denaturujícím prostředí popsána v práci Fischera a Lermana [18], kteří úspěšně separovali fragmenty DNA v plošném polyakrylamidovém gelu, jenž obsahoval gradient močoviny jako denaturant. Metodu nazvali *denaturating gradient gel electrophoresis* (DGGE).

Místo tohoto klasického uspořádání s gradientem chemického denaturantu lze k denaturaci použít i gradient teplotní, který má na dvojšroubovici DNA podobný účinek. Metoda využívající časové změny teploty se nazývá *temporal temperature gradient electrophoresis* (TTGE) [8].

Při použití chemického nebo teplotního gradientu dochází k částečnému tání DNA, a tedy i separaci pouze v úzkém rozmezí denaturačních podmínek. Při vhodně zvolené konstantní teplotě lze tedy dosáhnout lepších výsledků separace, neboť separace probíhá po celou dobu za podmínek, kdy mají fragmenty navzájem odlišnou hodnotu aktuální mobility. Takové uspořádání se nazývá *constant denaturant gel electrophoresis* (CDGE) [8].



Obrázek 2.2: Analýza DNA technikou DGGE; na gelu jsou patrné dvojice proužků patřící homoduplexům (na obrázku níže) a heteroduplexům (na obrázku výše) (převzato od Genomac International)

Jestliže je teplota tání homoduplexů normálního a mutantního typu té měř totožná, lze stejně jako v případě *high resolution melting analysis* použít přídavku DNA normálního typu a sledovat, zda se tvoří heteroduplexy, čímž se citlivost metody podstatně zvýší.

2.2.7 Denaturant capillary electrophoresis

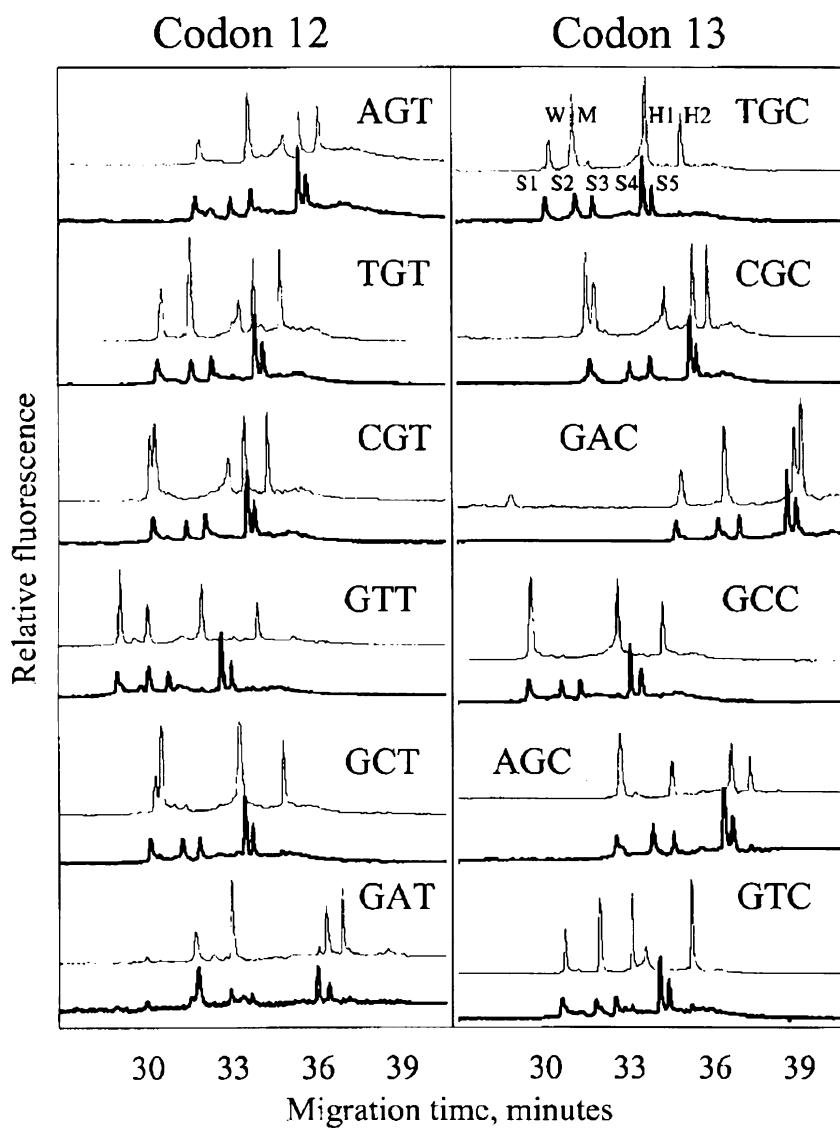
Poslední desetiletí jsou v experimentální molekulární biologii a genetice ve znamení přechodu od klasické gelové elektroforézy k metodám kapilární elektroforézy [25].

Jako separační matrice se při DCE metodách používá lineární (nezesítovaný) polyakrylamidový gel v kapilárách. Pory důležité pro separaci vznikají v gelu nahodile v důsledku splétání a rozplétání vláken polyakrylamidu [32]. DNA je stejně jako při DGE denaturována teplotou, případně teplotou a chemickým denaturantem [6]. K detekci se využívá fluorescenční značka navázaná na konec vlákna dvojšroubovice (obvykle na GC-svorku).

Kapilárním analogem metody CDGE je *constant denaturant capillary electrophoresis* (CDCE) [26]. Při použití multikapilárního přístroje, kde se teplota může mezi kapilárami lišit, lze namísto držení konstantní teploty s teplotou v úzkém rozsahu kolem optimálních podmínek cyklovat, pak se hovoří o *cycling gradient capillary electrophoresis* (CGCE) [28]. Tyto metody byly použity v celé řadě klinických aplikací [28, 29].

Dalším příkladem úspěšného použití metody DCE je separace fragmentu DNA obsahující mutace v kodonech 12 a 13 genu K-RAS [7, 9] (obrázek 2.3).

S rozvojem mikročipových separačních technik se objevují snahy přenést heteroduplexní analýzu i na tuto platformu [22].



Obrázek 2.3: Elektroferogramy separace různých mutací K-RAS v kodonu 12 a v kodonu 13 metodou DCE (převzato z [7])

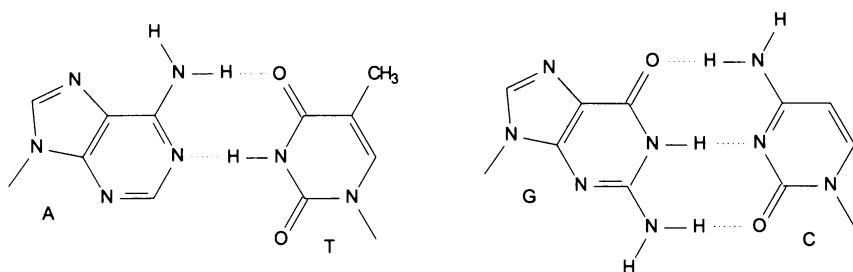
2.3 Základy teplotní denaturace DNA

2.3.1 Nevazebné interakce v DNA

Párování vláken DNA do dvojšroubovice popisuje model Watsona a Cricka [43]. Jeho základem jsou vodíkové interakce mezi komplementárními bázemi (C/G a A/T). Dalším efektem, který přispívá ke stabilizaci dvojšroubovice, jsou patrové interakce mezi purinovými a pyrimidinovými jádry. Patrové interakce vznikají jednak mezi bázemi komplementárních vláken (*interstrand stacking*), tak mezi bázemi téhož vlákna (*intrastrand stacking*).

Při použití metod výpočetní chemie (*Resolution of Identity Density Functional Theory Augmented with an Empirical Dispersion Term*, RI-DFT-D) se ukazuje, že při párování dvou vláken DNA je pokles Gibbsovy energie způsobený vodíkovými interakcemi přibližně dvojnásobný než pokles Gibbsovy energie v důsledku patrových interakcí [23]. Metoda RI-DFT-D dále předpovídá, že při vzniku dvojšroubovice je pokles Gibbsovy energie způsobený patrovými interakcemi v přepočtu na jeden pár bází přibližně konstantní. V závislosti na sekvenci DNA se mění pouze poměr energie připadající na vnitrovláknový a mezivláknový stacking.

V případě, že pár bází není komplementární dle Watsona a Cricka, je tento pár rovněž stabilizován vodíkovými a patrovými interakcemi. Možnost vzniku vodíkových interakcí a tím termodynamická stabilita je např. u páru A-C velmi závislá na pH [2].



Obrázek 2.4: Znázornění vodíkových interakcí mezi adeninem a thyminem a guaninem a cytosinem, jak je určili Watson a Crick [43]

5'-ATCGTGA-3'
 3'-TAGCACT-5'

Obrázek 2.5: Znázornění *nearest-neighbourhood* páru – označen je pář GT/CA; sekvence obsahuje následující *nearest-neighbourhood* páry: AT/TA, TC/AG, CG/GC, GT/CA, TG/AC a GA/CT

2.3.2 Nearest-neighbourhood approximace

Při klasických termodynamických výpočtech se používá *nearest-neighbourhood* approximace založená na předpokladu, že velikost příspěvku páru báze k termodynamickým veličinám je ovlivněna (i) druhem páru (A-T, G-C) a (ii) bezprostředně předcházejícím párem (případně koncem dvojšroubovice). Výsledkem *nearest-neighbourhood* approximace je 10 lineárně nezávislých páru dvojic bází spárovaných dle Watsona a Cricka.

Nejjednodušší modely založené na této approximaci [38] uvažují výhradně interakce mezi sousedními páry bází, ke kterým příčítají termodynamický příspěvek dvou krajních páru bází. Jako takové jsou validní pouze pro oligonukleotidy DNA, ve kterých tání probíhá jako dvoustavový proces.

Přesnější modely uvažují vznik domén tvořených dvojšroubovicí a domén tvořených klubkem či smyčkou, jak popisuje např. práce Polanda a Scheraga [34, 35]. Mikrostav fragmentu DNA je popsán vektorem \mathbf{p} , který na i -té pozici obsahuje 0 v případě nespárovaného i -tého páru bází (smyčka či klubko) a 1 pro spárovaný i -tý pár bází (dvojšroubovice). Vedle *nearest-neighbourhood* approximace tento model definuje entropický člen smyček pro interakci dalekého dosahu. K tání DNA v tomto modelu dochází vznikem smyček uprostřed fragmentu či stužek na jeho okrajích.

Od statisticko-termodynamického přístupu Polanda a Scheregy byly postupně odvozovány další modely. Jedním z posledních je tzv. „*stitchprofiles*“ [42]. Při výpočtu tento model přisuzuje různé statistické váhy stavům, kdy se pár bází vyskytuje jako izolovaný pár, pár ukončující dvojšroubovici či pár obklopený páry bází (ve smyslu *nearest-neighbourhood*). Statistická váha těchto stavů závisí na teplotě, což vyžaduje znalost termodynamických dat sousedních páru bází. Smyčky jsou reprezentovány entropickým členem [12].

Předchozí modely předpokládaly, že se mohou párovat pouze báze, které si odpovídají pořadím v komplementárním vláknu, což nebývá splněno např.

pro RNA. Za tímto účelem byly vyvinuty dvojrozměrné modely, kterými se však více nebudu zabývat.

2.3.3 Způsoby znázornění tání duplexů

Základním způsobem znázornění tání fragmentu dvojšroubovice DNA je *pravděpodobnostní profil* (obrázek 5.2 v kapitole 5.2). Tento profil představuje grafické znázornění vektoru \mathbf{p} makrostavu statisticko-termodynamického modelu při zvolené teplotě. Jinými slovy ukazuje, s jakou pravděpodobností je daný pár bází při zvolené teplotě skutečně spárováný (míru helicity Φ).

Alternativou je opačný přístup. Tedy zjišťování teploty příslušející zvolené helicitě každého páru bází. Pokud se zvolí helicita $\Phi = 0,5$, získá se tímto způsobem *teplotní profil* (obrázek 5.1 v kapitole 5.2).

Vyčerpávajícím popisem tání dvojšroubovice DNA jsou diagramy *stitch profiles*, které vycházejí přímo ze statisticko-termodynamického modelu a ukazují, s jakou pravděpodobností vznikne mezi dvěma místy smyčka, nebo budou spojeny dvojšroubovicí [40]. Jejich použití má však význam až u delších fragmentů DNA, které obsahují několik teplotních domén.

2.3.4 Termodynamická data homo- a heteroduplexů

Termodynamická data potřebná pro algoritmy využívající approximaci *nearest-neighbourhood* byla získána měřením teplot tání oligomerů DNA.

V práci Doktyzce et al. [17] byla experimentálně měřena teplotní stabilita homoduplexních oktamerů 5'-GTCXYZGC-3', kde XYZ představuje měnící se tripletní sekvenci bází. Hodnoty standardních Gibbsových energií tvorby duplexů ΔG° a teplot tání T_m byly získány pro všech 128 variací.

V sérii článků Allawiho a SantaLucii [1–4, 33] byla zkoumána teplotní stabilita různých heteroduplexů o délce 9–16 párů bází. Na základě *nearest-neighbourhood* approximace byla získána termodynamická data (ΔH° , ΔS° , ΔG_{37}°).

Blake a Delcourt [11] měřili termodynamické vlastnosti polymerních DNA s různými repetitivními sekvencemi, kterou syntetizovali v plasmidech. Na základě statistické analýzy určili termodynamická data (ΔH° , ΔS°) pro *nearest-neighbourhood* páry.

2.3.5 Vliv koncentrace iontů na termodynamickou stabilitu homoduplexů

Termodynamická data uvedená v předchozích článcích jsou platná při iontové síle, která odpovídá koncentraci $[Na^+] = 1 \text{ mol dm}^{-3}$. Iontová síla elektroforetických pufrů však bývá podstatně slabší, proto je nutné data přepočítat. Empirický vztah (2.1), který popisuje závislost standardní Gibbsovy energie vzniku dvojšroubovice na koncentraci Na^+ , byl odvozen na základě dat získaných při měření termodynamické stability oligonukleotidů DNA v prostředí s různou iontovou silou [37].

$$\Delta G_{37}^\circ([Na^+]) = \Delta G_{37}^\circ(1M \text{ NaCl}) - 0,114 \text{ kcal mol}^{-1} \cdot N \cdot \ln[Na^+] \quad (2.1)$$

Proměnná N představuje počet fosfátových skupin v jednom řetězci dvojšroubovice oligonukleotidu (např. pro oligomer o délce 8 párů bází $N = 7$). Za předpokladu nezávislosti entalpického členu na koncentraci soli má korekce entropického členu tvar

$$\Delta S^\circ([Na^+]) = \Delta S^\circ(1M \text{ NaCl}) + 0,368 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \cdot N \cdot \ln[Na^+]. \quad (2.2)$$

Kapitola 3

Cíle práce

1. Aplikovat model *nearest-neighbourhood* na případ separace homoduplexních a heteroduplexních forem DNA metodou založenou na DCE
2. Interpretovat pořadí píků a vzájemné rozdíly mezi migračními časy píků na elektroferogramu při analýze metodou DCE
3. Optimalizovat heteroduplexní analýzu MDR1 fragmentu metodou DCE
4. Nalézt metodu pro standardizaci elektroferogramů z multikapilárního pole při použití metotody DCE
5. Zmapovat aktuální teploty v multikapilárním poli

Kapitola 4

Instrumentace a metodika

4.1 Přístroje a zařízení

4.1.1 MegaBACE 1000

Při experimentech byl použit přístroj MegaBACE 1000 od firmy Amersham Bioscience (nyní GE Healthcare). Jedná se o 96 kapilárový přístroj uzpůsobený k dávkování vzorků ze standardní mikrotitrační destičky o 8×12 jamkách. Kapiláry jsou uspořádány do šesti polí po šestnácti kapilárách tak, že dvě po sobě jdoucí řady kapilár tvoří pole. V dalším textu budou sloupce značeny písmeny (A–H) a řady čísla (1–12). Katoda je samostaná pro každou kapiláru, anoda je společná pro všechny kapiláry tvořící pole. Délka každé kapiláry je 600 mm, vzdálenost k detektoru je 400 mm. Vnitřní průměr kapilár je 75 μm . Kapiláry mají vnitřní povrch potažen (*coated*) lineárním polyakrylamidem pro potlačení elektroosmotického toku [15]. Prostor mezi kapilárami je temperován proudícím horkým vzduchem. Detekce je prováděna na bázi laserem-indukované fluorescence při vlnové délce 520 nm po exitaci argonovým laserem o vlnové délce 488 nm.

4.1.2 Teploměr PT232 s Pt čidlem

Pro sledování teploty v temperovaném prostoru byl použit teploměr typu PT232 vyrobený firmou Papouch s.r.o. K němu bylo čtyřvodičově připojeno

nezapouzdřené platinové čidlo Pt 100 dodané firmou JSP s.r.o. pod katalogovým číslem T1027. Spolehlivost čidla byla ověřena porovnáním se zapouzdřeným okalibrovaným Pt 100 čidlem dodaným toutéž firmou pod katalogovým číslem T10272. Teplomér dokáže zaznamenávat teplotu s přesností $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ v rozsahu -50 až $+400\text{ }^{\circ}\text{C}$, čidlo je uzpůsobeno k měření v rozsahu -40 až $+180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2 Chemikálie a vzorky

4.2.1 Fragment MDR1

Sekvence používaného MDR1 fragmentu včetně GC-svorky je uvedena na obrázku 4.1. Primery byly navrženy v laboratoři molekulární genetiky a onkologie, Genomac International, kde byla rovněž provedena amplifikaci klinického vzorku metodou PCR. Produkty PCR byly značeny na 3' konci GC-svorky fluorescenční značkou FAM (karboxylfluorescein).

```
GAGAACATTG CCTATGGAGA CAACAGCCGG GTGGTGTAC AGGAAGAGAT
CGTGAGGGCA GCAAAGGAGG CCAACATACA TGCCTTCATC GAGTCACTGC
CTAATGTCGG GCGGGGGCGG CGGGACGGGC GCGGGGCGCG GCGGGCG
```

Obrázek 4.1: Sekvence MDR1 fragmentu použitého při experimentech. Místo výskytu SNP je vyznačeno podtržením, GC-svorka je označena modře, sekvence odpovídající primerům zeleně

4.2.2 Fragment K-RAS

Sekvence K-RAS fragmentu včetně GC-svorky, který byl analyzován metodou DCE v článcích [9] a [7], je uvedena na obrázku 4.2.

```
ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGGCG TAGGCAAGAG
TGCCTTGACG ATACAGCTAA TTCAGAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC
CAACAATAGA GGCGGGCGGG GGCAGGCGGG CGGGCGCGGG GCGCGGCCGG CG
```

Obrázek 4.2: Sekvence K-RAS fragmentu použitého v [7]. Místa výskytu mutací jsou vyznačena podtržením, první dvě mutace jsou v kodonu 12 (GGT), další dvě v kodonu 13 (GG), GC-svorka je označena modře, sekvence odpovídající primerům zeleně

4.3 Metodika

Elektroforetická separace probíhala v lineárním polyakrylamidovém gelu „GMC-MTRX“ od firmy Genomac International. Gel obsahuje jako denaturant močovinu o koncentraci 7 mol dm^{-3} . Pro separaci byl použit pufr „GMC-MBBUFF“ od firmy Genomac International ($\text{pH} = 7,63$, $I = 26 \text{ mmol dm}^{-3}$, koncentrace kationických forem $c^{+1} = 23 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Kapiláry byly naplněny gelem pod tlakem 1000 psi. Následuje 300sekundový běh pouze s pufrem při napětí 10 kV (prerun). Vzorek byl dávkován elektrokineticky při napětí 3,0 kV po dobu 120 s. Separace probíhá při konstantním napětí 8,0 kV, čemuž odpovídá proud přibližně $7 \mu\text{A}$.

Teplota byla měřena teploměrem PT232 a není-li v textu uvedeno jinak, čidlo bylo umístěno v temperovaném prostoru přístroje MegaBACE 1000 uprostřed vzdálenější strany kapilárního pole (řada 12) na straně katody. Toto místo bylo zvoleno vzhledem k snadné opakovatelnosti umístění čidla.

4.4 Software

Pro výpočet teplotních profilů a profilů helicit byla použita webová aplikace <http://stitchprofiles.uio.no> [41]. Při výpočtech byla volena sada termodynamických dat „Blossey and Carlon 2003“ a koncentrace iontů Na^+ 23 mmol dm^{-3} .

Zpracování binárních souborů s elektroferogramy bylo provedeno dvěma vlastními programy napsanými v jazyce C. První program určí polohu píku primeru, provede transformaci (kapitola 5.3.2) a data uloží ve stejném binárním formátu. Druhý program umožňuje převést údaje uložené v binárních souborech na textová data.

Statistické analýzy rozložení migračních časů a transformovaných migračních časů byly počítány aplikací NCSS (<http://www.ncss.com>). Byly využívány funkce popisné statistiky a lineární korelace.

Kapitola 5

Výsledky

5.1 Výpočty termodynamických parametrů dle modelu nearest-neighbourhood

Stabilitu homoduplexů a heteroduplexů, které se liší pouze v jednom páru bází na stejném místě (výskyt SNP či bodové mutace), lze porovnat pomocí jednoduchého *nearest-neighbourhood* modelu. Jediným předpokladem je, aby se změnou páru bází nezměnila délka teplotní domény, neboť ta odpovídá délce smyčky, která vznikne jejím roztátkem (vizte kapitolu 2.3.2). Pokud by nebyla tato podmínka splněna, nešlo by takto jednoduchý model použít, neboť jiná délka smyčky znamená i jinou hodnotu entropického příspěvku (*loop entropy factor*), což nelze v jednoduchém *nearest-neighbourhood* modelu postihnout.

Základní jednotkou modelu je triplet bází, který je spárován s komplementárním tripletem. Krajní páry bází jsou vždy spárovány dle Watsona a Cricka, zatímco prostřední pár je spárován dle Watsona a Cricka pouze v případě homoduplexů, kdežto v případě heteroduplexů nikoliv.

Hodnotu standardní Gibbsovy energie tvorby duplexů, která připadá na jednotlivé tripletní sekvence, lze v rámci modelu *nearest-neighbourhood* spočítat z termodynamických dat zveřejněných v [1–4, 33] podle vzorce 5.1.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (5.1)$$

Například hodnota Gibbsovy energie pro tripletní sekvenci AAG/TTC se

spočte jako

$$\begin{aligned}\Delta G_{\text{AAG/TTC}}^{\circ} &= \Delta G_{\text{AA/TT}}^{\circ} + \Delta G_{\text{AG/TC}}^{\circ} \\ &= \Delta H_{\text{AA/TT}}^{\circ} + \Delta H_{\text{AG/TC}}^{\circ} - T (\Delta S_{\text{AA/TT}}^{\circ} + \Delta S_{\text{AG/TC}}^{\circ})\end{aligned}\quad (5.2)$$

Přímým dosazením citovaných termodynamických dat by se získala hodnota, která odpovídá koncentraci soli v ekvivalentu Na^+ 1 mol dm^{-3} [37]. Pufr používaný při elektroforetické separaci má ovšem mnohem nižší hodnotu iontové síly, proto je nutné nejprve přepočítat hodnotu entropického členu podle vztahu (2.2).

Při heteroduplexní analýze vzorku s jedním SNP či s jednou bodovou mutací se nevyskytuje libovolná kombinace homoduplexů a heteroduplexů, ale pouze taková, kterou lze vytvořit ze dvou 5'-3' vláken a ze dvou 3'-5' vláken k nim komplementárních. Všechny tripletní sekvence, které se mohou vyskytnout současně v jednom vzorku při heteroduplexní analýze, jsou uvedeny v jednom řádku tabulky 5.1. Ke každému tripletnímu duplexu je v tabulce vypočtena hodnota standardní Gibbsovy energie, která odpovídá jeho vzniku při 75°C při koncentraci Na^+ 23 mmol dm^{-3} , což odpovídá kationické koncentraci běžně používaného elektroforetického pufru.

Tabulka 5.1: ΔG_{75}° [kJ mol⁻¹] tvorby duplexů pro všechny tripletní sekvence vyskytující se při heteroduplexní analýze

#	NN-okolí	SNP	HM 1	HM 2	HT 1	HT 2
01.	AxA	A↔T	2,62	4,53	7,45	11,49
02.	AxA	A↔G	2,62	0,03	9,33	9,19
03.	AxA	A↔C	2,62	-0,97	6,65	9,84
04.	AxA	T↔G	4,53	0,03	12,05	6,37
05.	AxA	T↔C	4,53	-0,97	7,73	7,52
06.	AxA	G↔C	0,03	-0,97	6,36	12,07
07.	AxT	A↔T	2,92	2,92	9,12	12,90
08.	AxT	A↔G	2,92	-0,51	7,87	8,54
09.	AxT	A↔C	2,92	-0,51	5,30	10,69
10.	AxT	G↔C	-0,51	-0,51	5,78	16,84
11.	AxG	A↔T	1,29	1,13	8,93	10,56
12.	AxG	A↔G	1,29	-2,48	10,34	6,85
13.	AxG	A↔C	1,29	-3,19	7,37	9,29
14.	AxG	T↔G	1,13	-2,48	11,25	4,88
15.	AxG	T↔C	1,13	-3,19	5,56	7,51
16.	AxG	G↔C	-2,48	-3,19	6,69	14,65
17.	AxC	A↔T	0,82	1,66	8,72	11,50
18.	AxC	A↔G	0,82	-3,46	9,56	6,42
19.	AxC	A↔C	0,82	-2,95	2,31	8,77
20.	AxC	T↔G	1,66	-3,46	9,81	3,41
21.	AxC	T↔C	1,66	-2,95	4,33	6,02
22.	AxC	G↔C	-3,46	-2,95	2,82	12,54
23.	GxA	A↔T	1,36	2,43	7,05	10,09
24.	GxA	A↔G	1,36	-2,41	7,48	4,98
25.	GxA	A↔C	1,36	-3,92	4,76	8,96
26.	GxA	T↔G	2,43	-2,41	10,13	3,38
27.	GxA	T↔C	2,43	-3,92	5,61	9,21
28.	GxA	G↔C	-2,41	-3,92	3,40	7,77
29.	GxG	A↔T	0,03	-0,97	8,53	9,16
30.	GxG	A↔G	0,03	-4,92	8,49	2,64
31.	GxG	A↔C	0,03	-6,14	5,48	8,41
32.	GxG	T↔G	-0,97	-4,92	9,33	1,89
33.	GxG	T↔C	-0,97	-6,14	3,44	9,20

Tabulka 5.1: (pokračování) ΔG_{75}° [kJ mol⁻¹] tvorby duplexů pro všechny tripletní sekvence vyskytující se při heteroduplexní analýze

#	NN-okolí	SNP	HM 1	HM 2	HT 1	HT 2
34.	GxG	G↔C	-4,92	-6,14	3,73	10,35
35.	GxC	A↔T	-0,44	-0,44	8,32	10,10
36.	GxC	A↔G	-0,44	-5,90	7,71	2,21
37.	GxC	A↔C	-0,44	-5,90	0,42	7,89
38.	GxC	G↔C	-5,90	-5,90	-0,14	8,24
39.	TxA	A↔T	4,23	4,23	5,78	10,08
40.	TxA	A↔G	4,23	-0,43	8,98	8,38
41.	TxA	A↔C	4,23	-0,43	7,72	11,20
42.	TxA	G↔C	-0,43	-0,43	6,94	7,30
43.	TxG	A↔T	2,90	0,83	7,26	9,15
44.	TxG	A↔G	2,90	-2,94	9,99	6,04
45.	TxG	A↔C	2,90	-2,65	8,44	10,65
46.	TxG	T↔G	0,83	-2,94	10,40	6,23
47.	TxG	T↔C	0,83	-2,65	6,21	8,97
48.	TxG	G↔C	-2,94	-2,65	7,27	9,88
49.	CxG	A↔T	-0,50	-0,50	8,74	8,22
50.	CxG	A↔G	-0,50	-5,16	9,98	3,87
51.	CxG	A↔C	-0,50	-5,16	6,95	9,85
52.	CxG	G↔C	-5,16	-5,16	7,60	12,46

Tabulka obsahuje standardní hodnoty Gibbsovy energie tvorby duplexů v kJ mol⁻¹ spočtené v rámci *nearest-neighbourhood* approximace pro všechny tripletní sekvence DNA, které se mohou vyskytnout při heteroduplexní analýze na základě termodynamických dat zveřejněných v [1–4, 33, 37] při teplotě 75 °C a iontové síle ekvivalentu 23 mmol dm⁻³ Na⁺.

Jednotlivé řádky jsou vytvářeny podle následujícího principu: první sloupec představuje číslo řádku, druhý sloupec obsahuje nejbližší okolí záměny, třetí sloupec záměnu, další sloupce obsahují hodnotu standardní Gibbsovy energie pro homoduplexy (HM 1 a HM 2) a heteroduplexy (HT 1 a HT 2). Například řádek 13 označený AxG : A↔C obsahuje energie odpovídající po řadě následujícím duplexům AAG/TTC (HM 1), ACG/TGC (HM 2), AAG/TGC (HT 1), ACG/TTC (HT 2).

5.2 Teoretická studie modelových systémů

5.2.1 Případ jednonukleotidové záměny (polymorfismu MDR1)

Pomocí aplikace *stitchprofiles* byl vytvořen teplotní profil dvou homoduplexů MDR1 fragmentu obsahujících jako jedenapadesátý pár bází cytosin-guanin v případě normálního typu (wild type) a thyminadenin v případě polymorfismu, obrázek 5.1. Hodnota teploty tání domény s možným výskytem polymorfismu je u normálního typu 79,1 °C a u polymorfního typu 78,6 °C.

Fragment MDR1 obsahuje dle výpočtů pouze dvě teplotní domény. Vyšší (stabilnější) teplotní doména připadá na GC-svorku, nižší doména na báze v polohách 26–104. Polymorfismus se nachází uvnitř nižší teplotní domény, tudíž je splněna nutná podmínka pro heteroduplexní analýzu.

Pomocí aplikace *stitchprofiles* byly pro oba homoduplexy MDR1 fragmentu vytvořeny pravděpodobnostní profily při teplotách blízkých teplotě tání: 78,4, 78,8 a 79,2 °C, obrázek 5.2.

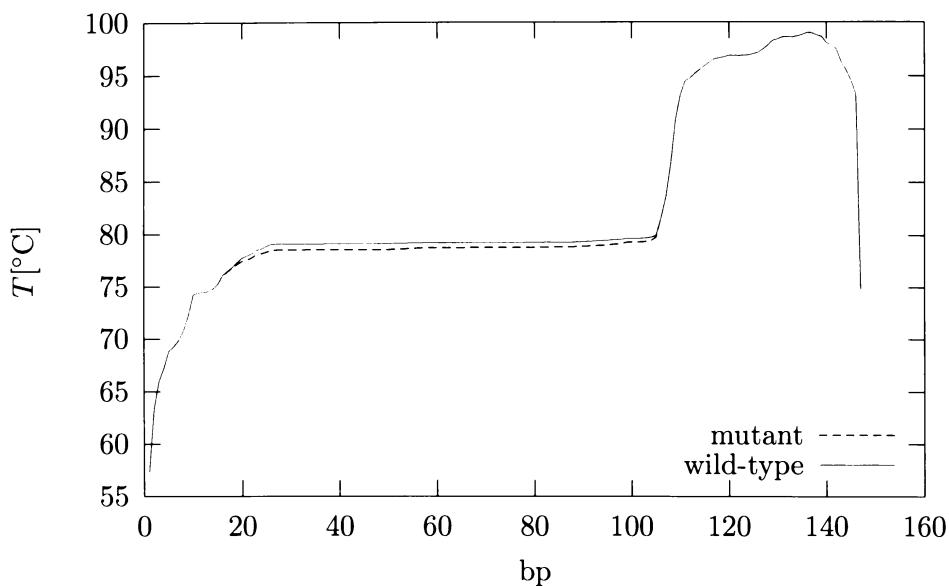
Rozdíl helicit homoduplexů MDR1 fragmentu je při teplotě 78,8 °C výrazný, což umožňuje jejich snadnou separaci.

Termodynamická stabilita heteroduplexů

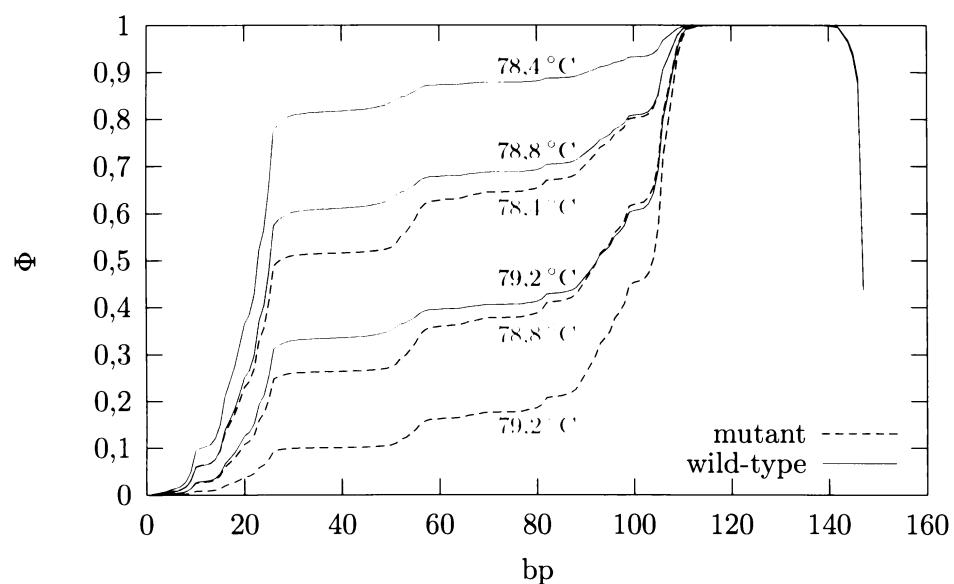
Model *stitchprofiles* [42] umožňuje spočítat teplotní mapy i pro fragmenty DNA, kde se vyskytuje zařazení nesprávné báze (*mismatch*). Bohužel tato funkce není v jeho současné implementaci [41] dostupná, proto můžeme pouze přibližně odhadovat teplotní stabilitu heteroduplexů.

Jestliže záměna páru báze na místě SNP či bodové mutace neovlivní délku smyčky, lze na tuto změnu pohlížet jen z pohledu *nearest-neighbourhood* aproximace (kapitola 5.1). Podle pravděpodobnostního profilu (obrázek 5.2) se zdá být tento předpoklad oprávněný. Na základě termodynamických dat uvedených v [1, 2, 37] jsem vypočítal hodnoty příspěvku jednotlivých tripletů ke Gibbsově energii vzniku dvojšroubovice. Údaje jsou uvedeny v tabulce 5.2.

Podle spočtených dat lze usuzovat, že při teplotě 79 °C se budou dobře separovat jak homoduplexy, tak heteroduplexy fragmentu MDR1.



Obrázek 5.1: Teplotní profil homoduplexů MDR1 fragmentů vytvořený pomocí aplikace *stitchprofiles* [42], termodynamická data „Blossey and Carlon 2003“, koncentrace soli 23 mmol dm^{-3}



Obrázek 5.2: Pravděpodobnostní profil homoduplexů MDR1 fragmentů při teplotách 78,4, 78,8 a 79,2 °C (dle klesající helicity Φ) vytvořený pomocí aplikace *stitchprofiles* [42], termodynamická data „Blossey and Carlon 2003“, koncentrace soli 23 mmol dm^{-3}

Tabulka 5.2: Hodnoty příspěvku jednotlivých tripletů ke Gibbsově energii vzniku duplexu spočítané za použití *nearest-neighbourhood* approximace z termodynamických dat uvedených v [1, 2, 37] pro teplotu 79 °C při koncentraci Na^+ 23 mmol dm⁻³

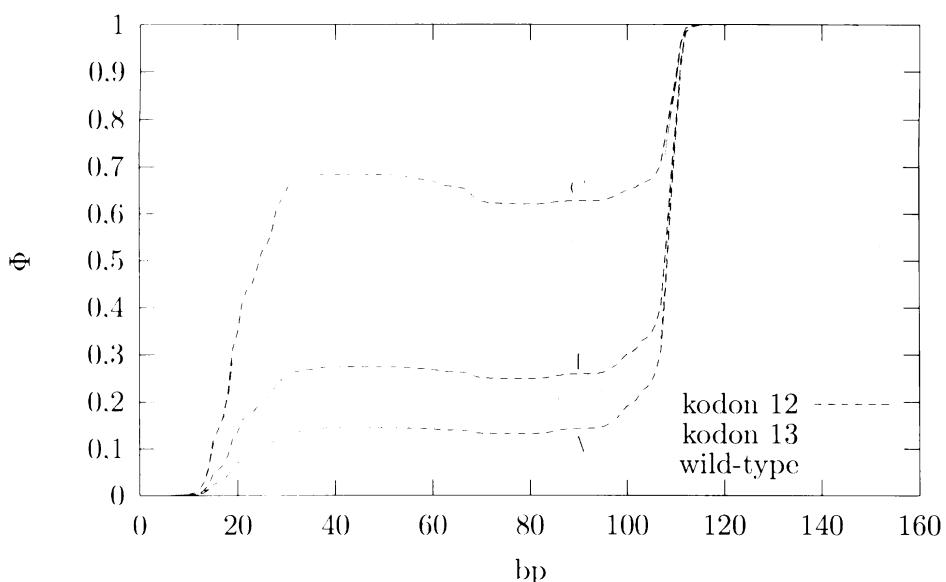
pořadí	sekvence	duplex	$\Delta G_{79}^\circ [\text{kJ mol}^{-1}]$
1	TCG/AGC	homo	-1,78
2	TTG/AAC	homo	+1,63
3	TTG/AGC	hetero	+6,54
4	TCG/AAC	hetero	+8,62

5.2.2 Případ vícenukleotidové záměny (mutace K-RAS)

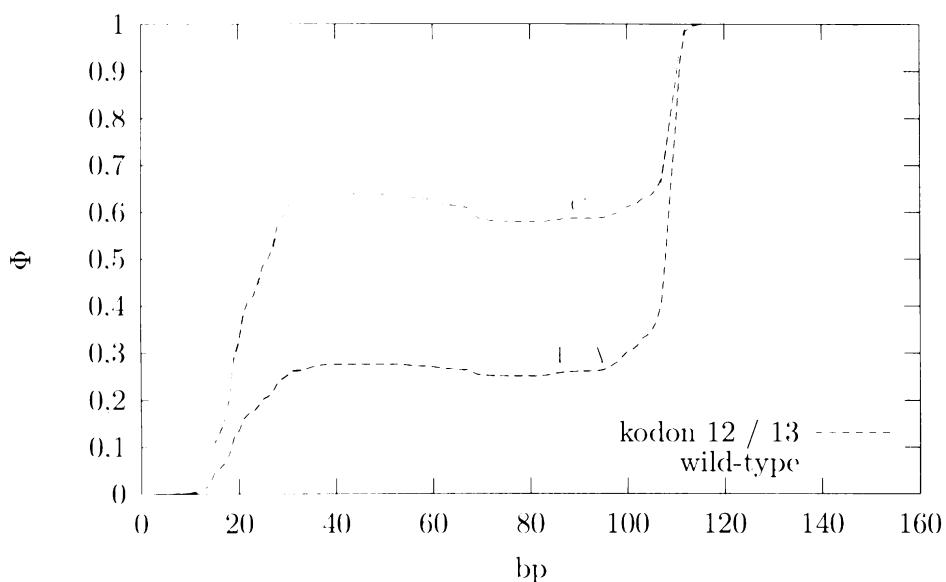
Na obrázcích 5.3 a 5.4 jsou znázorněny vypočtené pravděpodobnostní profily tání homoduplexů K-RAS fragmentů při teplotě 74,5 °C. Pravděpodobnostní profily kodonů 12 a 13 na obrázku 5.4 se překrývají.

Kvůli následné analýze elektroferogramů je potřeba znát příspěvky heptamerní sekvence, která pokrývá kodony 12 a 13, ke Gibbsově energii tvorby duplexů. Z pravděpodobnostního profilu fragmentů K-RAS znázorněných na obrázcích 5.3 a 5.4 lze usuzovat, že je splněna podmínka konstantní délky teplotní domény, a můžeme tedy použít approximaci představenou v kapitole 5.1.

Vypočtené hodnoty pokrývají všechny homoduplexy a heteroduplexy, které se mohou vyskytnout při heteroduplexní analýze fragmentů K-RAS. Číselné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.3.



Obrázek 5.3: Pravděpodobností profily tání homoduplexu K-RAS fragmentů s mutací ve druhém páru bází kodonu 12 a druhém páru bází kodonu 13 při teplotě $74.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ vytvořený pomocí aplikace stitchprofiles [42], termodynamická data „Blossey and Carlon 2003“, koncentrace soli 23 mmol dm^{-3} ; pořadí profilu podle klesající helicity: kodon 12: C > G_{WT} > T > A; kodon 13: C = G_{WT} > A = T



Obrázek 5.4: Pravděpodobností profily tání homoduplexu K-RAS fragmentu s mutací v prvním páru bází kodonu 12 a prvním páru bází kodonu 13 při teplotě 74.5°C vytvořený pomocí aplikace stitchprofiles [42]. termodynamická data „Blossey and Carlon 2003“, koncentrace soli 23 mmol dm^{-3} ; profily kodonu 12 a 13 se překrývají, pořadí profilu podle klesající helicity: $\text{C} > \text{G}_{\text{WT}} > \text{T} = \text{A}$

Tabulka 5.3: ΔG_{75}° [kJ mol⁻¹] tvorby duplexu pro sekvence obsažené v exom 1 K-RAS

kodon	označení	sekvence	WT	HM	HT	HT	#
12	AGT	TAGTGGC	-9,81	-3,97	3,12	-0,83	44
12	TGT	TTGTGGC	-9,81	-6,04	3,53	-0,64	46
12	CGT	TCGTGGC	-9,81	-9,52	3,01	0,40	48
12	GAT	TGATGGC	-9,81	-5,20	-0,84	-2,53	21
12	GTT	TGTTGGC	-9,81	-6,04	1,91	-4,55	19
12	GCT	TGCTGGC	-9,81	-10,32	5,68	-4,04	22
13	AGC	TGGTAGC	-9,81	-3,97	3,12	-0,83	44
13	TGC	TGGTTGC	-9,81	-6,04	3,53	-0,64	46
13	CGC	TGGTCGC	-9,81	-9,52	3,01	0,40	48
13	GAC	TGGTGAC	-9,81	-4,35	3,80	-1,70	36
13	GTC	TGGTGTC	-9,81	-4,35	3,98	-3,49	37
13	GCC	TGGTGCC	-9,81	-9,81	4,33	-4,05	38

Tabulka obsahuje standardní hodnoty Gibbsovy energie tvorby duplexu v kJ mol⁻¹ při 75 °C a koncentrace soli 23 mmol dm⁻³ spočtené v rámci *nearest-neighbourhood* approximace pro sekvence o délce 7 páru bází na základě termodynamických dat zveřejněných v [14, 33, 37]. Každý řádek odpovídá jednomu elektroferogramu z obrázku 2.3; číslo řádku (#) odkazuje na tripletní sekvenci mutace v tabulce 5.1

5.3 Elektromigrační charakteristiky zvolených fragmentů

5.3.1 Teplotní optimalizace separace MDR1 systému

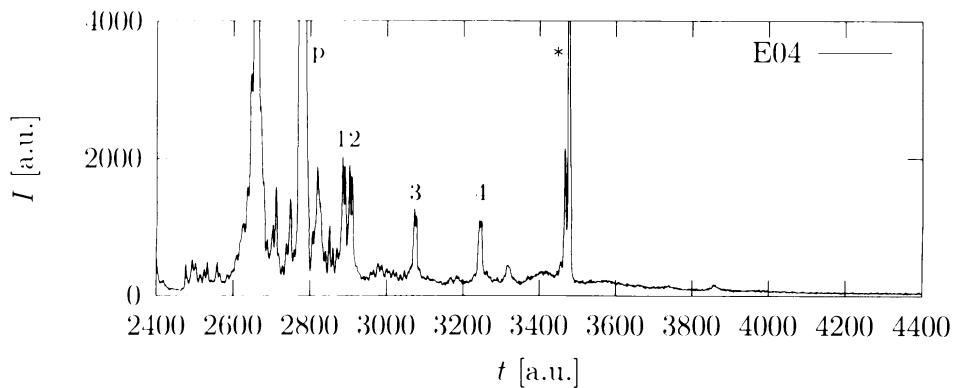
Močovina obsažena v denaturujícím gelu, který se používá při separaci metodou DCE, snižuje vypočtenou teoretickou teplotu tání přibližně o $22 - 28\text{ }^{\circ}\text{C}^*$. Přesný vliv močoviny na teplotní stabilitu dvojšroubovice DNA však nebyl dosud dobře popsán [10]. Budu předpokládat, že pusobení močoviny na fragmenty DNA, které se liší pouze v jednom páru bází, snižuje jejich teplotu tání stejným způsobem.

Byla provedena série čtyř separací MDR1 fragmentu při různých teplotách s cílem najít optimální teplotu. Při teplotách $49,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $50,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ se nedostatečně separují homoduplexy, obrázek 5.5. Po zvýšení teploty o $2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $52,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ se separace homoduplexu výrazně zlepšila, zatímco heteroduplexy zůstaly stále separovány. Zároveň se ve většině kapilár lišil migrační čas píku duplexu od migračního času „cizího píku“[†]. Aby v žádné kapiláře neinterferoval „cizí pík“ s píky homoduplexu, byla na závěr optimalizace zvýšena teplota na $53,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

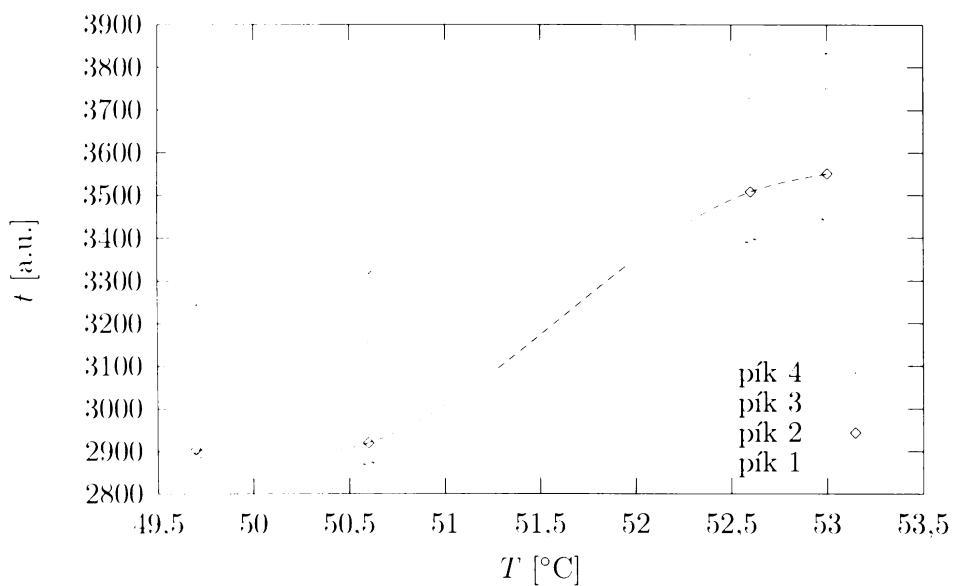
Migrační časy duplexu z kapiláry E04 jsou uvedeny v grafu na obrázku 5.6. Kapilára E04 byla zvolena pro ilustraci proto, že v jejím případě odpovídají migrační časy duplexu přibližně mediánu hodnot celého kapilárního pole.

*zjištění na základě vlastních drívějších výsledku

[†]Povaha „cizího píku“ není zcela jasná, každopádně se jedná o fluorescenčně značený fragment DNA. Může to být vedlejší PCR produkt, primer s GC-svorkou vytvářející sekundární strukturu, dvě GC-svorky držící v sekundární struktuře, atp.



Obrázek 5.5: Elektroferogram elektroforetické separace fragmentu MDR1 v MegaBACE 1000 naměřený při teplotě $49.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ v kapiláře E04; pík priméru je označen (p), cizí pík (*), homoduplexy (1, 2), heteroduplexy (3, 4); časová osa odpovídá vzorkování 1,75 Hz



Obrázek 5.6: Vliv teploty na migrační časy homoduplexu (píky 1 a 2) a heteroduplexu (píky 3 a 4) MDR1 fragmentu; data z kapiláry E04 (interpolováno kubickým splinem); časová osa odpovídá vzorkování 1,75 Hz

5.3.2 Normalizace elektroferogramů v multikapilárním poli

Obrázek 5.7 představuje tři elektroferogramy z různých kapilár jednoho běhu MegaBACE 1000 při teplotě 52,6 °C, jak byly získány při teplotní optimalizaci MDR1 fragmentu. Je patrné, že migrační časy jednotlivých fluorescenčně značených fragmentů DNA se mezi kapilárami liší, což ztěžuje vyhodnocení elektroferogramu.

Byla proto navržena transformace migračních časů, resp. mobilit DNA fragmentu podle vnitřního standardu. Veličinou nezávislou na změně separačních podmínek v kapilárách je poměr mobility fragmentu DNA ku mobilitě standardu

$$\text{konst.} = \frac{\mu}{\mu_{\text{standard}}}. \quad (5.3)$$

Za vnitřní standard byl zvolen primer, neboť

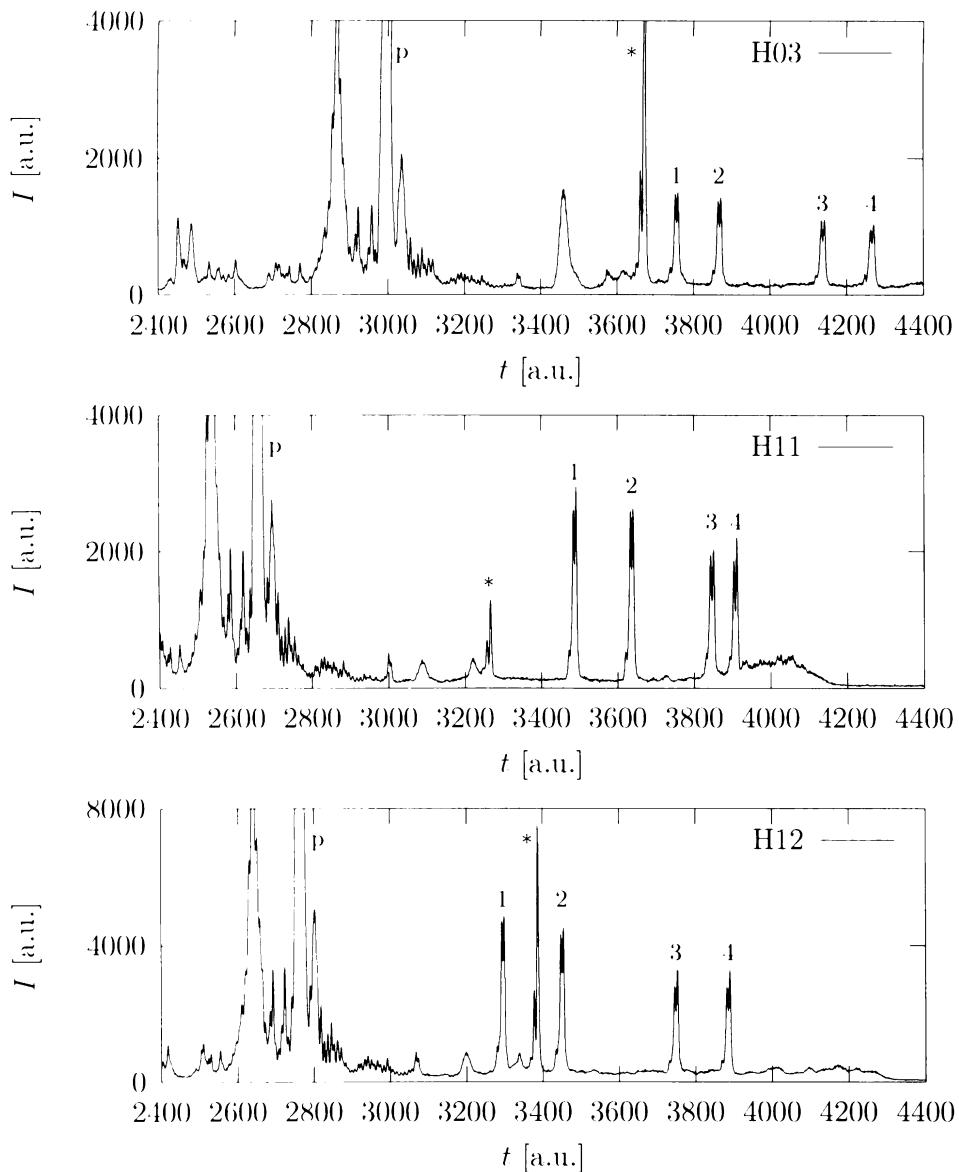
- je obsažen v každém vzorku a lze jej snadno detektovat,
- jedná se o molekulu DNA,
- nepodléhá teplotní denaturaci, a tudíž jej lze použít při libovolné teplotě separace.

Transformační funkce časové osy (5.4) má tvar, který vychází z invariantu poměru mobilit, byla však upravena, aby byla monotónně rostoucí a omezená. Považuji za důležité zduraznit, že vzhledem k mobilitám fragmentu se jedná o lineární funkci. Pro účely dalšího počítačového zpracování je výhodné, pokud jsou hodnoty transformační funkce (5.4) z oboru celých čísel. V dalsím textu jsou proto uváděny hodnoty této funkce po vynásobení 10^4 a zaokrouhlení na nejbližší nižší celočíselnou hodnotu.

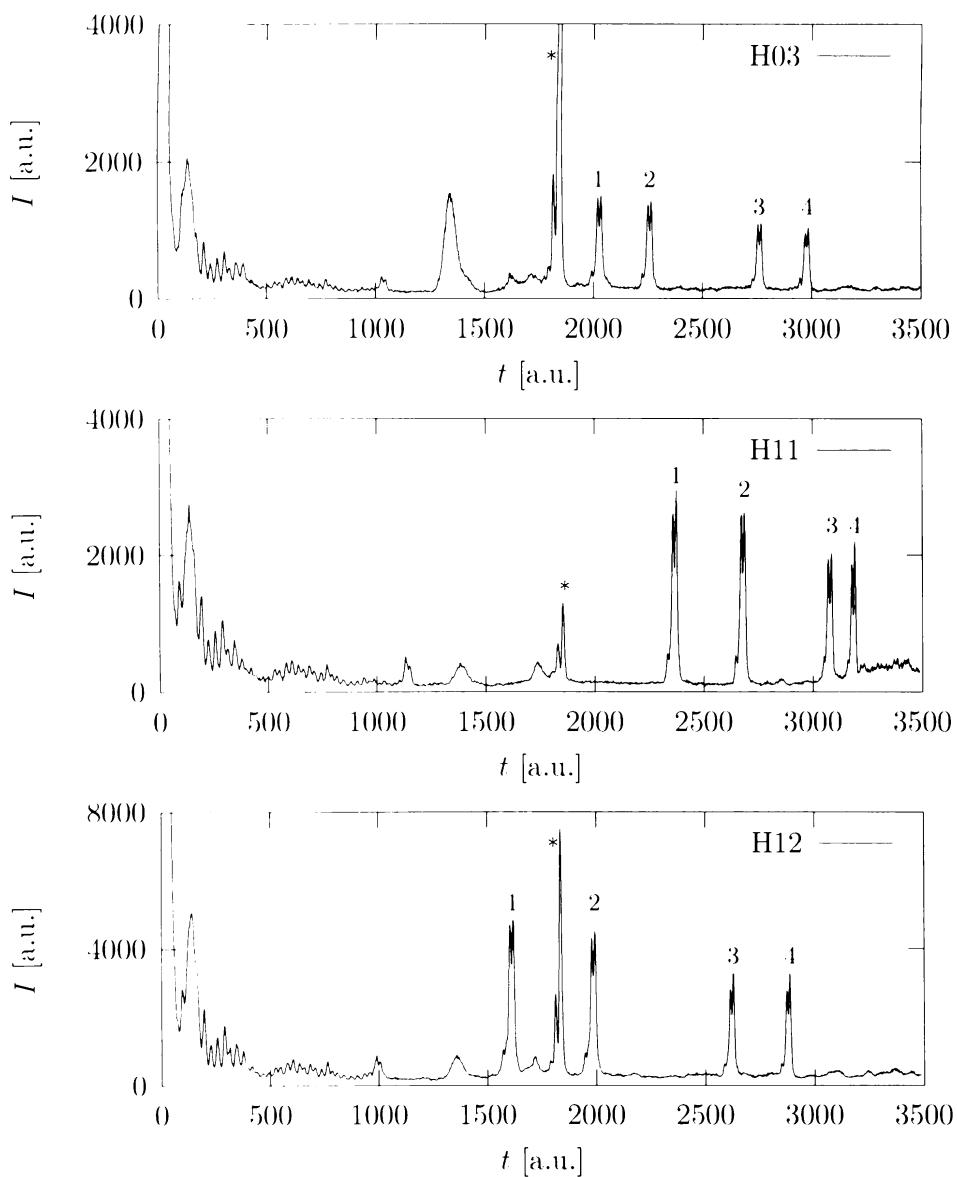
$$f(t) = 1 - \frac{t_{\text{primer}}}{t} \quad (5.4)$$

Elektroferogramy 5.7 po transformaci časové osy funkcí $f(t)$ jsou uvedeny na obrázku 5.8.

Následně byla provedena statistická analýza migračních časů a transformovaných migračních časů primeru, „cizího píku“ a homoduplexních a heteroduplexních píku. Její shrnutí je uvedeno v tabulce 5.4.



Obrázek 5.7: Elektroferogramy jednoho běhu elektroforetické separace fragmentu MDR1 v MegaBACE 1000 naměřené při teplotě 52.6 °C v kapilárách H03, H11 a H12; pík primeru je označen (p), cizí pík (*), homoduplexy (1, 2), heteroduplexy (3, 4); časová osa odpovídá vzorkování 1.75 Hz



Obrázek 5.8: Transformované elektroferogramy jednoho běhu elektroforetické separace fragmentu MDR1 v MegaBACE 1000 naměřené při teplotě 52,6 °C v kapilárách H03, H11 a H12; cizí pík je označen (*), homoduplexy (1, 2), heteroduplexy (3, 4); časová osa odpovídá transformovanému poměru mobilit, vizte kapitolu 5.3.2

Tabulka 5.4: Statistický popis migračních času (první část tabulky) a transformovaných migračních času (druhá část tabulky) píků při DCE MDR1 fragmentu při teplotě 52.6 °C

pík	rozdělení	1. kvartil	medián	3. kvartil
primer	nenormální	2712	2741	2790
cizí pík	nenormální	3314	3364	3429
homoduplex 1	nenormální	3439	3486	3540
homoduplex 2	nenormální	3541	3599	3657
heteroduplex 3	nenormální	3767	3836	3927
heteroduplex 4	nenormální	3866	3927	4020
cizí pík	normální*	1860	1881	1903
homoduplex 1	nenormální	2052	2130	2201
homoduplex 2	nenormální	2310	2378	2457
heteroduplex 3	nenormální	2788	2848	2921
heteroduplex 4	nenormální	2986	3034	3084

*po vyjmutí tří odlehlých bodů

Rozdělení migračních času primeru a migračních času cizího píku není mezi kapilárami normální. Po provedení transformace se rozdělení migračních času cizího píku stane normálním s poměrně úzkým intervalom mezi první a třetím kvartilem[‡], což vypovídá o teplotní nezávislosti „cizího píku“ a správnosti transformační funkce.

Homoduplexy a heteroduplexy mají i po transformaci v různých kapilárách různé hodnoty transformovaných migračních časů. Na transformovaném elektroferogramu z kapiláry H12 je zřetelně vidět, že homoduplex normálního typu má nižší mobilitu než „cizí pík“, i když v ostatních kapilárách je tomu naopak. Protože transformace neodstraňuje denaturační vlivy, může být tento rozdíl vysvětlen různým stupněm částečné denaturace, tedy různou střední hodnotou teploty v kapilárách.

Z grafu helicit (obrázek 5.2) je patrné, že odchylka teploty od teploty tání v řádu deseti stupně Celsia má značný vliv na helicitu teplotní domény duplexu, tedy i na aktuální mobilitu duplexu při DCE. Transformované mi-

[‡]Změna migračního času cizího píku o jednotku odpovídá při daných hodnotách migračních času primeru změně transformovaného migračního času cizího píku o tři jednotky.

grační časy tak zcela ideálně umožňují zjištění aktuální teploty uvnitř kapiláry. To může mít zásadní význam pro experimentální optimalizaci či jiná použití.

5.3.3 Vlastnosti temperovaného prostoru kapilárního pole

Teploměrem PT232 byla změřena teplota na různých místech temperovaného prostoru MegaBACE 1000. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.5. Z tabulky je patrné, že teplota v temperovaném prostoru není homogenní a že rozdíly jsou dokonce v řádu stupně Celsia. Lze si povšimnout, že teplota u vzdálenějšího konce kapilárního pole na straně katody (řada 12) je nižší než teplota u bližšího konce (řada 1).

Tabulka 5.5: Teplota v temperovaném prostoru MegaBACE 1000 na různých místech (T_n nastavená teplota, známénko + značí použití přídavného odporu, který mění chování vestavěného čidla; T_1 teplota uprostřed bližší hrany kapilárního pole, T_2 teplota uprostřed vzdálenější hrany kapilárního pole, T_3 teplota přibližně 2 cm pod vestavěným čidlem)

T_n [°C]	T_1 [°C]	T_2 [°C]	T_3 [°C]
45,0	45,1	41,5	43,7
45,0+	50,4	46,9	
50,0+	56,8	53,7	

5.3.4 Teplotní mapa kapilárního pole

Vysokokapacitní separace s použitím kapilárních polí jsou dnes rutinní pro řadu aplikací v molekulární biologii, forenzní genetice atp. Hlavním předpokladem je reproducibilnost mezi jednotlivými kapilárami, např. pokud jde o udržení stejných teplotních podmínek.

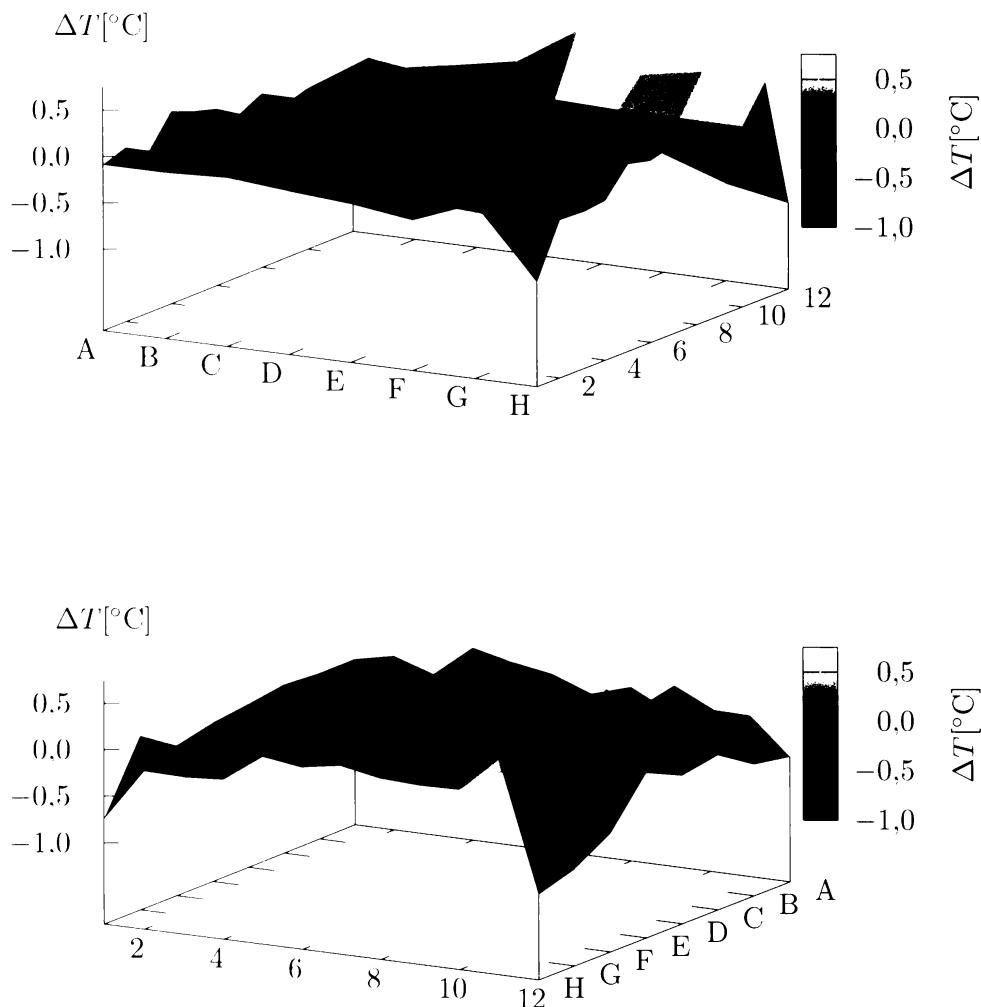
Na základě odchylek transformovaných migračních časů jednotlivých duplexu MDR1 od mediánu lze vytvořit teplotní mapu pole 96 kapilár. Výpočty helicit pomocí aplikace *stitchprofiles* ukazují, že v rozsahu celkové helicity fragmentu 40–80 % se liší homoduplex normálního typu od polymorfního

homoduplexu přibližně o 0.48°C . Například helicitu 60 % dosahuje homoduplex normálního typu při teplotě 78.98°C , kdežto homoduplex polymorfního typu při teplotě 78.50°C . Přiřadíme-li rozdílu transformovaných migračních času (mobilit) teplotní interval 0.48°C , lze převést odchylky migračních časů na stupně Celsia za předpokladu lineárního chování změny teploty oproti změně mobility. Na základě této úvahy odpovídá změna transformovaného migračního času homoduplexu o 62 jednotek při separaci při teplotě $52,6^{\circ}\text{C}$ změně teploty o 0.1°C . Při separaci při teplotě $53,0^{\circ}\text{C}$ odpovídá stejně změně teploty posun transformovaného migračního času o 59 jednotek.

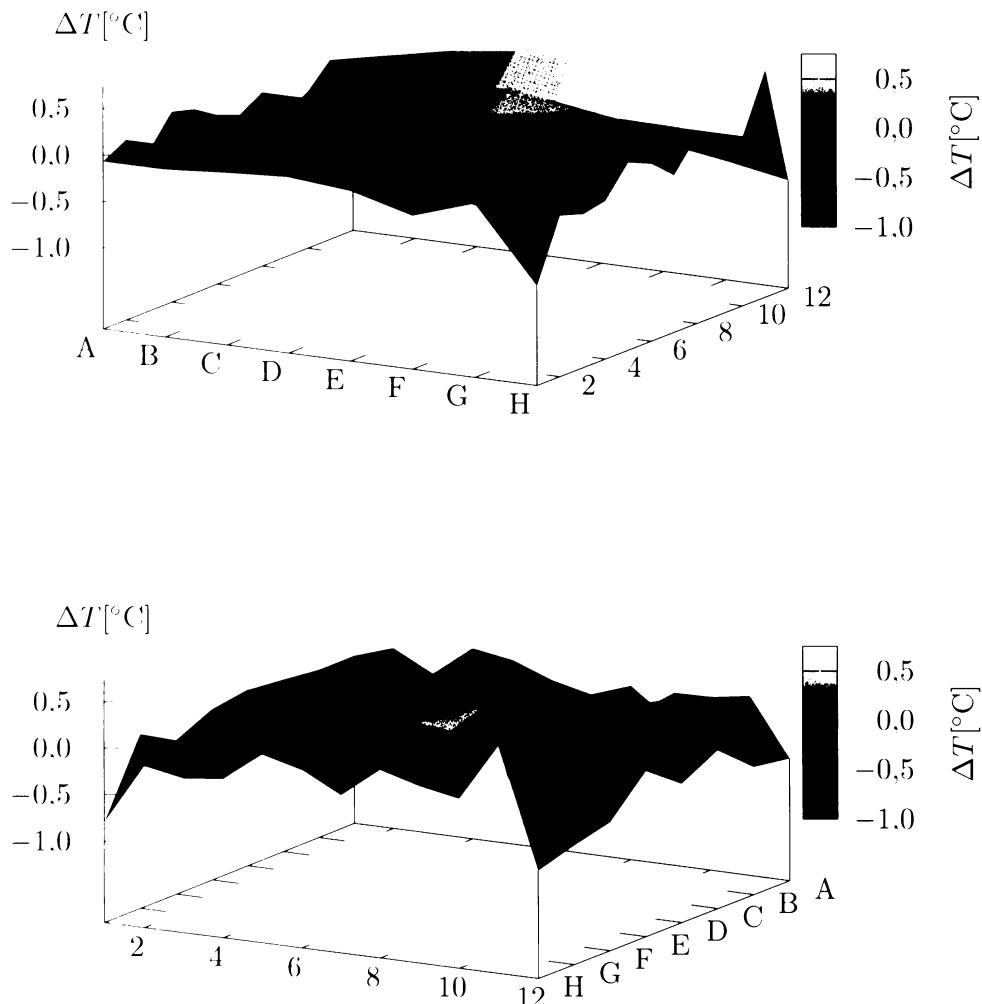
Jinou možností, jak převést odchylku transformovaného migračního času na odchylku teploty, je porovnat polohy píku dvou teplotně blízkých běhu separací ($52,6^{\circ}\text{C}$ a $53,0^{\circ}\text{C}$). Z příčin, které budou diskutovány v kapitole 6.4, se transformovaná poloha „cizího píku“ při běhu $53,0^{\circ}\text{C}$ posunula o 97 jednotek směrem k nižším hodnotám. Za předpokladu, že stejným způsobem byla ovlivněna mobilita všech duplexu, lze určit, že změně teploty o 0.1°C odpovídá 67 jednotek (homoduplex normálního typu), resp. 64 jednotek (homoduplex mutantního typu).

Rozdělení transformovaných migračních časů homoduplexu a heteroduplexu není normální a interval mezi prvním a třetím kvartilem je poměrně široký, což svědčí o nenáhodném rozdělení teplot v kapilárním poli. Teplotní mapa ukazuje, že dvanáctá řada kapilár je výrazně chladnější a jedenáctá řada výrazně teplejší než zbytek kapilárního pole. Další teplé místo představují kapiláry D F \times 7 8, naopak roh pole u kapiláry H01 je poměrně chladný.

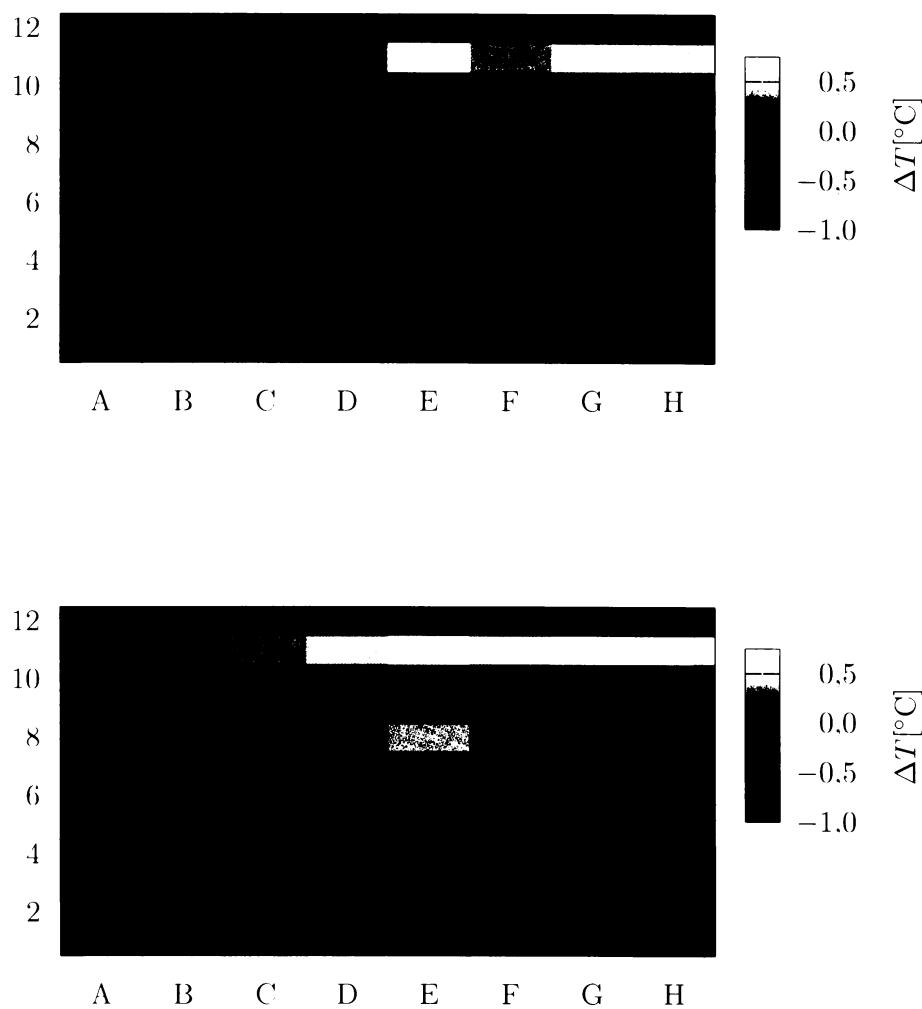
Trojrozměrné znázornění teplotní mapy kapilárního pole spočtené podle transformovaných migračních časů homoduplexu na základě výpočtu helicit jsou uvedeny na obrázcích 5.9 a 5.10. Dvojrozměrné znázornění téhož je uvedeno na obrázku 5.11.



Obrázek 5.9: 3-D teplotní mapa kapilárního pole sestrojená na základě odchylek od mediánu hodnot transformovaných migračních časů homoduplexu normálního typu (pík 1) při střední teplotě $52,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (hodnoty pro kapiláry A06, A08, C12, D01, E01, E11, E12, H1, H7 při střední teplotě $53,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; údaje pro kapiláry D03, G01, G06 chybí a voleny nulové); dolní obrázek vznikl otočením horního o 90° po směru hodinových ručiček



Obrázek 5.10: 3-D teplotní mapa kapilárního pole sestrojená na základě odchylek od mediánu hodnot transformovaných migračních času homoduplexu polymorfního typu (pík 2) při střední teplotě $52.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (hodnoty pro kapiláry A06, A08, C12, D01, E01, E11, E12, H1, H7 při střední teplotě $53.0\text{ }^{\circ}\text{C}$; údaje pro kapiláry D03, G01, G06 chybí a voleny nulové); dolní obrázek vznikl otočením horního o 90° po směru hodinových ručiček



Obrázek 5.11: 2-D teplotní mapy kapilárního pole; horní obrázek je 2-D verze mapy 5.9 (podle homoduplexu normálního typu), dolní obrázek je 2-D verze mapy 5.10 (podle homoduplexu normálního typu); údaje pro kapiláry D03, G01 a G06 chybí a jsou voleny jako nulové

Kapitola 6

Diskuse

Metody založené na změnách ve struktuře DNA v důsledku částečné denaturace se v současné době jeví jako perspektivní směr pro analýzu bodových mutací a SNP. V porovnání s klasickou metodou sekvenace jsou tyto techniky rychlejší, citlivější a také levnější. Podskupinu těchto metod tvoří techniky využívající princip denaturační kapilární elektroforézy (DCE).

Příkolem DCE je separace částečně denaturowaných fragmentů DNA na základě jejich aktuální mobility, která závisí na jejich helicitě. Vzorky se získají amplifikací analyzované části genu metodou PCR. Nachází-li se v jedné alele bodová mutace nebo polymorfismus, dochází při zpětné hybridizaci denaturowaných fragmentů ke tvorbě homoduplexu a heteroduplexu, pokud jsou obě alely shodné, vznikne pouze homoduplex. Protože teplotní stabilita DNA fragmentu závisí na jeho sekvenci, je v některých případech na základě migračního času fragmentu určit typ mutace.

6.1 Termodynamické parametry mutací při heteroduplexní analýze

Existují však bodové mutace, které nemění nejbližší okolí, a tedy za předpokladu platnosti *nearest-neighbourhood* aproximace ani termodynamické vlastnosti dvojsroubovice. V tabulce 5.1 jsou takové mutace uvedeny na řádcích 7, 10, 35, 38, 39, 42, 49 a 52. Kvůli stejným termodynamickým vlastnostem nelze tyto mutace z principu zjistit/odlišit základní heteroduplexní analýzou – při DCE se homoduplexy nebudou navzájem separovat.

Tyto mutace lze detektovat vytvořením heteroduplexu po přidání DNA normálního typu. Při teplotě 75 °C mají heteroduplexy všech těchto mutací výrazně odlišnou hodnotu Gibbsovy energie ve srovnání s homoduplexy.

Jak je zřejmé z tabulky 5.1, podmínka odlišné Gibbsovy energie tvorby heteroduplexu a homoduplexu je obecně splněna pro všechny mutace při teplotě 75 °C. Heteroduplexy lze tedy při této teplotě vždy separovat od homoduplexu.

6.2 Pořadí píků při heteroduplexní analýze

Hodnota Gibbsovy energie tvorby homo- a heteroduplexu závisí na sekvenci a lze ji přibližně spočítat na základě *nearest-neighbourhood* modelu. Model, který navrhuji, předpokládá, že změna teploty tání mutovaného fragmentu je úměrná změně Gibbsovy energie tvorby duplexu v místě mutace. Tento model lze úspěšně použít k analýze odlišných vzorů píku na elektroferogramech naměřených v [7], obrázek 2.3.

Nejprve porovnejme naměřené elektroferogramy a spočtené hodnoty Gibbsovy energie tvorby duplexu pro mutace v prvním páru bází kodonu 12 (GGT) genu K-RAS (první část tabulky 5.3). U mutace CGT se Gibbsovy energie pro homoduplexy liší velice nepatrně, proto nedojde k jejich úplné separaci při elektroforéze. V ostatních případech se Gibbsovy energie liší dostatečně pro dobré rozdělení, přičemž separace homoduplexu u mutace AGT by měla být lepší než v případě mutace TGT, což je patrné i z elektroferogramu. Rozdíl Gibbsových energií pro první a druhý heteroduplex je ve všech třech případech přibližně stejný a dostačuje k separaci. Pravděpodobnostní profil fragmentu K-RAS na obrázku 5.4 vytvořený pomocí aplikace *stitch-profiles* předpovídá velice podobné helicity homoduplexu u mutací TGT a AGT, což není v souladu s jednoduchým *nearest-neighbourhood* modelem, ani s elektroferogramy.

Porovnáme-li první a třetí část tabulky 5.3, tedy Gibbsovy energie tvorby duplexu pro mutace v prvním páru bází kodonu 12 (GGT) a kodonu 13 (GGC), zjistíme, že jsou shodné. To je způsobeno tím, že mají zcela shodné nejbližší okolí (TxG), a tedy *nearest-neighbourhood* approximace nemůže dát jiné výsledky. Taktéž hodnoty helicit homoduplexních fragmentů obsahujících stejný typ mutace jednou v kodonu 12 a podruhé v kodonu 13 spočtené

pomocí *stitchprofiles* se liší v řádu tisícin (obrázek 5.4). Elektroferogramy potvrzují shodné vzory páku u těchto mutací.

Gibbsovy energie pro mutace v druhém páru bází kodonu 12 (GGT) jsou uvedeny ve druhé části tabulky 5.3. Hodnoty Gibbsových energií tvorby homoduplexu pro mutaci GCT jsou si velice blízké, proto zde nedojde k jejich separaci, jak je patrné z elektroferogramu. Separace homoduplexu u mutací GAT a GTT proběhne v obou případech přibližně stejně dobře. Rozdíl mezi Gibbsovými energiemi tvorby různých heteroduplexu je u mutace GAT menší než v dalších dvou případech, proto i oddělení heteroduplexu je elektroferogramu s mutací GAT horší. Přibližně stejnou separaci heteroduplexu v případě mutace GTT a GCT lze zdůvodnit tak, že od jisté hodnoty Gibbsovy energie se již helicita příslušné teplotní domény fragmentu příliš nemění, neboť je při dané teplotě téměř roztažitá.

Z mutací ve druhém páru bází kodonu 13 (GGC) téhož genu je pozoruhodná zejména mutace GCC, neboť se v elektroferogramu vyskytuje jen tři páky. Porovnáním s tabulkou 5.3 zjistíme, že oba homoduplexy mají stejnou hodnotu Gibbsovy energie. Důvodem je skutečnost, že tato mutace nemění vlastnosti svého nejbližšího okolí (GGC/CCG \equiv GCC/CGG). Podle termodynamických dat by měla u dalších dvou dvojic homoduplexu proběhnout separace hladce, což potvrzují i elektroferogramy. Velmi výrazná separace heteroduplexu u mutací GTC a GCC je ve shodě s vypočtenými daty. Nicméně předpovězená míra separace heteroduplexu byla větší u mutace GCC. Stejně tak nelze na základě nižšího rozdílu Gibbsových energií tvorby heteroduplexu u mutace GAC vysvětlit, proč se heteroduplexy separují tak málo. Podle delších migračních časů při analýze mutace GAC však může být v kapiláře vyšší teplota, což má za následek přílišnou denaturaci heteroduplexu.

Mutace GTT, GCT kodonu 12 (GGT) a GTC, GCC kodonu 13 (GGC) genu K-RAS mají hodnotu standardní Gibbsovy energie tvorby jednoho z heteroduplexu velice blízkou hodnotám příslušejícím homoduplexum. Tomu odpovídá výrazné oddělení heteroduplexu a změna vzoru páku namísto dvou dvojic na jednu čtverici (vyjma GCC s jedním pákem homoduplexu).

Výše zmíněné odchyly od předpovězeného chování mohou mít příčinu v nepřesných vstupních termodynamických datech, která byla pro heteroduplexy měřena jen u oligonukleotidu. Rovněž vliv iontové síly na entropii je odvozen empiricky a pro oligonukleotidy. V ostatních případech však aproximace platí velice dobře.

6.3 Teplotní optimalizace separace MDR1 systému

Human multidrug-resistance gene (MDR1) kóduje membránový transportní glykoprotein, který aktivně přenáší xenobiotika ven z buňky. Mutace nebo polymorfismy tohoto genu ovlivňují terapeutické působení řady léků. Tento gen je intenzivně studován zejména v souvislosti s chemoterapeutiky. V této práci jsem se zabýval optimalizací metody DCE pro analýzu MDR1 fragmentu z exonu 26.

Jako optimální teplota pro DCE analýzu tohoto fragmentu byla experimentálně určena hodnota 53°C . Z čistě termodynamického hlediska se jedná podle grafu 5.6 o hodnotu mírně nad optimem, nicméně použitím této teploty se zabrání interferenci „cizího písku“ s homoduplexy MDR1 fragmentu.

Gibbsovy energie z tabulky 5.2 velice dobře korespondují s výsledným vzhledem elektroferogramu DCE separace MDR1 fragmentu, když rozdíl mobilit mezi homoduplexy je přibližně stejný jako rozdíl mobilit mezi heteroduplexy, přičemž homoduplexy se od heteroduplexu separují velmi výrazně. Duplexy se separují v pořadí dle klesající mobility: C/G, T/A, T/G, C/A.

6.4 Transformační funkce a teplotní mapa kapilárního pole

V klinické diagnostice se často používají multikapilární přístroje, které umožňují zkrátit dobu analýzy velkého množství vzorku až stokrát. Separační podmínky se však v jednotlivých kapilárách pole liší, což ovlivňuje průběh separace a znesnadňuje vyhodnocení elektroferogramu. Byla proto navržena transformační funkce (5.4), která se snaží většinu těchto vlivů potlačit.

Transformační funkce je založena na skutečnosti, že ve všech kapilárách by měl být invariantní poměr mobilit duplexů DNA a primeru jako vnitřního standardu. Výsledná podoba funkce byla navržena tak, aby zachovávala pořadí písku v elektroferogramu, jako by se jednalo o časovou škálu, i když vynášené hodnoty odpovídají mobilitám.

Změnu transformovaných migračních času se podařilo převést na teploty dvěma způsoby s podobným výsledkem. Nevelké rozdíly v absolutních hodnotách teplot mohou být způsobeny nedostatečně přesným měřením teploty

(pouze desetiny stupně Celsia) nebo nedostatečně přesními vstupními termodynamickými daty, která budou ovlivněna chemickým denaturantem. Změnu mobility „cizího píku“, jak vzhledem k primerum, tak absolutní lze vysvětlit snad změnou vlastností separační matrice, která mohla být zapříčiněna kolísáním tlaku při plnění kapilár gellem. Předpoklad, že tato změna ovlivnila mobilitu všech duplexu totožným způsobem, se ukazuje jako oprávněný, neboť teplotní mapa vytvořená na základě změn migračních časů heteroduplexu dává za tohoto předpokladu stejný výsledek jako teplotní mapa vytvořená na základě homoduplexu.

Značný teplotní gradient mezi jedenáctou a dvanáctou řadou kapilár pramení z umístěných kapilár v temperovaném prostoru. Kapiláry dvanácté řady jsou částečně umístěny mimo proud teplého vzduchu, který vyhřívá temperovaný prostor, zatímco kapiláry jedenácté řady se nacházejí přímo v proudě vzduchu. Zvýšená teplota uprostřed kapilárního pole může pocházet z Joulova tepla okolních kapilár.

Transformační funkce využívá pouze jeden vnitřní standard – primer, u kterého se předpokládá chování odpovídající ssDNA. Pro lepší standardizaci, jenž by postihla i změnu vlastností separační matrice, by bylo vhodné používat dvoubodovou transformaci s druhým standardem na opačném konci rozsahu mobilit. Vhodným standardem by byl fragment DNA s GC-svorkou a s jednou nízkoteplotní doménou, která by byla již od nízkých teplot zcela roztátá. Nevýhodou druhého standardu jsou však vyšší náklady a kontaminaace vzorku.

Kapitola 7

Závěr

Výsledek předkládané práce představuje teoretický přístup k problematice denaturace DNA fragmentu a přináší nový pohled na teorii elektroforetické separace DNA s výskytem mutací a SNP.

1. Za použití approximace *nearest-neighbourhood* byly spočteny příspěvky nejbližšího okolí všech existujících SNP ke Gibsově energii tvorby homoduplexu a heteroduplexu.
2. Na základě approximace *nearest-neighbourhood* se podařilo vysvětlit různou vzájemnou mobilitu homoduplexních a heteroduplexních fragmentů v případě různých mutací v kodonech 12 a 13 genu K-RAS.
3. Byla optimalizována DCE separace MDR1 fragmentu. Jako optimální teplota separace byla určena hodnota 53.0 °C. Vyšší teplota než termodynamické optimum byla určena proto, aby homoduplexy neinterferovaly s „cizím pískem“, který byl ve všech případech přítomen jako artefakt PCR.
4. Byla nalezena transformační funkce, která umožňuje porovnávat elektroferogramy z různých kapilár multikapilárního pole. Funkce používá primer jako vnitřní standard a je založena na invariantu poměru mobilit primeru a duplexu při zvolené teplotě. Její validita byla prokázána při DCE separaci MDR1 fragmentu.
5. Na základě různých hodnot transformovaných migračních času homoduplexu v multikapilárním poli byla vytvořena jeho teplotní mapa.

Rozdíl mezi průměrnou teplotou „nejchladnější“ a „nejteplejší“ kapiláry činil 1.4°C .

Zjištěné skutečnosti představují úvodní poznatky sloužící k pochopení teoretických principů separace mutantní DNA. Získané poznatky o mechanismech, včetně některých semi-empirických výsledků, bude možné využít např. při experimentální optimalizaci DNA molekulárních markerů v klinické praxi a dále pro přenos téhoto metod z kapilární na mikročipovou platformu. Lze očekávat, že popsané teoretické principy najdou uplatnění i v případě jiných (ne-elektroforetických) metod založených na denaturaci DNA, např. high resolution melting analysis.

Literatura

- [1] Allawi, H. T.; SantaLucia, J., Jr.: Thermodynamics and NMR of Internal G-T Mismatches in DNA. *Biochemistry*, ročník 36, 1997: s. 10581-10594.
- [2] Allawi, H. T.; SantaLucia, J., Jr.: Nearest-Neighbor Thermodynamic Parameters for Internal A-C Mismatches in DNA: Sequence Dependence and pH Effects. *Biochemistry*, ročník 37, 1998: s. 9435-9444.
- [3] Allawi, H. T.; SantaLucia, J., Jr.: Nearest Neighbor Thermodynamic Parameters for Internal G-A Mismatches in DNA. *Biochemistry*, ročník 37, 1998: s. 2170-2179.
- [4] Allawi, H. T.; SantaLucia, J., Jr.: Thermodynamics of Internal C-T Mismatches in DNA. *Nucleic Acids Research*, ročník 26, 1998: s. 2694-2701.
- [5] Belenky, A.; Smisek, D. L.; Cohen, A. S.: Sequencing of antisense DNA analogues by capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, ročník 700, 1995: s. 137-149.
- [6] Bjørheim, J.; Ekstrøm, P. O.: Review of denaturant capillary electrophoresis in DNA variation analysis. *Electrophoresis*, ročník 26, 2005: s. 2520-2530.
- [7] Bjørheim, J.; Gaudernack, G.; Giercksky, K.-E.; Ekstrøm, P. O.: Direct identification of all oncogenic mutants in KRAS exon 1 by cycling temperature capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, ročník 24, 2003: s. 63-69.

- [8] Bjørheim, J.; Lystad, S.; Lindblom, A.; Kressner, U.; aj.: Mutation analyses of KRAS exon 1 comparing three different techniques: temporal temperature gradient electrophoresis, constant denaturant capillary electrophoresis and allele specific polymerase chain reaction. *Mutation Research*, ročník 403, 1998: s. 103–112.
- [9] Bjørheim, J.; Minárik, M.; Gaudernack, G.; aj.: Mutation Detection in KRAS Exon 1 by Constant Denaturant Capillary Electrophoresis in 96 Parallel Capillaries. *Analytical Biochemistry*, ročník 304, 2002: s. 200–205.
- [10] Blake, R. D.; Delcourt, S. G.: Thermodynamic effects of formamide on DNA stability. *Nucleic Acids Research*, ročník 24, 1996: s. 2095–2103.
- [11] Blake, R. D.; Delcourt, S. G.: Thermal stability of DNA. *Nucleic Acids Research*, ročník 26, 1998: s. 3323–3332.
- [12] Blossey, R.; Carlon, E.: Reparametrizing the loop entropy weights: effect on DNA melting curves. *Physical Review E*, ročník 69, 2003.
- [13] Bodor, M.; Kelly, E. J.; Ho, R. J.: Characterization of the Human MDR1 Gene. *AAPS Journal, The*, ročník 07, 2005: str. 01.
- [14] Bos, J. L.: *ras* Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Research*, ročník 49, 1989: s. 4682–4689.
- [15] Chiari, M.; Cretich, M.; Stastna, M.; Radko, S. P.; aj.: Rapid capillary coating by epoxy-poly-(dimethylacrylamide): Performance in capillary zone electrophoresis of protein and polystyrene carboxylate. *Electrophoresis*, ročník 22, 2001: s. 656–659.
- [16] Cotton, R. G. H.: Current methods of mutation detection. *Mutation Research*, ročník 285, 1993: s. 125–144.
- [17] Doktycz, M. J.; Morris, M. D.; Dormady, S. J.; Beattie, K. L.; aj.: Optical Melting of 128 Octamer DNA Duplexes. *The Journal of Biological Chemistry*, ročník 270, 1995: s. 8439–8445.
- [18] Fischer, S. G.; Lerman, L. S.: DNA fragments differing by single base-pair substitution are separated in denaturating gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, ročník 80, 1983: s. 1579–1583.

- [19] Friday, B. B.; Adjei, A. A.: K-ras as a target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, ročník 1756, 2005: s. 127–144.
- [20] Gundry, C. N.; Vandersteen, J. G.; Reed, G. H.; Pryor, R. J.; aj.: Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. *Clinical Chemistry*, ročník 49, 2003: s. 396–406.
- [21] Gödde, R.; Akkad, D.-A.; Arning, L.; Dekomien, G.; aj.: Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics – state-of-art, alternatives and future prospects. *Electrophoresis*, ročník 27, 2006: s. 939–946.
- [22] Hestekin, C. N.; Jakupciak, J. P.; Chiesl, T. N.; Kan, C. W.; aj.: An optimized microchip electrophoresis system for mutation detection by tandem SSCP and heteroduplex analysis for p53 gene exons 5–9. *Electrophoresis*, ročník 27, 2006: s. 3823–3835.
- [23] Hobza, P.; Řezáč, J.: On the nature of DNA duplex stability. (*připraveno k publikaci*).
- [24] Hoffmeyer, S.; Burk, O.; Richter, O. v.; Arnold, H. P.; aj.: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, ročník 97, 2000: s. 3473–3478.
- [25] Karger, B. L.: High-performance capillary electrophoresis. *Nature*, ročník 339, 1989: s. 641–642.
- [26] Khrapko, K.; Hanekamp, J. S.; Thilly, W. G.; Belenkii, A.; aj.: Constant denaturant capillary electrophoresis (CDCE): a high resolution approach to mutational analysis. *Nucleic Acids Research*, ročník 22, 1994: s. 364–369.
- [27] Kimchi-Sarfaty, C.; Oh, J. M.; Kim, I. W.; Sauna, Z. E.; aj.: A „silent“ polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, ročník 315, 2007: s. 456–457.
- [28] Minárik, M.; Mináriková, L.; Bjørheim, J.; Ekstrøm, P. O.: Cycling gradient capillary electrophoresis: A low-cost tool for high-throughput analysis of genetic variations. *Electrophoresis*, ročník 24, 2003: s. 1716–1722.

- [29] Minárik, M.; Mináriková, L.; Hrabíková, M.; Mináriková, P.; aj.: Application of cycling gradient capillary electrophoresis to detection of APC, K-ras, and DCC point mutations in patients with sporadic colorectal tumors. *Electrophoresis*, ročník 25, 2004: s. 1016–1021.
- [30] Nataraj, A. J.; Olivos-Glander, I.; Kusukawa, N.; Highsmith, J., W. Edward: Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, ročník 20, 1999: s. 1177–1185.
- [31] Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K.; aj.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, ročník 86, 1989: s. 2766–2770.
- [32] Pariat, Y. F.; Berka, J.; Heiger, D. N.; Schmitt, T.; aj.: Separation of DNA fragments by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide matrices. *Journal of Chromatography A*, ročník 652, 1993: s. 57–66.
- [33] Peyret, N.; Seneviratne, A. P.; Allawi, H. T.; SantaLucia, J., Jr.: Nearest-Neighbor Thermodynamics and NMR of DNA Sequence with Internal A·A, C·C, G·G and T·T Mismatches. *Biochemistry*, ročník 38, 1999: s. 3468–3477.
- [34] Poland, D.; Scheraga, H. A.: Occurrence of a phase transition in nucleic acid models. *Journal of Chemical Physics*, ročník 45, 1966: str. 1464.
- [35] Poland, D.; Scheraga, H. A.: Recursion relation generation of probability profiles for specific-sequence macromolecules with long-range correlations. *Biopolymers*, ročník 13, 1974: s. 1859–1871.
- [36] Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, ročník 74, 1977: s. 5463–5467.
- [37] SantaLucia, J., Jr.: A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, ročník 95, 1998: s. 1460–1465.

- [38] SantaLucia, J., Jr.; Allawi, H. T.; Ananda, S. P.: Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry*, ročník 35, 1996: s. 3555–3562.
- [39] Sheffield, V. C.; Cox, D. R.; ; Lerman, L. S.; aj.: Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, ročník 86, 1989: s. 232–236.
- [40] Tøstesen, E.: Partly melted DNA conformations obtained with a probability peak finding method. *Physical Review E*, ročník 71, 2005.
- [41] Tøstesen, E.; Jerstad, G. I.; Hovig, E.: Stitchprofiles.uio.no: Analysis of partly melted DNA conformations using stitch profiles. *Nucleic Acids Research*, ročník 33, 2005: s. w573–w576.
- [42] Tøstesen, E.; Liu, F.; Jenssen, T.-K.; Hovig, E.: Speed-up of DNA melting algorithm with complete nearest neighbor properties. *Biopolymers*, ročník 70, 2003: s. 364–376.
- [43] Watson, J. D.; Crick, F. H.: Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature*, ročník 171, 1953: s. 737–738.
- [44] Wittwer, C. T.; Reed, G. H.; Gundry, C. N.; Vandersteen, J. G.; aj.: High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LC-Green. *Clinical Chemistry*, ročník 49, 2003: s. 853–860.
- [45] Wu, Y.; Hayes, V. M.; Osinga, J.; Mulder, I. M.; aj.: Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturating gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, ročník 26, 1998: s. 5432–5440.
- [46] Xiao, W.; Oefner, P. J.: Denaturating High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Human Mutation*, ročník 17, 2001: s. 439–474.
- [47] Zhou, L.; Vandersteen, J.; Wang, L.; Fuller, T.; aj.: High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity. *Tissue Antigens*, ročník 64, 2004: s. 156–164.