

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Zuzana Líbalová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**POLYMORFISMUS GENŮ ABC TRANSPORTÉRŮ
VE VZTAHU K ONEMOCNĚNÍ KOLOREKTÁLNÍM
KARCINOMEM**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

PLZEŇ 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů. Všechny výsledky jsem získala vlastními laboratorními stanoveními na Ústavu biologie LF UK v Plzni.

V Plzni dne 28. 3. 2018.

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěla velice poděkovat Doc. RNDr. Martinovi Peštovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce, za čas, který mi věnoval, za cenné rady, odborné připomínky, poskytnutí materiálních podkladů a obrovskou podporu během psaní této práce.

Dále děkuji RNDr. Aleně Kučerové a RNDr. Kateřině Houfkové za jejich vstřícnost, pomoc a odborný dohled při práci v laboratoři. Děkuji jim také za možnost seznámení se s dalšími metodami prováděnými na Ústavu biologie LF UK v Plzni.

Anotace

Příjmení a jméno: Líbalová Zuzana

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Polymorfismus genů ABC transportérů ve vztahu k onemocnění kolorektálním karcinomem

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Počet stran – číslované: 52

Počet stran – nečíslované: 23

Počet příloh: 5

Počet titulů použité literatury: 33

Klíčová slova: ABC transportéry, kolorektální karcinom, CFTR, ASA PCR, DNA

Souhrn:

Cílem této práce bylo zjistit potenciální vliv mutace genu CFTR, člena rodiny ABC transportérů, na patogenezi kolorektálního karcinomu.

V teoretické části je nejprve popsána patogeneze nádorového onemocnění, další kapitola je věnována kolorektálnímu karcinomu, jeho patogenezi, diagnostice, klinickému průběhu a léčbě. Dále je popsána stavba a funkce ABC transportérů, zvláštní kapitola je věnována genu CFTR a cystické fibróze. Na závěr teoretické části jsou uvedeny nejčastější metody pro detekci mutací a polymorfismů genomové DNA a popis metody ASA PCR použité v praktické části práce.

Praktická část začíná definováním cílů a metodikou práce. Dále je popsán postup izolace DNA, PCR a analýzy amplifikovaných produktů elektroforézou. Následují naměřené hodnoty izolované DNA a výsledky stanovení mutace delF508 v genu CFTR u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Bakalářská práce je zakončena diskuzí metodických problémů a výsledků. Závěr shrnuje dosažené výsledky a dává další perspektivu výzkumu uvedené problematiky.

Annotation

Surname and name: Líbalová Zuzana

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Polymorphism of genes ABC transporters in relation to colorectal cancer disease

Consultant: Doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Number of pages – numbered: 52

Number of pages – unnumbered: 23

Number of appendices: 5

Number of literature items used: 33

Keywords: ABC transporters, colorectal carcinoma, CFTR, ASA PCR, DNA

Summary:

The purpose of this work was to investigate the potential impact of mutation of the CFTR gene, a member of ABC transporters, on the pathogenesis of colorectal cancer.

At the beginning of the theoretical part, the pathogenesis of cancer is described. The next chapter deals with colorectal carcinoma, its pathogenesis, diagnosis, clinical course and treatment. Then the ABC transporter's structure and function is described. A specific chapter is dedicated to the CFTR gene and cystic fibrosis. At the end of the theoretical part there are presented the most frequent methods for detection of genomic DNA mutations and polymorphisms and a description of the ASA PCR method used in the practical part of the thesis.

The practical part begins with the definition of the objectives and methodology of the work. The procedure of DNA isolation, PCR and analysis of amplified products by electrophoresis is described afterwards. Following are the measured values of isolated DNA and the results of delF508 mutation determination in the CFTR gene of patients with colorectal cancer.

The bachelor thesis ends with discussion of methodological problems and results. The conclusion summarizes the results and gives a further perspective to the research.

OBSAH

ÚVOD.....	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1 PATOGENEZE NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ	11
1.1 Obecná definice nádoru	11
1.2 Získané vlastnosti maligních nádorů podle D. Hanahana a R. A. Weinberga.....	11
1.2.1 Soběstačnost v produkci růstových signálů.....	11
1.2.2 Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus.....	11
1.2.3 Vyhnutí se apoptóze	12
1.2.4 Neomezený replikační potenciál	13
1.2.5 Posílení angiogeneze	14
1.2.6 Tvorba metastáz.....	14
1.2.7 Nestabilita genomu	15
1.3 Onkogeny a tumorsupresory	15
1.3.1 Onkogeny	15
1.3.2 Tumorsupresory	15
2 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM	17
2.1 Patogeneze kolorektálního karcinomu.....	17
2.1.1 Klasifikace kolorektálního karcinomu podle dědičnosti	17
2.1.2 Molekulární klasifikace kolorektálního karcinomu.....	18
2.2 Diagnostika kolorektálního karcinomu.....	20
2.3 Klinický průběh a léčba onemocnění kolorektálním karcinomem	21
3 ABC TRANSPORTÉRY	22
3.1 Role ABC transportérů v nádorovém růstu a léčbě onkologických onemocnění. 22	
3.2 Stavba a funkce ABC transportérů	22
3.3 Podrodiny ABC transportérů	23
3.3.1 ABCA podrodina	23
3.3.2 ABCB podrodina	23
3.3.3 ABCC podrodina	24
3.3.4 ABCD podrodina	24
3.3.5 ABCE a ABCF podrodina	24
3.3.6 ABCG podrodina	25
3.4 Protein CFTR.....	25
3.4.1 Obecná úloha a stavba proteinu CFTR.....	25
3.4.2 Gen CFTR	26
3.4.3 Mutace genu CFTR	26
3.5 Cystická fibróza	28
3.5.1 Epidemiologie.....	28

3.5.2	Patogeneze a klinické projevy	28
3.5.3	Diagnostika cystické fibrózy	30
3.5.4	Léčba cystické fibrózy	30
3.6	Role ABC transportérů v rezistenci na léčbu	31
3.6.1	Multidrug resistance (MDR)	31
3.6.2	Možné způsoby překonání MDR	31
4	METODY POUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ MUTACÍ A POLYMORFISMŮ DNA	33
4.1	Izolace DNA	33
4.2	Polymerázová řetězová reakce	33
4.2.1	PCR – RFLP	34
4.2.2	ASA PCR	34
4.2.3	Analýza produktů PCR	35
4.3	Sängerova metoda sekvenování – dideoxy metoda	35
4.4	Next generation sequencing	36
	PRAKTICKÁ ČÁST	37
5	CÍL PRÁCE	37
5.1	Metodika	37
5.2	Výzkumné otázky	38
6	IZOLACE DNA Z KRVE	39
6.1	Postup izolace DNA z krve	39
6.2	Měření koncentrace a čistoty izolované DNA	40
6.2.1	Postup měření koncentrace a čistoty DNA na přístroji Nanodrop 1000	41
7	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	42
7.1	Sekvence primerů použité v reakci A a reakci B	43
7.2	Postup PCR	44
8	ELEKTROFORÉZA	46
8.1	Postup analýzy produktů PCR pomocí elektroforézy	46
8.2	Ukázka praktického odečtení výsledků elektroforetického gelu	48
9	VÝSLEDKY	49
9.1	Izolace DNA	49
9.2	Stanovení mutace delF508	54
10	DISKUZE	59
11	ZÁVĚR	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ	57
	SEZNAM ZKRATEK	61
	SEZNAM TABULEK	64
	SEZNAM OBRÁZKŮ	65
	SEZNAM PŘÍLOH	66

ÚVOD

Onkologická onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí 5. až 6. dekády života. Konkrétně kolorektální karcinom je v České republice jedním z nejčastějších onkologických onemocnění a Česká republika v jeho incidenci zaujímá celosvětově přední pozici. Z genetického hlediska je nejčastějším typem sporadický kolorektální karcinom, avšak lze předpokládat, že v jeho patogenezi mohou hrát roli i v populaci běžné polymorfismy a mutace. A právě touto tematikou se zabývá tato bakalářská práce.

Cílem této práce je zjistit potenciální vliv mutace genu ABC transportéru, genu CFTR, na patogenezi kolorektálního karcinomu. V teoretické části se nejprve zabývám patogenezi onkologických onemocnění obecně, následně patogenezi kolorektálního karcinomu. Poté se věnuji skupině ABC transportérů, zvláště pak genu CFTR, zmiňuji cystickou fibrózu a na závěr teoretické části jsou uvedeny nejčastější metody pro detekci mutací a polymorfismů genomové DNA. V praktické části popisuji metody, které jsem použila a výsledky shrnují naměřené koncentrace izolované DNA a výsledky stanovení mutace delF508 v genu CFTR pacientů s kolorektálním karcinomem.

V této práci jsme vyšli z předpokladu, že čím nižší věk onkologického onemocnění (v tomto případě jsme zkoumali kolorektální karcinom), tím větší vliv genotypu, tedy vrozených polymorfismů a mutací. Proto, abychom zjistili možný vliv nejčastější mutace genu CFTR na patogenezi kolorektálního karcinomu, jsme provedli vyšetření této mutace jednak u skupiny mladých pacientů s kolorektálním karcinomem a jednak u skupiny pacientů starších než 65 let. Pokud by se potvrdil vliv této v populaci se často objevující mutace genu CFTR, její incidence ve skupině mladých pacientů by byla vyšší než u druhé skupiny.

TEORETICKÁ ČÁST

1 PATOGENEZE NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

1.1 Obecná definice nádoru

Nádor je nová abnormální tkáň, která roste neregulovaným způsobem a nemá fyziologickou funkci. Maligní nádor je nádor, který roste invazivně do okolí, infiltruje okolní tkáň a následně metastazuje. (Adam, 2003) Aby byl nádor schopen infiltrativního růstu a metastazovat, musí získat tyto vlastnosti, které definovali Douglas Hanahan a Robert A. Weinberg ve svém článku z roku 2000: soběstačnost v produkci růstových signálů, necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus, vyhnutí se apoptóze, neomezený replikační potenciál, posílení angiogeneze, tvorba metastáz, případně nestabilita genomu (viz. kapitola 1.2). Nádorová tkáň získává tyto vlastnosti mutacemi ve čtyřech základních genech, a to v genech, které řídí buněčnou proliferaci a diferenciaci, apoptózu, reparaci DNA a metabolismus. Když vznikne 4-6 mutací v těchto skupinách genů, potom se vyvíjí nádor. (Hanahan, 2000)

1.2 Získané vlastnosti maligních nádorů podle D. Hanahana a R. A. Weinberga

1.2.1 Soběstačnost v produkci růstových signálů

Normální buňky vyžadují pro přechod z klidového stavu (G0 fáze) do aktivního proliferativního stavu (G1 fáze) mitogenní růstové signály. Tyto signály jsou přenášeny do buňky transmembránovými receptory, které váží specifické třídy signalizačních molekul: difúzní růstové faktory, složky extracelulární matrix a adhezni molekuly. Podle doposud nabytých znalostí nemůže žádná normální buňka proliferovat bez přítomnosti růstového signálu. Mnoho nádorových buněk však dokáže tyto růstové signály samo produkovat, a tak se stávají nezávislými na okolním prostředí. Tímto chováním tak narušují přirozený systém tkáňové homeostázy, který odpovídá za správnou funkci buněk. (Hanahan, 2000)

1.2.2 Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus

Za normálních okolností udržují buňku v klidové fázi (G0 fázi) tzv. antiproliferativní signály. Tyto signály inhibují růst buňky a jsou přijímány

transmembránovými receptory buněčného povrchu spojenými s intracelulárními signalizačními obvody. Proliferaci mohou blokovat dvěma odlišnými mechanismy - buďto buňku přesouvají do G0 fáze, anebo do postmitotické fáze. V obou případech je růst buňky zastaven. Nádorové buňky mají k antiproliferativním signálům sníženou citlivost. Uchovávají si tedy svou proliferační aktivitu. (Hanahan, 2000)

V G1 fázi buněčného cyklu buňky monitorují své vnější prostředí a na základě zaznamenaných signálů rozhodují o tom, zda postoupí do S fáze nebo G0 fáze. Většina antiproliferačních signálů zasahuje signální dráhu obsahující protein retinoblastom (pRb) a jemu dva příbuzné proteiny - p107 a p130. Pokud je Rb protein v defosforylovaném stavu, blokuje transkripční faktor E2F, který řídí expresi genů nezbytných pro postup buňky z G1 fáze do S fáze. Po fosforylaci cyklin-dependentními kinasami je Rb protein inaktivní, tedy uvolňuje transkripční faktor E2F a tím umožňuje buněčnou proliferaci. Mutací v genu pro Rb protein se buňka tedy může stát rezistentní vůči přirozeným antiproliferačním signálům. (Hanahan, 2000)

Proces proliferace buněk však nezávisí pouze na vyhnutí se antiproliferačním signálům. Naše tkáň omezují množení buněk také tím, že je instruují, aby nenávratně vstoupily do postmitotických diferencovaných stavů. Nádorové buňky používají různé strategie, aby se vyhnuly této konečné diferenciaci. Jedna strategie zahrnuje onkoprotein Myc. Za fyziologických podmínek vyvolává komplex Mad-Max signály indukující diferenciaci. Pokud je však patologicky nadprodukován protein Myc, protein Mad je z komplexu vytěsněn a nahrazen proteinem Myc. Vzniká komplex Myc-Max, který má zcela jiný účinek na transkripci cílových genů a dochází tak ke zvratu procesu diferenciaci. (Hanahan, 2000)

1.2.3 Vyhnutí se apoptóze

Schopnost populací nádorových buněk přežít a dále expandovat je určena nejen rychlostí buněčné proliferace, ale také rychlostí zániku buněk. Hlavním mechanismem, který řídí zánik buněk, je apoptóza neboli programovaná buněčná smrt. Rezistence vůči apoptóze je charakteristickým znakem většiny nádorových buněk. (Hanahan, 2000)

Proces apoptózy je spouštěn různými fyziologickými signály (jako je např. poškození DNA, hypoxie apod.) a sestává z několika po sobě jdoucích kroků. Dochází k narušení buněčných membrán, rozložení cytoplazmatické i jaderné kostry,

vytlačování cytosolu, degradaci chromozomů a fragmentaci jádra. Celý proces probíhá v rozmezí 30-120 minut. Nakonec je mrtvá buňka pohlcena fagocyty. (Hanahan, 2000)

Nádorové buňky se stávají rezistentními vůči apoptóze nejčastěji mutací genu TP53. Protein p53 na DNA vyhledává poškozená místa a pokud takové místo najde, zastaví proces dělení, čímž dává prostor reparačním mechanismům. Pokud se však DNA neopraví, spouští se proces apoptózy. (Hanahan, 2000)

Dále může být snížená citlivost buňky k apoptóze zapříčiněna sníženou expresí či mutací tzv. receptorů smrti (např. receptoru Fas). Jak již název napovídá, tyto receptory po navázání ligandu spouštějí proces apoptózy. (Hanahan, 2000)

1.2.4 Neomezený replikační potenciál

Ačkoli tři výše zmíněné získané vlastnosti (soběstačnost v produkci růstových signálů, necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus a vyhnutí se apoptóze) vedou k nezávislosti buněčného růstu na signálech z okolí, nestačí to k vytvoření velkých buněčných populací, které zformují makroskopický nádor. Buňky totiž obsahují vnitřní mechanismus, který limituje jejich replikační potenciál. Aby vznikla velká buněčná populace tvořící makroskopický nádor, musí nádorové buňky tento mechanismus přerušit. (Hanahan, 2000)

Bylo prokázáno, že buňky v kultuře mají konečný replikační potenciál. Jakmile buněčná populace překročí určitý počet zdvojnásobení, zastaví svůj růst. Tento stav nazýváme senescence. Stav senescence lze obejít deaktivací dvou tumor supresorových genů - RB a TP53. Po deaktivaci tumor supresorových genů, které se za normálních okolností podílejí na kontrole buněčného cyklu a opravách DNA, se buňky mohou dále dělit, dokud nedojdou do tzv. stavu krize. Krizový stav se vyznačuje masivní smrtí buněk, která je důsledkem kumulace velkého množství chromozomálních abnormalit. (Hanahan, 2000)

Replikační potenciál buněk je určen telomerami, což jsou repetitivní sekvence na koncích chromozomů. Během replikace není za normálních podmínek možné nahradit koncový RNA primer, a proto se s každým replikačním procesem telomery zkracují. Normální buňky tedy mají omezený počet dělení, udává se zhruba 60-70 dělení. Jakmile buňka překročí tento kritický počet dělení, dochází k zastavení buněčného cyklu a senescenci. (Hanahan, 2000)

Nádorové buňky jsou schopny se vyhnout procesu zkracování telomer tím, že v důsledku získaných mutací aktivují enzym telomerázu. Telomeráza se skládá ze dvou podjednotek, z RNA podjednotky a TERT podjednotky. Ve většině lidských somatických buněk se gen pro podjednotku TERT neexprimuje, telomeráza tedy není aktivní. Nádorové buňky však schopnost exprese tohoto genu mají. Aktivovaná telomeráza jim pak zajišťuje úplnou replikaci obou konců chromozomu, a tak ke zkracování telomer nedochází. Nádorové buňky tedy získávají neomezenou schopnost dělení. (Hanahan, 2000)

1.2.5 Posílení angiogeneze

Kyslík a živiny dodávané cévami jsou rozhodující pro správné fungování buněk a jejich přežití. Proto je nutné, aby všechny buňky ve tkáni byly ve vzdálenosti maximálně 100 µm od krevní kapiláry. Během organogeneze je tato blízkost zajištěna koordinovaným růstem cév a parenchymu. Jakmile se však tkáň vytvoří, růst nových krevních cév, tedy proces angiogeneze, je omezen a přísně regulován. Nádorové buňky si proto při své proliferaci musí vyvinout angiogenní schopnost, jinak by se jim nedostávalo kyslíku a potřebných živin. (Hanahan, 2000)

Schopnost indukovat angiogenezi nádorové buňky získávají přes tzv. „angiogenní přepínač“. Přepnutím tohoto přepínače dojde k narušení rovnováhy mezi induktory a inhibitory angiogeneze. Tuto rovnováhu narušují nádorové buňky tím, že dokážou ve zvýšené míře produkovat řadu faktorů, které angiogenezi stimulují. Patří sem především FGF1/FGF2 (kyselý a bazický fibroblastový růstový faktor) a VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor). (Hanahan, 2000)

1.2.6 Tvorba metastáz

Dříve nebo později dojde během růstu většiny nádorů k uvolnění nádorových buněk z primárního nádoru. Tyto buňky napadají přilehlé tkáně a odtud putují lymfatickými nebo krevními cévami do vzdálených míst, kde zakládají nové kolonie, tzv. sekundární nádor neboli metastázu. Metastázy jsou až v 90 % příčinou úmrtí na rakovinu. Stejně jako buňky primárního nádoru, musí si i buňky sekundárního nádoru zachovat všechny již výše zmíněné funkce, aby byly schopny se dále rozvíjet. (Hanahan, 2000)

Vznik metastáz probíhá na základě tzv. metastatické kaskády. Ta se skládá z následujících procesů. Nejprve se nádorová buňka uvolní z primárního nádoru, poté

prostoupí skrz extracelulární matrix (ECM) a bazální membránu. Dále je unášena krevním či lymfatickým systémem na vzdálené místo v organismu. Tam opět prostupuje přes bazální membránu a ECM a zakládá ohnisko sekundárního nádoru. Celému procesu napomáhá zvýšená aktivita proteolytických enzymů a snížená adhezivita nádorových buněk či mutace v genech pro některé adhezivní molekuly (zejména E-kadherin), které za normálních okolností zajišťují fyzický kontakt mezi buňkami. (Hanahan, 2000)

1.2.7 Nestabilita genomu

Nestabilita genomu napomáhá k získání výše zmíněných vlastností důležitých pro vznik maligního nádoru. Charakterizují ji jednak genetické změny a jednak epigenetické změny. Genetickými změnami jsou mutace vlastní nukleotidové sekvence. Epigenetické změny jsou např. metylace, fosforylace, acetylace histonů. (Hanahan, 2000)

U maligních nádorů se nejčastěji setkáváme s mutacemi v genech pro opravy DNA, v genech ovlivňujících buněčný cyklus a v genech, které se podílejí na zajištění správné chromozomální segregace během mitózy. (Hanahan, 2000)

Zásadní mutací, která ovlivňuje možnosti nádorového růstu, je mutace v genu TP53, která je přítomna ve většině maligních nádorů. (Hanahan, 2000)

1.3 Onkogeny a tumorsupresory

Geny, jejichž deregulace vede k získání výše uvedených vlastností, můžeme rozdělit na onkogeny a tumorsupresory. (Adam, 2003)

1.3.1 Onkogeny

Onkogeny jsou geny, které podporují buněčný cyklus vpřed, inhibují apoptózu a reparace DNA. Pro onkogeny jsou charakteristické mutace získání funkce. Výsledný protein získává např. neomezenou aktivitu, neodpovídá inhibičním signálům nebo je ve zvýšené hladině, než by měl být. (Adam, 2003)

1.3.2 Tumorsupresory

Tumorsupresory jsou geny, které zpětnovazebně inhibují průchod buněčným cyklem, aktivují apoptózu a opravují DNA. Jsou pro ně typické mutace ztráty funkce. To znamená, že nejdříve je inaktivována první alela a následně v dalších buněčných generacích druhá alela. Gen poté přestane produkovat funkční protein. U hereditárních

nádorů člověk zdědí jednu mutovanou alelu. Jakmile je inaktivována druhá alela, dochází ke ztrátě funkce příslušného proteinu, což přispívá k patogenezi onkologického onemocnění. Protože je jedna mutovaná alela již zděděná, druhá mutovaná alela se během života objeví mnohem dříve než u sporadických nádorů. (Adam, 2003)

Tumorsupresory můžeme rozdělit na dvě skupiny – na tumorsupresory „gatekeepery“ a na tumorsupresory „caretakery“. Tumorsupresory z kategorie „gatekeepery“ regulují průchod buněčným cyklem. Zabraňují nekontrolovatelnému buněčnému růstu a zároveň podporují apoptózu. Řadíme mezi ně např. gen Rb či APC. (Adam, 2003)

Tumorsupresory z kategorie „caretakery“ udržují integritu genomu tím, že se podílejí na reparacích DNA. Opravami DNA zabraňují akumulaci mutací. Řadíme mezi ně např. gen BRCA1, BRCA2, MLH1 a MSH2. (Adam, 2003)

2 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

Kolorektální karcinom je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů a žen v České republice. Je to zároveň nejčastější nádorové onemocnění gastrointestinálního traktu (tvoří zde 98% všech maligních nádorů), většinou se objevující v rektu a sigmoideu. Častěji jsou tímto onemocněním postiženi muži, a to především v 6. a 7. dekádě života. Navzdory současným pokročilým metodám screeningu kolorektálního karcinomu (vyšetření na okultní krvácení ve stolici u obyvatel nad 50 let) je toto onemocnění diagnostikováno téměř u poloviny pacientů až v pozdějších stádiích, kdy bývá doprovázeno postižením lymfatických uzlin a vzdálenými metastázami. V této fázi je onemocnění obtížně léčitelné, a proto se stále zvyšuje snaha o zlepšení preventivních, diagnostických a léčebných procesů. (Holubec, 2004; Povýšil, 2007)

2.1 Patogeneze kolorektálního karcinomu

2.1.1 Klasifikace kolorektálního karcinomu podle dědičnosti

Z hlediska dědičnosti existují tři formy kolorektálního karcinomu – hereditární forma, sporadická forma s rodinným výskytem a čistě sporadická forma (bez výskytu v rodině). (Potter, 2009; Jablonská, 2000)

2.1.1.1 Hereditární forma

Hereditární forma tvoří 5-10 % všech CRC a je u ní pozorována autozomálně dominantní dědičnost. Mezi hereditární faktory, podílející se na vzniku onemocnění, řadíme především familiární adenomatózní polypózu a Lynchův syndrom. Lynchův syndrom se u hereditární formy objevuje s četností 75% a jedná se o onemocnění, které je způsobeno mutacemi v mismatch repair genech, konkrétně v genech: hMLH 1, hMSH 2, PMS 1, PMS 2 a dalších. (Potter, 2009; Jablonská, 2000)

Germinální mutace (mutace první alely) je přítomna ve všech buňkách jedince již od narození, je tedy zděděná od matky nebo od otce. Druhá alela má normální funkci, avšak je téměř 100% pravděpodobné, že se během života změní na mutovanou také. Díky tomu dojde ke ztrátě funkce genu a následně k promoci nádorové transformace. Hereditární forma CRC tak vzniká v mnohem nižším věku než forma sporadická, neboť pro projev onemocnění stačí jen jeden zásah během života. (Potter, 2009; Jablonská, 2000)

Genové změny u FAP a Lynchova syndromu vychází z modelu karcinogeneze Berta Vogelsteina, který karcinogenezi charakterizuje na histologické úrovni změn. Tyto změny jsou spojeny s mutací konkrétního genu. Na počátku se jedná o mutace FAP genu, čímž dochází k buněčné proliferaci. Dále dochází k mutaci mismatch repair genů a vzniká časný adenom. Mutace K-ras a ztráta tumorsupresorů DCC vedou ke vzniku pozdního adenomu. Na závěr vzniku karcinomu předchází mutace p53. (Potter, 2009; Jablonská, 2000)

2.1.1.2 Sporadická forma s rodinným výskytem

Sporadická forma CRC s rodinným výskytem se objevuje v 20-30 % všech případů. Jedná se o formu, u které nepozorujeme přímou autozomální dědičnost. Přesto však existují rodiny, u kterých se CRC vyskytuje častěji než v jiných rodinách. U těchto rodin se dědí jeden nebo více genů, které mohou být ve vazbě a způsobují větší náchylnost sliznice tlustého střeva k nádorovým transformacím. (Potter, 2009)

2.1.1.3 Čistě sporadická forma

Čistě sporadická forma je nejčastější formou CRC. Vyskytuje se v 65-75 % všech případů a nepozorujeme u ní přímou autozomální dědičnost. Mezi faktory, které napomáhají vzniku sporadické formy kolorektálního karcinomu, řadíme především nevhodný životní styl, a to zejména užívání alkoholu, kouření, nízký obsah nestravitelné rostlinné vlákniny v potravě, vysoký obsah cukrů a tuků v potravě a dále také nevhodný způsob úpravy stravy (grilování, uzení apod.). (Potter, 2009)

2.1.2 Molekulární klasifikace kolorektálního karcinomu

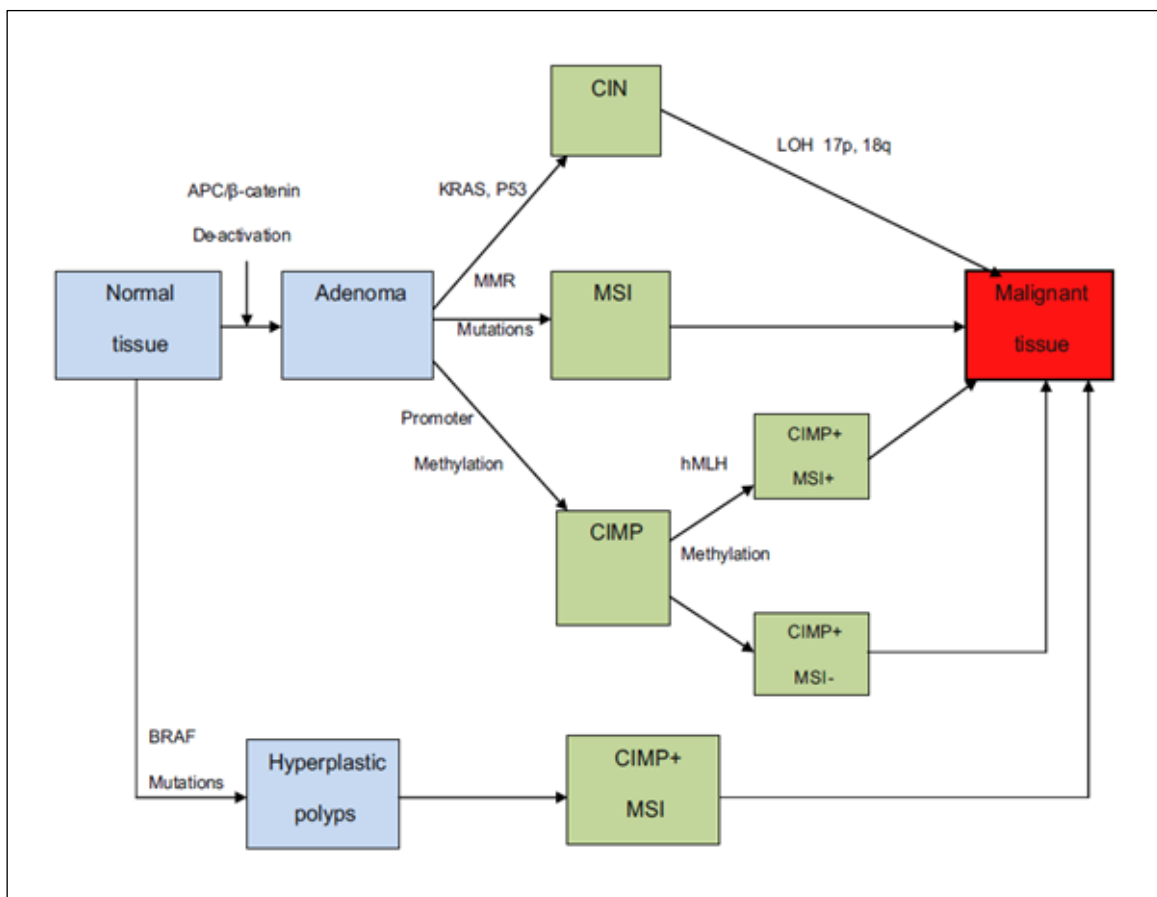
2.1.2.1 Původní Vogelsteinův model karcinogeneze

Z hlediska patogeneze byl CRC původně rozdělen na dva typy – mikrosatelitně stabilní a mikrosatelitně instabilní. Pokud byla přítomna mutace v MMR genech, jednalo se o mikrosatelitně instabilní typ, pokud mutace v MMR genech přítomna nebyla, jednalo se o mikrosatelitně stabilní typ. (Potter, 2009)

Přítomnost mutace v MMR genech se určuje pomocí stanovení tzv. mikrosatelitní instability. Mikrosatelity jsou zpravidla třínukleotidové repetice DNA, které mají tendenci se při replikaci zvětšovat. Pokud má člověk poruchu v MMR genech, můžeme toto zvětšování pozorovat, pokud ne, zvětšování nepozorujeme. (Potter, 2009)

2.1.2.2 Nový model karcinogeneze

Nový model molekulární klasifikace CRC znázorňuje následující obrázek.



Obrázek 1: Nový model molekulární klasifikace CRC

(Převzato z: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1479666X11000126-gr1.jpg>)

Normální tkáň se může změnit deaktivací APC/β-cateninu na adenom nebo mutacemi BRAF na hyperplastické polypy. Na základě dalších mutací se CRC rozdělují na: CIN, MSI, CIMP, CIMP+MSI. (Potter, 2009)

CIN (chromozomálně instabilní karcinom) se vyskytuje v 85% všech případů kolorektálních karcinomů a jsou pro něj typické mutace K-ras a p53. Tento typ charakterizují genomové změny (aneuploidie, polyploidie) a strukturální chromozomové aberace (translokace, delece) oblastí, které se podílejí na patogenezi CRC. (Potter, 2009; Král, 2016)

MSI (mikrosatelitně instabilní CRC) je rozdělen na dva podtypy – MSI-H (vysoká nestabilita mikrosatelitů) a MSI-L (nízká nestabilita mikrosatelitů). Pro MSI-H jsou charakteristické následující znaky: defekt MMR genu MLH1, ztráta funkce MLH1

způsobena metylací promotoru (na promotor poté nemohou nasednout transkripční faktory, není tedy transkribována mRNA), Crohn's-like lymfoidní reakce, silná infiltrace nádoru lymfocyty a nekróza tumoru. MSI-H mívá obecně dobrou prognózu a dobře reaguje na léčbu chemoterapeutiky. Pro MSI-L je charakteristická MGMT inaktivace (methylací promotoru či ztrátou genu) a statisticky kratší přežití. (Potter, 2009; Král, 2016)

CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) je typ, u kterého dochází k metylaci promotorů tumorsupresorů. Pokud je promotor genu metylován, nedochází k jeho expresi. Toto blokování exprese tumorsupresorů podporuje buněčnou proliferaci a přispívá k další patogenezi nádorového onemocnění. (Potter, 2009; Král, 2016)

2.2 Diagnostika kolorektálního karcinomu

Základní vyšetřovací metodou, která napomáhá stanovit diagnózu, je kolonoskopie. Jedná se o endoskopické vyšetření tlustého střeva. Součástí endoskopu je CCD senzor, který umožňuje snímání obrazu. Endoskop se postupně zavede konečníkem do celého tlustého střeva a při následném vytahování lékař střevo prohlíží a případně odebírá vzorky potenciální nádorové tkáně pro bioptické vyšetření. (Češka, 2010)

Dále se lékař může při stanovení diagnózy opřít o výsledky laboratorních testů. Laboratorní testy se zaměřují v první řadě na průkaz nádorových markerů typických pro onemocnění kolorektálním karcinomem. Mezi tyto markery patří především CEA a Ca 19-9. Je však nutné podotknout, že zvýšená hladina Ca 19-9 v séru se může objevit i u jiných onemocnění – např. u karcinomu či dokonce i benigním onemocnění žlučových cest. Je nutné tedy brát výsledky laboratorních testů pouze jako nápomoc při potvrzení domnělé diagnózy, případně mohou ovlivnit prognózu onemocnění. Vysoké hladiny CEA v séru poukazují na negativní prognózu dalšího vývoje onemocnění. (Češka, 2010)

Mezi další vyšetřovací metody související s diagnózou kolorektálního karcinomu můžeme zařadit prosté fyzikální vyšetření (napomáhá především u nádorů rekta), CT, RTG, MRI a ultrasonografii. (Češka, 2010)

2.3 Klinický průběh a léčba onemocnění kolorektálním karcinomem

Ve většině případů se u onemocnění kolorektálním karcinomem objeví časné klinické příznaky, například v podobě střevní obstrukce, neboť nádor obkrouží celou stěnu střeva a zamezí tak posunu tráveniny v něm. Tyto nádory bývají hlavně levostranné. Při časně diagnóze se volí jako léčba chirurgické odstranění nádoru, které může vést až k úplnému vyléčení. (Povýšil, 2007)

Některé nádory mohou být však dlouhou dobu klinicky němé (především pravostranné). Rostou jako nenápadné polypoidní útvary a nevyvolávají žádné vedlejší příznaky jako je například obstrukce průsvitu střeva. Tyto nádory jsou velice nebezpečné, protože k jejich diagnóze může dojít až v pozdější fázi onemocnění, kdy jsou přítomné i vzdálené metastázy poškozující jiné důležité orgány. U kolorektálního karcinomu můžeme najít metastázy především v játrech. V tomto případě je již nutná chemoterapie, a to buď celková, která postihne všechny buňky (i ty zdravé), anebo cílená, která je zaměřena přímo na nádorové buňky kolorektálního karcinomu. Při léčbě kolorektálního karcinomu je nejčastěji používaným celkovým chemoterapeutikem 5-fluoruracil a cíleným Cetuximab. (Povýšil, 2007)

3 ABC TRANSPORTÉRY

3.1 Role ABC transportérů v nádorovém růstu a léčbě onkologických onemocnění

ABC transportéry jsou odpovědné za průchod řady látek přes cytoplazmatickou membránu. Tyto látky mohou ovlivňovat stabilitu DNA a mohou být příčinou vzniku případných mutací. ABC transportéry tedy svou funkcí působí na proces karcinogeneze. Zároveň, protože ovlivňují intracelulární hladinu chemoterapeutik, mají zřejmě vliv i na účinek onkologické léčby. (Boumendjel, 2009; Kap, 2016)

ABC transportéry, které vyčerpávají z buňky xenobiotika, můžeme řadit do kategorie tumorsupresorů, ty, které ovládají metabolismus vápenatých iontů, můžeme zařadit mezi onkogeny. (Boumendjel, 2009; Kap, 2016)

3.2 Stavba a funkce ABC transportérů

ABC transportéry tvoří jednu z největších proteinových rodin a jsou základem mnoha důležitých biomedicínských jevů, včetně resistance nádorových buněk a patogenních mikrobů na léčiva. Jde o multidoménné integrální membránové proteiny, které využívají energii získanou hydrolýzou adenosintrifosfátu (ATP) k přenosu látek přes membránu buněk. Mezi substráty, které mohou být transportovány, patří ionty, aminokyseliny, peptidy, cukry a další molekuly, které jsou většinou hydrofilní. (Jones, 2004)

ABC transportéry jsou z hlediska funkce rozdělovány do tří skupin. ABC transportéry první skupiny zajišťují příjem látek směrem do buňky. Tato skupina transportérů se vyskytuje pouze u prokaryotních buněk. Druhou skupinou jsou tzv. exportéry – tedy transportéry, které realizují výdej látek z buňky. Jsou nalézány jak v prokaryotních, tak v eukaryotních buňkách a mají podobu transportních pump, které odstraňují toxiny a jiné látky z buňky. Třetí podskupina proteinů ABC nemá úlohu transportérů, ale spíše se podílí na translačních a opravných procesech molekuly DNA. (Davidson, 2008)

Všechny transportní proteiny z rodiny ABC transportérů sdílejí strukturální organizaci sestávající ze čtyř hlavních domén. Jde o dvě transmembránové (TMD) domény a dvě cytosolové (NBD) domény. Domény TMD mají schopnost měnit svou orientaci,

směřují buď směrem dovnitř anebo směrem ven. Toto střídání orientace je poháněno štěpením ATP. ATP se váže na podjednotky NBD a jeho hydrolyzou vzniká energie potřebná pro změnu orientace domén TMD. (Lodish, 2013)

TMD domény jsou typicky sestaveny z alfa helixů vložených do membránové dvojvrstvy, přes kterou může určitá látka procházet. Stavba TMD domén je variabilní, což odráží chemickou rozmanitost substrátů, které lze přemístit. Struktura domén TMD tedy určuje specificitu každého ABC proteinu. Při konformaci směřující dovnitř je vazebné místo na doméně TMD otevřené přímo k okolním vodným roztokům. Na toto místo se poté látky navážou a po změně konformace směrem ven se látky uvolní do exoplazmatického listu membrány či přímo do extracelulárního média. (Lodish, 2013)

3.3 Podrodiny ABC transportérů

3.3.1 ABCA podrodina

Podrodina ABCA se skládá z 12 transportérů rozdělených do dvou podskupin. První podskupina je kódována sedmi geny umístěnými na šesti různých chromozomech. Jedná se o transportéry ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA7, ABCA12 a ABCA13. Druhá podskupinou jsou transportéry ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9 a ABCA10. Všechny geny transportérů druhé podskupiny jsou uspořádány na chromozomu 17q24. (Dean, 2001)

Podskupina ABCA1 je zapojena do vývoje genetických onemocnění. Při recesivní Tangierově nemoci je protein ABCA1 mutován. Gen ABCA4 je umístěn na chromozomu 1 v oblasti p21. Tento gen je vysoce exprimovaný u tyčinkových fotoreceptorů a je mutován u Stargardtové choroby, recesivní retinis pigmentosy a většiny recesivních dystrofií tyčinkových fotoreceptorů. (Dean, 2001)

3.3.2 ABCB podrodina

Podskupina ABCB se skládá ze čtyř úplných transportérů a dvou polovičních. Jde o jedinou lidskou podskupinu, která má poloviční i úplné typy transportérů. ABCB1 byl objeven jako protein, který byl nadměrně exprimován v některých nádorových buňkách rezistentních na léky. Uplatňuje se především v hematoencefalické bariéře a v játrech. Předpokládá se, že se podílí na ochraně buněk před toxiny. Buňky, které nadměrně

exprimují tento protein, vykazují rezistenci vůči více léčivům (multidrug resistance). (Dean, 2001)

3.3.3 ABCC podrodina

Podskupina ABCC obsahuje třináct členů a devět z těchto transportérů je označováno jako Multidrug Resistance Proteins (MRP). MRP se nacházejí v celé přírodě a zprostředkovávají mnoho důležitých funkcí. (Chen, 2011) Je známo, že se podílejí na transportu iontů, sekreci toxinů a signální transdukci. Z devíti MRP mají čtyři z nich - MRP4, 5, 8 a 9 (ABCC4, 5, 11 a 12) - typickou ABC strukturu se čtyřmi doménami. Dvě domény jsou membránové (TMD) a každá z nich je následována nukleotidovou vazebnou doménou (NBD). Jsou označovány jako krátké MRP. Zbývajících 5 MRP (MRP1, 2, 3, 6, 7 (ABCC1, 2, 3, 6 a 10) je známo jako dlouhé MRP a obsahují další pátou doménu na svém N konci. (Dean, 2001)

CFTR, transportér podílející se na onemocnění cystickou fibrózou, je také považován za součást této podčeledi. Cystická fibróza nastává po mutaci a ztrátě funkce CFTR. (viz. kapitola 3.4 a 3.5) Též receptory sulfonylmočoviny (SUR), které se účastní sekrece inzulínu, funkce neuronů a funkce svalů, se řadí do této skupiny proteinů. Mutace v proteinech SUR jsou potenciální příčinou neonatálního diabetes mellitus. SUR je zároveň vazebným místem pro léčiva jako je např. diazoxid. (Dean, 2001)

3.3.4 ABCD podrodina

Podskupina ABCD se skládá ze čtyř genů, které kódují poloviční transportéry obsažené výhradně v peroxisomech. ABCD1 je zodpovědný za X-spojenou formu adrenoleukodystrofie (ALD), což je onemocnění charakterizované neurodegenerací a nedostatečností nadledvinek a je typicky zahájeno v pozdním dětství. Buňky pacientů s ALD vykazují akumulaci nerozvětvených nasycených mastných kyselin, ale přesná role ABCD1 v procesu stále není objasněna. Také funkce jiných genů ABCD ještě nebyla stanovena, ale předpokládá se, že mají související funkce v metabolismu mastných kyselin. (Dean, 2001)

3.3.5 ABCE a ABCF podrodina

Do obou podskupin patří geny kódující proteiny s vazebnou doménou pro ATP. Tyto geny nekódují transmembránové domény. Podskupina ABCE má pouze jednoho

zástupce - OABP (ABCE1), u něhož byla popsána schopnost rozpoznávat některé oligodendrocyty produkované v reakci na konkrétní virové infekce. Každý člen podskupiny ABCF sestává z dvojice vazebných domén ATP. (Dean, 2001)

3.3.6 ABCG podrodina

Tuto podrodinu tvoří šest polovičních transportérů s ATP vazebnými místy na N-konci a transmembránovými doménami na C-konci. Tato orientace je opačná oproti všem ostatním ABC genům. V lidském genomu existuje pouze 5 genů ABCG, ale v genomu *Drosophelia* je jich 15 a v kvasinkách 10. Gen ABCG2 byl objeven v buněčných liniích vybraných pro vysokou rezistenci vůči mitoxantronu, bez exprese ABCB1 nebo ABCC1. ABCG2 dokáže exportovat anthracyklinové protirakovinné léky jako je např. topotekan, mitoxantron nebo doxorubicin. Bylo zjištěno, že chromozomální translokace způsobují amplifikaci nebo přeskupení ABCG2 v rezistentních buněčných liniích. Normální funkce ABCG2 prozatím není známa. (Dean, 2001)

3.4 Protein CFTR

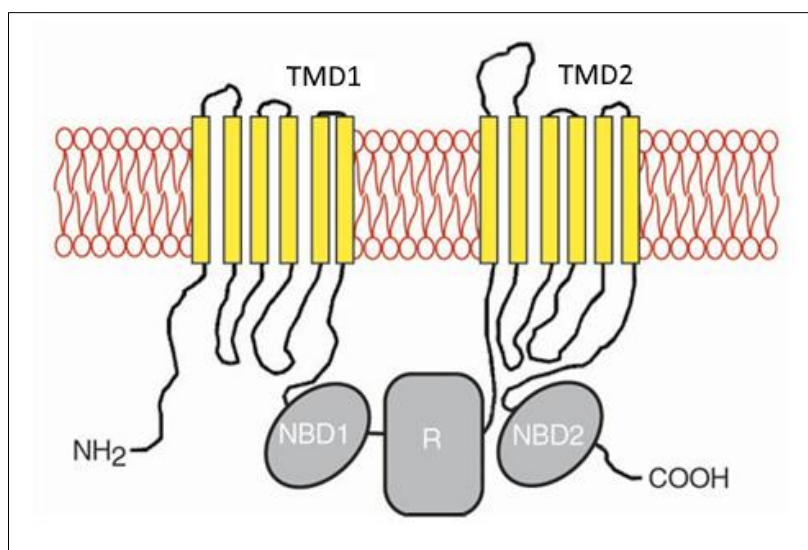
Ve své práci se zaměřuji na polymorfismy genu CFTR a jejich vliv na vznik či léčbu kolorektálního karcinomu. Tomuto ABC transportéru tedy věnuji samostatnou kapitolu.

3.4.1 Obecná úloha a stavba proteinu CFTR

Protein CFTR je ABC transportér umožňující přesun iontů (zejm. Cl⁻) a vody přes membrány epiteliálních buněk. Pro svou funkci vyžaduje přítomnost cAMP, protein kinasy A a jako zdroj energie ATP. Tento protein se nachází ve všech tkáních lidského těla, kromě tkáně nervové. Mutací genu, a tedy poškozením jeho funkce, tak dochází k tzv. multiorgánovému onemocnění. Cystická fibróza se nejvíce projevuje postižením plic, slinivky břišní, potních žláz a reprodukčních orgánů. (Farinha, 2017)

Protein CFTR je tvořen pěti doménami. Dvě domény jsou membránové (TMD) a každá z nich následována nukleotidovou vazebnou doménou (NBD). Pátou doménou je tzv. regulační doména (R). (Farinha, 2017)

Strukturu proteinu CFTR zachycuje následující obrázek.



Obrázek 2: Struktura proteinu CFTR

(Převzato z: http://www.genet.sickkids.on.ca/image/cf_domain.jpg)

3.4.2 Gen CFTR

Gen CFTR je lokalizován na dlouhém raménku sedmého chromozomu (7q31.2). Je 250 tis. bp dlouhý a obsahuje 27 exonů – částí, které se přepisují při transkripci DNA do molekuly mRNA, o velikosti 6,5 tis. bp. (Farinha, 2017)

Během translace je na základě informace obsažené v mRNA vytvořen protein, který podléhá potranslačním modifikacím (glykosylace). Výsledný protein je poté umístěn do buněčné membrány epitelálních buněk. (Farinha, 2017)

3.4.3 Mutace genu CFTR

V genu CFTR bylo nalezeno přes 1500 mutací. Mutace mohou být nejrůznějšího typu, např. delece, inserce či substituce. Tyto změny poté mohou způsobit posun čtecího rámce (tzv. frameshift mutace), předčasné ukončení translace proteinu (tzv. non-sence mutace) nebo změnu struktury proteinu (tzv. missence mutace). Většina mutací genu CFTR je raritních. Významných mutací, u kterých byla prokázána souvislost s onemocněním cystickou fibrózou, je sedm. Nejčastější mutací je mutace delF508, která je detekována až u 66 % pacientů s cystickou fibrózou. (Fila, 2014)

Možnou souvislost mezi změnami exprese genu CFTR, na něž má nefunkčnost jedné alely zřejmě vliv (v naší studii delF508), ukazuje např. práce „*ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly form a new hallmark of cancer*“ (Dvořák, 2017).

Nejvýznamnější mutace genu CFTR rozdělujeme podle typu do pěti tříd (třída I-V). Třída I zahrnuje mutace, které zapříčiní vznik stop kodonu a tedy předčasné ukončení syntézy proteinu. Tyto mutace nazýváme non-sence mutace. Výsledný produkt je pak v důsledku této změny nefunkční. Mutací I. třídy je mutace G542X. (Fila, 2014)

Do třídy II řadíme mutaci delF508, která je nejčastější mutací genu CFTR. V důsledku této mutace má výsledný protein nesprávný tvar a je proto degradován proteolýzou. (Fila, 2014)

Mutace G551D je mutací III. třídy. Touto mutací vzniká nefunkční NBD1 doména. Gen je transkribován, dochází k translaci i k následným potranslačním úpravám, ale výsledný produkt, který je umístěn do membrány epitelálních buněk, je v důsledku mutace nefunkční. (Fila, 2014)

IV. třída zahrnuje mutaci R347P. Tato mutace způsobuje sníženou vodivost CFTR kanálu pro chloridové ionty. (Fila, 2014)

Do poslední V. třídy řadíme mutaci 3849+10kb. Tuto mutaci nazýváme tzv. sestřihovou (splicing) mutací, neboť dochází k částečně nesprávnému sestřihu mRNA. Část mRNA je poté defektní a v epitelálních buňkách je tak sníženo množství funkčního proteinu CFTR. (Fila, 2014)

Nejčastější mutací genu CFTR v České republice je stejně jako celosvětově mutace delF508. V České republice se u nemocných cystickou fibrózou objevuje s četností 71,57%. Dalšími mutacemi jsou mutace CFTRdele2,3(21kb), G551D, N1303K, G542X, 1898+1GtoA, 2143delT, R347P a W1282X. Tyto ostatní mutace se však v České republice neobjevují s frekvencí vyšší než 5%. (Fila, 2014)

V praktické části své práce se zaměřuji na stanovení nejčastější mutace genu CFTR, mutace delF508.

3.5 Cystická fibróza

Mutací obou alel genu CFTR (nejčastěji $\Delta F508$) vzniká onemocnění cystická fibróza. Gen CFTR je umístěn na dlouhém raménku 7. chromozomu, jedná se tedy o autozomálně dědičné onemocnění. Dědí se recesivně, pro projev onemocnění je proto nutné, aby byly mutované obě alely. Pojmenování cystická fibróza vzniklo na základě faktu, že během onemocnění vznikají cysty ve slinivce a dochází k její fibróze. (Horsley, 2015)

3.5.1 Epidemiologie

Incidence cystické fibrózy je geograficky závislá. Nejčastěji se objevuje u evropské populace, v západní Evropě je nejčastější genetickou vadou, která se podílí na zkrácení lidského života. Incidence cystické fibrózy se v evropské populaci udává kolem 1:2500 až 1:4500. (Horsley, 2015)

3.5.2 Patogeneze a klinické projevy

Protein CFTR funguje jako chloridový kanál na apikální membráně buněk. V důsledku onemocnění cystickou fibrózou dochází k poruše transportu iontů tímto kanálem. V buňkách se poté hromadí chloridy, a protože je nutné, aby byla zachována elektroneutralita, do buněk se začne nadměrně absorbovat sodík. Sodík s sebou při transportu do buňky strhává také pasivně vodu, čímž se mění složení a především vazkost buněčných sekretů. Hlen je dehydratován a je tedy hustší, což má za následek většinu klinických projevů. (Horsley, 2015)

Cystická fibróza je multiorgánové onemocnění. Největší význam má postižení plic, které je nejčastější příčinou smrti v souvislosti s cystickou fibrózou. Dále se toto onemocnění výrazně projevuje také v gastrointestinálním traktu, v endokrinním a reprodukčním systému. V další části své práce se zaměřuji na popis projevů onemocnění ve dvou nejvíce postižených systémech – respiračním a gastrointestinálním. (Horsley, 2015)

3.5.2.1 Respirační projevy

Symptomy onemocnění spojené s dýchacími obtížemi vznikají v důsledku ucpání dýchacích cest příliš hustým hlenem a následným vznikem zánětu. Zánět a infekce způsobují poškození a strukturální změny plic, což vede k různým příznakům. V počátečním stádiu je časté neustálé vykašlávání, zvýšená produkce hlenu a potíže

s dýcháním. Často se také objevuje pneumonie, kterou způsobují bakterie, které se nekontrolovaně množí v hustém hlenu. Nejčastějšími původci bakteriálních infekcí u pacientů s cystickou fibrózou jsou *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* a *Pseudomonas aeruginosa*. (Horsley, 2015)

V pozdějších fázích onemocnění dochází ke změnám struktury plic, objevuje se bronchiektázie a stupňují se potíže s dýcháním. Mezi další příznaky patří vykašlávání krve (hemoptýza), vysoký krevní tlak v plicích (plicní hypertenze), srdeční selhání, potíže spojené s nedostatkem kyslíku v těle (hypoxie) a selhání dýchání vyžadující podporu dýchacích masek či přístrojů. (Horsley, 2015)

Cystická fibróza často rozvíjí i jiné typy plicních onemocnění. Mezi ně patří např. alergická bronchopulmonární aspergilóza, infekce bakterií *Mycobacterium avium* (původce tuberkulózy), která může způsobit vážné poškození plic. Lidé postižení cystickou fibrózou jsou také náchylnější ke vzniku pneumotoraxu. (Horsley, 2015)

3.5.2.2 Gastrointestinální projevy

Mezi gastrointestinální projevy onemocnění cystickou fibrózou patří tzv. mekonium ileus. Jedná se o stav, při kterém dochází k obstrukci střeva mekoniem. Mekonium je tzv. „první stolice“ novorozenců, kterou tvoří odloupané epitelie, žlučová barviva a hlen. Mekonium ileus se objevuje u 90 % novorozenců s cystickou fibrózou. (Kumar, 2007)

Dalším projevem cystické fibrózy je blokáce transportu trávicích enzymů ze slinivky břišní do duodena (prvního úseku tenkého střeva). Hromadění trávicích enzymů ve slinivce břišní způsobuje její nenávratné poškození, často s bolestivým zánětem (pankreatitidou). Zároveň v důsledku nedostatku trávicích enzymů v tenkém střevě dochází k potížím při absorpci živin, tato porucha je známá jako malabsorpce. Malabsorpce vede k podvýživě a špatnému růstu a rozvoji. Výsledná hypoproteinemie může být natolik závažná, že způsobí generalizovaný edém. Jedinci s cystickou fibrózou mají také potíže se vstřebáváním vitamínu A, D, E a K, což jsou vitamíny rozpustné v tucích. (Kumar, 2007)

3.5.3 Diagnostika cystické fibrózy

Cystická fibróza může být diagnostikována mnoha různými metodami, jako je např. screening novorozenců, testování potu a genetické testování. Díky novorozeneckému screeningu se často podaří toto onemocnění zachytit již krátce po narození. (Horsley, 2015)

Někdy se stane, že rodič přijde za lékařem s tím, že jeho dítě chutná slaně. To je způsobeno větší koncentrací chloridů v jeho potu. Test potu je také nejčastějším způsobem, jakým se cystická fibróza diagnostikuje. Probíhá tak, že se nejprve iontoforézou stimuluje pocení na předloktí pacienta, následně se pot odebere do kapiláry a provede se analýza na abnormální množství chloridů a sodíku. Lidé s cystickou fibrózou mají množství chloridů a sodíku v potu zvýšené. (Horsley, 2015)

U těhotných žen nebo párů, které plánují těhotenství, se může provést testování mutace genu CFTR, aby se určilo riziko, že se jejich dítě narodí s cystickou fibrózou. Testování se obvykle provádí nejdříve u jednoho nebo obou rodičů, a pokud je riziko cystické fibrózy vysoké, provádí se testování plodu. Vzhledem k tomu, že cystická fibróza je onemocněním autozomálně recesivním a k projevu onemocnění u dítěte je tedy nutné, aby nositeli mutace genu CFTR byli oba rodiče, testování se často provádí jen u jednoho z rodičů. Zároveň se provádí pouze na nejčastější typ mutace, a to delF508. (Horsley, 2015)

3.5.4 Léčba cystické fibrózy

Léčba cystické fibrózy je jak symptomatická, tak v současnosti kauzální ve smyslu reaktivace funkce proteinu CFTR. Symptomatická léčba spočívá v boji s infekcí a opatřeními zajišťujícími průchodnost dýchacích cest. Podává se větší množství živin a vitamínů rozpustných v tucích. Důležitá je také substituce pankreatických enzymů. (Horsley, 2015)

Důležitou prevencí vážnějšího poškození dýchacích cest je očkování (zejména proti chřipce), časná antibiotická léčba vzniklých infekcí, podpora vykašlávání hlenu (léky, pomůcky), zředování hlenu, kyslíková léčba. Krajním řešením vážnějšího poškození plic může být transplantace plic. (Horsley, 2015)

3.6 Role ABC transportérů v rezistenci na léčbu

3.6.1 Multidrug resistance (MDR)

Schopnost buněk (nebo obecně organismu) odolávat léčbě pomocí strukturálně odlišných léčiv nazýváme multidrug resistance (MDR), přeložíme-li do češtiny – mnoholéková rezistence. Jde o vážný problém v léčbě rakovinových a infekčních onemocnění. Fakt, že MDR je velice často pozorovaným jevem, je překvapující, neboť je v rozporu se základním principem, že užíváním kombinace strukturálně odlišných léčiv by se mělo zabránit vzniku resistantní reakce. Je prokázáno, že ABC transportéry hrají klíčovou roli při rozvoji MDR. Tato rezistence je způsobena několika faktory. Jedním z nich je zvýšené vyloučení léku z buňky transportéry ABC. (Boumendjel, 2009)

Při výdeji léků potlačujících nádor z buněk se uplatňují především transportéry ABCB1, ABCC1 a ABCG2. (Leonard, 2013)

3.6.2 Možné způsoby překonání MDR

Problémy s MDR lze řešit dvěma způsoby, a to buď použitím zcela jiných léčiv, které nemají vazebnou schopnost k ABC transportérům či inhibicí ABC transportérů samotných. Využitím jiných typů léčivých přípravků se podaří obejít odporový mechanismus ABC transportérů. Léky, které nefungují jako substrát transportérů ABC, totiž nemohou být transportovány. Druhou možností je kombinace inhibitorů ABC transportérů a protinádorových léčiv současně. Tím by se zvrátila odolnost proti protinádorovým lékům tak, aby mohly fungovat podle původního plánu. Substráty, které mají schopnost zvrátit odolnost proti protinádorovým lékům, se nazývají chemosenzibilizátory. (Choi, 2005)

Vzhledem k rozsáhlé vazebné schopnosti ABC transportérů bylo nalezeno velké množství substrátů s vysokou afinitou, které podporují cytotoxický účinek protinádorových léčiv příbuzných MDR zabráněním jejich exportu z buněk. (Kozovska, 2014)

První generace inhibitorů P-gp jsou léky, které se již používají k léčbě jiných zdravotních stavů. Zahnuje sloučeniny s různou strukturou a funkcí, jako jsou blokátory vápníkových kanálů (verapamil), imunosupresiva (cyklosporin A), antibiotika (erytromycin), antimalarika (chinin) nebo anti-steroidy (tamoxifen). Vzhledem k tomu, že tyto látky nebyly speciálně vyvinuty pro inhibici MDR, jsou spojeny také s řadou

problémů, a to především s vysokou toxicitou a nízkou účinností v tolerovatelných dávkách. (Kozovska, 2014)

Inhibitory druhé generace, jako jsou valsopodar, biricodar a dexniguldipin, byly syntetizovány za účelem zvýšení afinity k P-gp a současně snížení toxicity. Nicméně snížená clearance protirakovinného léčiva vedla ke zvýšení toxicity v případech, kdy léčivo i modulátor byly substráty pro cytochrom P450 3A. (Kozovska, 2014)

Inhibitory třetí generace, jako je zosuquidar, tariquidar, elacridar a ontogen, byly speciálně navrženy tak, aby měly vysokou afinitu k P-gp a nízké farmakokinetické interakce. (Kozovska, 2014)

4 METODY POUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ MUTACÍ A POLYMORFISMŮ DNA

4.1 Izolace DNA

Historicky se používají dva přístupy k izolaci molekul DNA. První (starší) přístup je izolace DNA na základě tzv. Millerovy izolační metody. Tato metoda spočívá v tom, že přidáním nasyceného roztoku NaCl ke vzorku dojde k vysolení buněčných proteinů. K pročištění vzorku se poté používá 96-100% alkohol. Na závěr se vzorek promyje 70% etanolem a po odpaření etanolových par se DNA rozpustí ve vodném roztoku s pufrům (obvykle Tris-HCl) a EDTA, což je inhibitor nukleáz. (Miller, 1988)

V současnosti se v klinické praxi používá téměř výhradně druhý způsob, a to izolace nukleových kyselin adhezí na silikátovou membránu. Nejprve se pomocí Proteinasy K rozloží makromolekulární proteinové komplexy, což má za následek uvolnění DNA do roztoku. Po inkubaci se směs přenesse do zkumavky s kolonkou, na které se nachází silikátový filtr. Na tomto filtru se při následné centrifugaci zachytává DNA, přičemž vhodné podmínky pro vazbu DNA na kolonku navodí specifický pufr. Po záchytu DNA na kolonku se opakovaným promytím zbavíme nežádoucích bílkovin. Konečné přidání elučního pufru umožní odpoutání DNA od kolonky a její stabilizaci. (Qiagen – DNeasy Blood & Tissue Handbook, 2006)

V současnosti jsou v klinických laboratořích FN Plzeň nejpoužívanější soupravy firem Qiagen a Macherey-Nagel. Ve své bakalářské práci jsem zvolila soupravu firmy Qiagen. Podrobný popis postupu izolace soupravou Qiagen je uveden v kapitole 6.1.

4.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je technika, která se používá k amplifikaci cílové sekvence DNA pomocí páru primerů. Primery jsou krátké fragmenty DNA obsahující sekvence komplementární k cílové oblasti. Spolu s DNA polymerázou (po níž je metoda pojmenována) jsou klíčovými komponenty umožňujícími selektivní a opakovanou amplifikaci. (Shafique, 2012)

Obecně platí, že proces PCR se skládá z 30 až 40 cyklů a každý cyklus zahrnuje tři kroky: denuraci, annealing a elongaci. V denuračním kroku se dsDNA rozděluje na dvě

ssDNA přerušением vodíkových můstků zapříčiněným vysokou teplotou (92-96 °C). (Varma, 2017) Druhým krokem je annealing. V tomto kroku se reakční teplota sníží na 50 až 65 °C po dobu 20 až 40 sekund, což umožňuje nasednutí primerů na jednovláknovou DNA. Na hybridní primer - templát se poté váže DNA polymeráza, která zahajuje syntézu DNA. V posledním kroku (elongaci) se teplota opět zvýší na 75-80 °C a dochází k polymeraci. DNA polymeráza syntetizuje ve směru od 5' konci ke 3' konci nový řetězec DNA, který je komplementární k templátu. (Shafique, 2012)

Reakce se provádí ve 35 až 40 cyklech ve speciálních zařízeních zvaných termocyclery, které jsou schopny podle předem stanoveného programu automaticky měnit teplotu. Výsledkem PCR reakce je exponenciální zmnožení cílové sekvence DNA. (Shafique, 2012)

Pomocí PCR můžeme stanovit delece nebo amplifikace většinou více než jednoho nukleotidu. Amplifikovaný produkt analyzujeme pomocí elektroforézy, která umožní stanovit délku amplifikovaných fragmentů. Porovnáním pozice amplifikovaných fragmentů s markerem (žebříček; fragmenty DNA o známé velikosti) nám umožní určit velikost amplifikovaných fragmentů v párech bází (bp), což nám umožní odhalit přítomnost delecí či amplifikací v sledovaném úseku DNA. (Shafique, 2012)

4.2.1 PCR – RFLP

Další metoda umožňující odhalit změny v sekvenci DNA, zejména jedno a několika nukleotidové polymorfismy, je metoda PCR – RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism). Metoda je založena na amplifikaci sekvence DNA, ve které polymorfismus hledáme, pomocí PCR. Vzniklé amplikony se štěpí na fragmenty specifickou restrikční endonukleázou. Fragmenty jsou poté separovány podle velikosti pomocí agaróзовé nebo gelové elektroforézy. (Varma, 2017)

4.2.2 ASA PCR

Alelově specifická polymerázová řetězová reakce (ASA PCR), známá také jako amplifikační refrakční mutační systém (ARMS) nebo PCR amplifikace specifických alel (PASA), je metoda založená na PCR, která může být použita k detekci známých SNP. Kombinuje cílovou amplifikaci a analýzu genotypu v jediném kroku. Během alelově specifické polymerázové řetězové reakce jsou specifické primery navrženy tak,

aby umožňovaly amplifikaci DNA polymerázou pouze tehdy, pokud nukleotid na 3'-konci primeru dokonale doplňuje bázi variantní nebo wild type sekvence. (Darawi, 2013)

4.2.3 Analýza produktů PCR

Nejčastějším způsobem analýzy produktů PCR je rozdělení fragmentů podle délky pomocí elektroforézy (fragmentační analýza). Elektroforéza je elektromigrační separační metoda, která využívá rozdílné pohyblivosti částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Nabitě látky rozpuštěné v elektrolytu se v elektrickém poli pohybují konstantní rychlostí, která je úměrná velikosti jejich náboje. Během elektroforézy se uplatňuje také vliv tření, tedy velikosti a tvaru molekuly. Při dělení nukleových kyselin pomocí elektroforézy se využívá jejich záporného náboje, který vzniká v důsledku přítomnosti fosfátů. Fragmenty DNA putují od katody (záporný pól) k anodě (kladný pól). Malé fragmenty putují rychleji než velké. (Dastych, 2014)

Mezi typy elektroforézy patří volná elektroforéza, zónová elektroforéza a izoelektrická fokusace neboli izotachoforéza. Volná elektroforéza je elektroforéza s pohyblivým rozhraním, v praxi se nepoužívá, protože separace je silně ovlivněna difúzí. Nejčastěji se využívá zónová elektroforéza, což je elektroforéza na nosiči. Nosič je napuštěn vhodným elektrolytem, pohyb částic je pomalejší, oddělují se jednotlivé zóny. Separace se ukončuje před tím, než dorazí první zóny ke konci. Jako nosič se nejčastěji používá agaróza nebo polyakrylamidový gel. Poslední typ elektroforézy, izoelektrická fokusace, je elektroforéza v prostředí gradientu pH. Používá se při separaci amfolytů. Amfolyty jsou látky, které se chovají jako kyselé nebo jako zásadité podle pH prostředí, ve kterém se nacházejí. Může se jednat např. o aminokyseliny, peptidy nebo proteiny. Jakmile tyto látky dosáhnou svého izoelektrického bodu (tím je pH prostředí, ve kterém jsou elektricky neutrální), jejich pohyb se zastaví. (Dastych, 2014)

Pro svou práci jsem k analýze produktů z PCR využila zónovou elektroforézu na agarózovém gelu. Postup práce je uveden v kapitole 8.1.

4.3 Sangerova metoda sekvenování – dideoxy metoda

Sangerova metoda sekvenování spočívá v ukončení syntézy DNA chemicky modifikovanými nukleotidy (dideoxy-NTP). Na jednovláknový DNA templát nejprve nasedne primer, který rozpozná cílový úsek DNA. DNA polymeráza poté začne syntetizovat vlákno komplementární k templátu. K reakci se přidává směs všech čtyř

možných dideoxynukleotidů (ddATP, ddTTP, ddCTP a ddGTP), různě fluorescenčně značených. Navázání specifických dideoxynukleotidů registrujeme metodou kapilární elektroforézy jako různě barevné píky. Na základě tohoto výsledku můžeme přesně určit sekvenci DNA. (Hartl, 2009)

4.4 Next generation sequencing

V posledních letech vzniklo několik dalších metod, které umožňují rychlou a cenově výhodnou sekvenaci velkého množství vzorků najednou. Tyto metody označujeme jako „next generation sequencing“ neboli sekvenování nové generace.

Jednou z metod sekvenování nové generace je 454/Roche pyrosekvenování. Tato metoda je založena na detekci pyrofosfátu, který se odštěpuje během syntézy kopií templátové DNA. Fragmenty určené k sekvenování jsou navázány na mikrokuličkách a namnoženy pomocí emulzní PCR. Sekvenování probíhá na destičce s jamkami, do kterých se vždy vejde právě jedna kulička. Pokud je zařazen komplementární nukleotid, uvolní se pyrofosfát a sulfuryláza s luciferázou vytvoří pomocí chemických reakcí světelný záblesk. Tento záblesk je detekován kamerou. (Skopalíková, 2015)

Dalším přístupem NGS je varianta firmy Illumina, která je založena na namnožení templátu pomocí bridge PCR na destičce. Na destičce jsou umístěny forward a reverse primery. Po uchycení fragmentu DNA na primer dojde k jeho ohnutí a navázání druhým koncem na příslušný primer. Vznikají tak můstky a po několika cyklech se vytvoří tzv. clustery obsahující až 1000 kopií templátové molekuly DNA. Vlastní sekvenování probíhá pomocí polymerázy a nukleotidů značených různými fluorescenčními barvami. Po navázání komplementárního nukleotidu dojde k uvolnění příslušného fluorescenčního záření, které je detekováno přístrojem. (Skopalíková, 2015)

Poslední metodou NGS, o které bych se chtěla zmínit, je metoda Ion Torrent. Tato metoda je založena na detekci vodíkového iontu, který se uvolňuje při syntéze DNA. K amplifikaci sekvenované DNA se používá, stejně jako u 454-pyrosekvenování, emulzní PCR. Samotná sekvenace probíhá na čipu s jamkami, do kterých se vejde právě jedna kulička s navázaným úsekem DNA. Po navázání nukleotidu komplementárního k sekvenci DNA dojde k uvolnění vodíkového iontu, a tím ke změně pH. Tato změna je detekována přístrojem. (Skopalíková, 2015)

PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo určit, zda existuje souvislost přítomnosti mutace delF508 s patogenezí kolorektálního karcinomu. Tohoto cíle jsme chtěli dosáhnout porovnáním frekvence přítomnosti mutace delF508 u nejmladších pacientů s kolorektálním karcinomem (36-55 let) s pacienty nejstaršími (68-76 let).

U starších pacientů lze předpokládat větší vliv prostředí a životního stylu oproti genetickým faktorům, které hrají klíčovou roli u pacientů mladších. V praktické části proto bylo mým úkolem provést izolaci DNA z krve pacientů pomocí tzv. kolonkové metody soupravou DNeasy Blood & Tissue Kit firmy QIAGEN a následně stanovit přítomnost mutace delF508 metodou ASA PCR u výše uvedených dvou skupin pacientů.

Výsledným porovnáním frekvence přítomnosti mutací v obou skupinách je možné určit významnost mutace delF508 v procesu patogeneze kolorektálního karcinomu.

5.1 Metodika

Do studie vstoupilo 115 pacientů. Pro účely studie byly jednotlivé vzorky anonymizovány. Před zahájením studie byl k anonymizovaným vzorkům z klinických dat poskytnut pouze věk pacientů v době diagnózy. Žádné identifikační parametry, které by obsahovaly údaje podléhající ochraně osobních dat, nebyly použity. Pacienti podepsali obecný souhlas s výzkumem.

Ze 115 vzorků krve byla provedena izolace DNA kolonkovou metodou. Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky při vlnových délkách 280 nm, 260 nm a 230 nm pomocí přístroje Nanodrop 1000.

Přítomnost mutace CFTR delF508 byla sledována u 50 nejstarších a 50 nejmladších pacientů s diagnózou kolorektálního karcinomu. Pomocí navržených primerů byla DNA amplifikována metodou ASA PCR. Kontrola správnosti PCR metody byla provedena současnou amplifikací genu APOB. Každá reakce proběhla v přítomnosti pozitivních kontrol (heterozygot CFTR delF508) a negativních kontrol. DNA anonymního pacienta, který byl nosičem mutace CFTR delF508 v heterozygotním stavu byla

poskytnuta pracovištěm Ústav lékařské genetiky FN Plzeň. Produkty PCR byly vizualizovány pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Výsledek byl odečten pod UV zářením.

Výsledné hodnoty jsou prezentovány formou tabulek v kapitole č. 9.

5.2 Výzkumné otázky

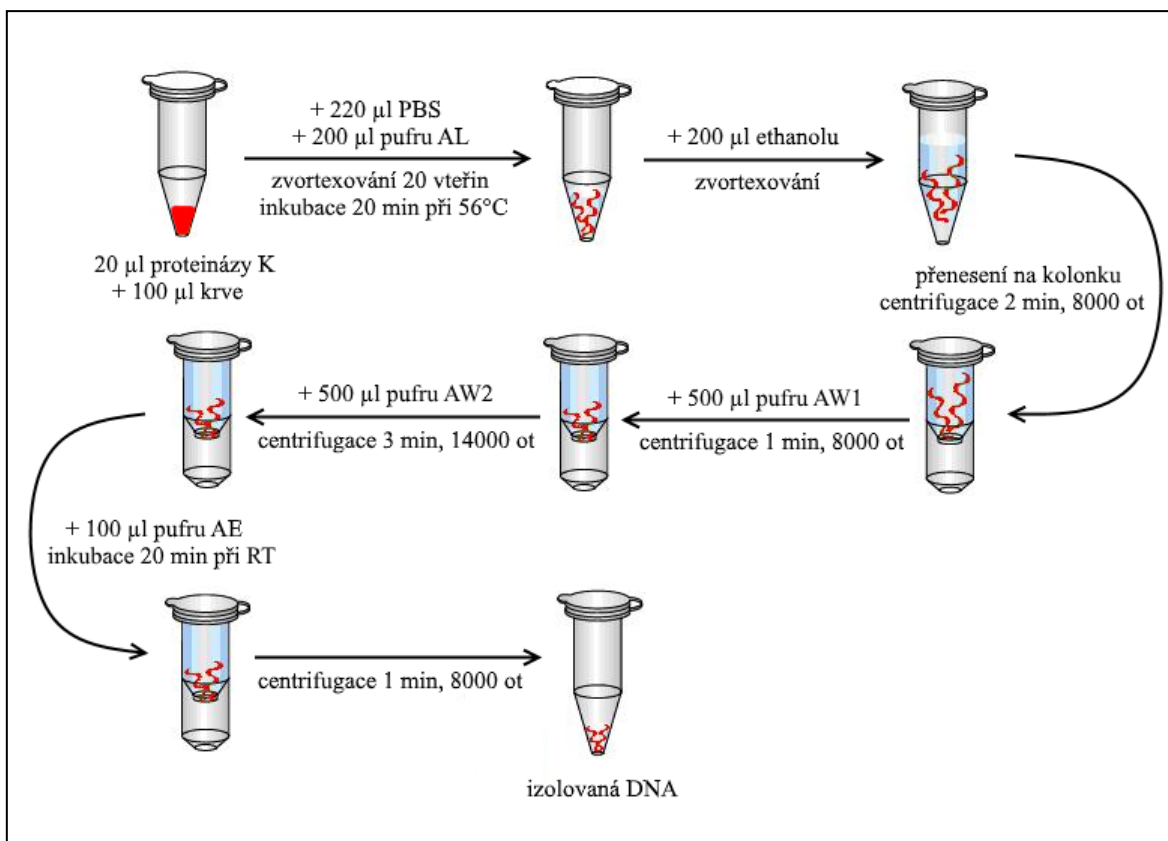
1. Jaká byla průměrná výtěžnost a průměrná čistota izolované DNA?
2. Jaká byla nejnižší koncentrace DNA, při které proběhla PCR?
3. Jaká byla frekvence mutace delF508 ve skupině mladých pacientů s CRC a frekvence mutace delF508 ve skupině starších pacientů?

6 IZOLACE DNA Z KRVE

Izolace DNA byly provedeny v laboratoři pro izolace nukleových kyselin vybavené pro níže uvedené pracovní postupy. Veškeré úkony byly prováděny v ochranných rukavicích a v ochranném plášti. Pipetovací úkony byly provedeny pomocí automatických pipet s výměnnými plastovými špičkami s vnitřním filtrem. Pro níže uvedené úkony byl použit DNase free plast.

6.1 Postup izolace DNA z krve

1. Do 1,5 ml eppendorfky napipetujeme 20 μ l proteinázy K.
 2. Přidáme 100 μ l krve.
 3. Přidáme 220 μ l PBS.
 4. Přidáme 200 μ l pufru AL.
 5. Protřepeme a velmi důkladně zvortexujeme (20 vteřin).
 6. Inkubujeme 20 minut při 56°C.
 7. Přidáme 200 μ l ethanolu (96-100%) a zvortexujeme.
 8. Přelijeme na kolonky a zcentrifugujeme 2 minuty při 8000 otáčkách. Aby vše prošlo přes filtr, můžeme postup ještě jednou zopakovat.
 9. Kolonku přendáme do nové 2 ml eppendorfky a přidáme 500 μ l pufru AW1.
 10. Zcentrifugujeme 1 min při 8000 otáčkách.
 11. Kolonku přendáme do nové 2 ml eppendorfky a přidáme 500 μ l pufru AW2.
 12. Zcentrifugujeme 3 min při 14000 otáčkách.
 13. Velice opatrně vyndáme z centrifugy (nenaklááme!!!) a přendáme do čisté 1,5 ml eppendorfky.
 14. Přidáme 100 μ l pufru AE.
 15. Inkubujeme 20 min při pokojové teplotě.
 16. Zcentrifugujeme 1 min při 8000 otáčkách.
 17. Obsah eppendorfky znovu přepipetujeme na kolonku a zopakujeme krok č. 16.
- (Zdroj: Qiagen – DNeasy Blood & Tissue Handbook, 2006)



Obrázek 3: Schéma izolace DNA

(Dílní obrázky převzaty z: <http://www.fairbiotech.com/upload/image/DT%20protocol.PNG>;
úpravy: autor bakalářské práce)

6.2 Měření koncentrace a čistoty izolované DNA

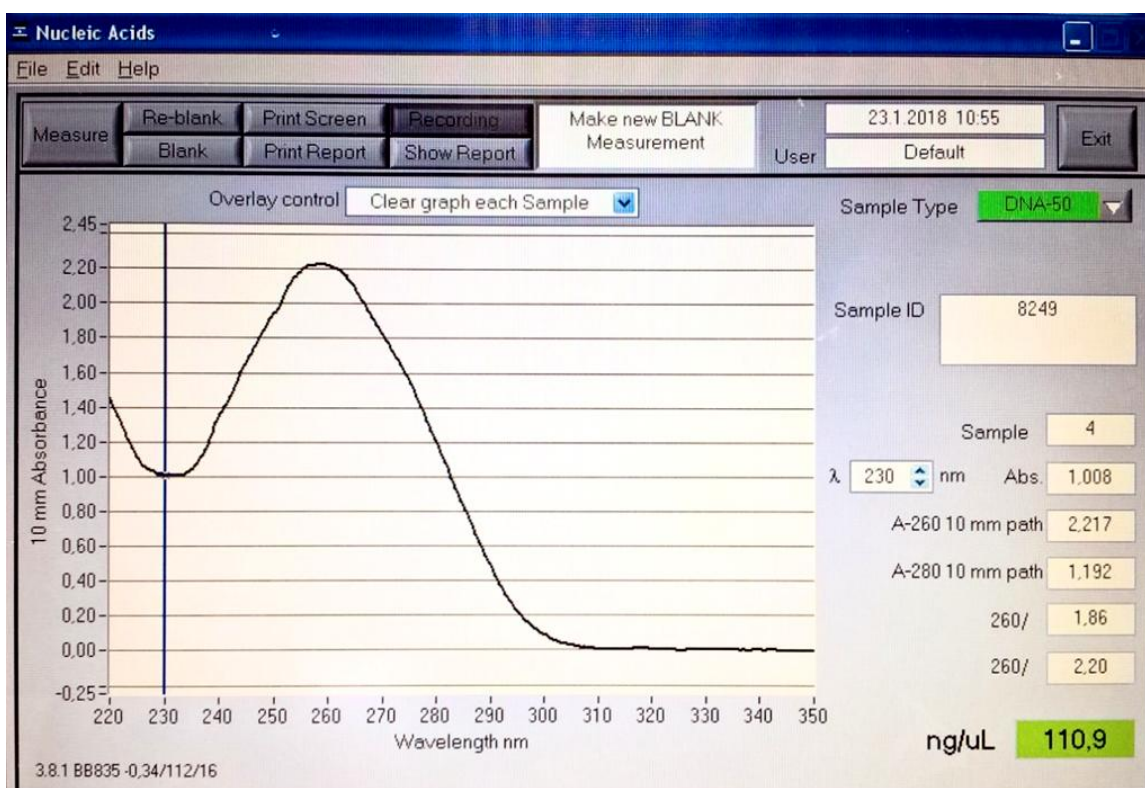
Koncentrace a čistota izolované DNA se stanovuje spektrofotometricky při vlnových délkách 280 nm, 260 nm a 230 nm. Vlnová délka 260 nm je specifická pro DNA, při této vlnové délce tedy měříme množství izolované DNA. Vlnové délky 280 nm a 230 nm nám pomohou určit míru znečištění izolované DNA. Pomocí vlnové délky 280 nm stanovujeme znečištění nežádoucími bílkovinami, pomocí vlnové délky 230 nm stanovujeme znečištění organickými látkami. (Ausubel, 2002)

Čistotu DNA stanovíme pomocí poměrů A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} . Poměr A_{260}/A_{280} by měl být v případě čisté DNA ideálně 1,8 či vyšší. Při poměru A_{260}/A_{230} by čistá DNA měla dosahovat hodnot vyšších než 2. (Ausubel, 2002)

Měření koncentrace a čistoty izolované DNA jsem prováděla na přístroji Nanodrop 1000.

6.2.1 Postup měření koncentrace a čistoty DNA na přístroji Nanodrop 1000

1. Na notebooku HP spustíme program Nanodrop 1000.
2. Zvolíme možnost měření – NUCLEIC ACID.
3. Aktivujeme přístroj čistou PCR vodou – na čidlo napipetujeme 1 μ l čisté PCR vody.
4. Nastavíme možnost měření na DNA-50.
5. Změříme BLANK – na čidlo napipetujeme 1 μ l čistého roztoku, ve kterém jsme DNA eluovali, tedy roztoku AE a klikneme na tlačítko BLANK.
6. Poté změříme naše vzorky. Na čidlo vždy napipetujeme 1 μ l vzorku. Číslo vzorku zapisujeme do příslušného okénka a pro změření klikneme na tlačítko MEASURE. Na každý vzorek používáme novou špičku.
7. Výsledky uložíme pomocí cesty: SHOW REPORT \rightarrow REPORTS \rightarrow SAVE REPORT \rightarrow EXPORT REPORT & STANDARDS TABLES



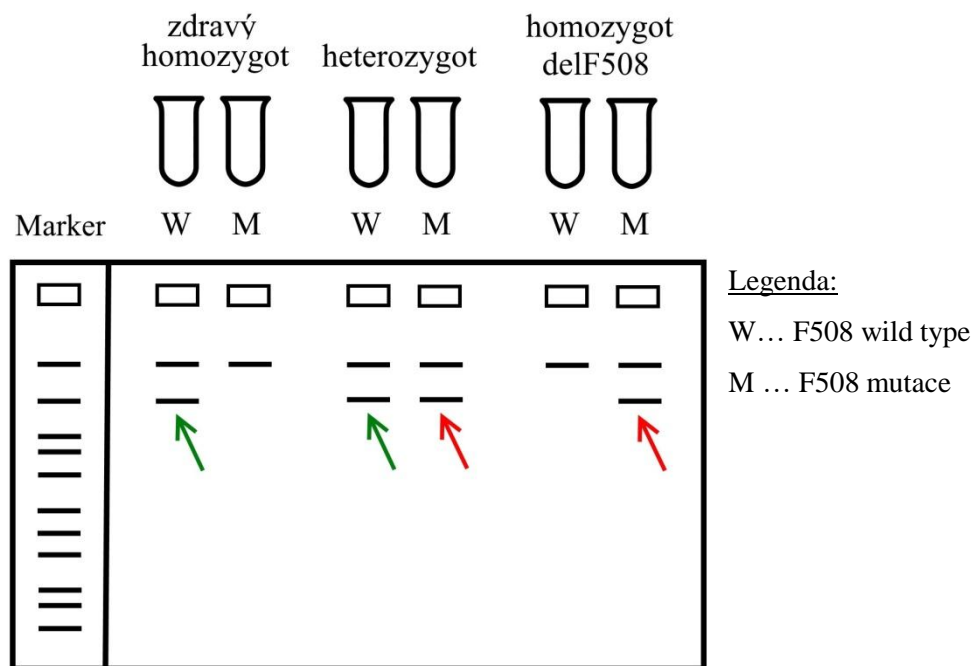
Obrázek 4: Měření koncentrace a čistoty izolované DNA na přístroji Nanodrop 1000 (Zdroj: autor bakalářské práce)

7 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

U vzorků izolované DNA byla provedena detekce mutace CFTR delF508 pomocí amplifikace části wild type a mutované alely genu CFTR metodou ASA PCR.

Každý vzorek byl vyšetřován ve dvou zkumavkách. První obsahovala primery (forward a reverse), které ohraničují úsek DNA typický pro wild type alelu, druhá zkumavka obsahovala primery (forward a reverse), které ohraničují úsek DNA typický pro mutovanou alelu. Tento postup umožňuje při následné vizualizaci namnožených úseků pomocí elektroforézy určit, zda je zkoumaný jedinec pro daný gen zdravým homozygotem, heterozygotem či mutovaným homozygotem.

Pro kontrolu funkčnosti metody PCR každá reakce obsahovala kontrolní primery APOB F (forward) a APOB R (reverse), ohraničující část sekvence genu APOB, která je přítomna jak u jedince bez mutace delF508, tak u jedince s mutací delF508. U každého vzorku by tedy při vizualizaci pomocí elektroforézy měl být přítomný kontrolní proužek pro APOB gen. Pokud by proužek nebyl přítomen, pravděpodobně došlo během stanovení k chybě, výsledek nemůže být interpretován a je nutné vyšetření zopakovat.



Obrázek 5: Přehled možných výsledků elektroforézy
(Zdroj: autor bakalářské práce)

Níže je zobrazen úsek s mutací delF508 v nukleotidové sekvenci DNA a primery, které byly použity pro naši studii. Zeleně je vyznačena poloha forward a reverse primeru v genu CFTR.

```
AAATGAGTTAATAGAATCTTTACAAATAAGAATATACACTTCTGCTTAGGATGATAAATTGGAGGCAAGTGAAT  
CCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATGGGTTTTATT CCAGACTTCACTTCTAATGGTGATTATG  
GGAGAAGCTGGAGCCTTCAGAGGGTAAAAATTAAGCACAGTGGAAAGAATTCATTCTGTTCTCAGTTTTCCCTGGA  
TTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAAATATCA TGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCA  
AAGCATGCCAACTAGAAGAGGTAAGAAACTATCTGAAAACTTTTGATTATGCATATGAACCCTTCACACTAC  
CCAAATTATATATTTGGCTCCATATTC AATCGGTTAGTCTACATATATTTATGTTTCCTCTATGGGTAAGCTA  
CTGTGAATGGATCAATTAATAAAACACATGACCTATGCTTTAAGAAGCTTGCAAACACATGAA
```

delece

(Zdroj sekvence DNA: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=113993960)

7.1 Sekvence primerů použité v reakci A a reakci B

Primery dodala firma Generi Biotech Hradec Králové, Česká republika.

Primer Mix A

F508 REVERSE

GTATCTATATTCATCATAGGAAACACCATT

F508 FORWARD

CCAGACTTCACTTCTAATGATGATTATGGG

Primer Mix B

F508 WILD TYPE REVERSE

GATTCTATATTCATCATAGGAAACACCACA

F508 WILD TYPE FORWARD

GACTTCACTTCTAATGATGATTATGGGAGA

APO B CONTROL FORWARD

GAGCACAGTACGAAAAACACCT

APO B CONTROL REVERSE

AAATATATTCATCATAGGAAACGAGAACG

(Sekvence byly čerpány z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=113993960)

7.2 Postup PCR

1. Nejprve napipetujeme do separátních 0,2 ml PCR zkumavek MIX A a MIX B podle následujícího rozpisu (množství pro 5 vzorků):

MIX A:

- 1 μ l F508 F
- 1 μ l F508 R
- 1 μ l APO B control F
- 1 μ l APO B control R

MIX B:

- 1 μ l F508 wild type F
- 1 μ l F508 wild type R
- 1 μ l APO B control F
- 1 μ l APO B control R

2. Poté připravíme do 1,5 ml zkumavek MASTER MIX 1 a 2 podle následujících tabulek. Tabulky jsou množstvím jednotlivých látek navrženy pro analýzu 5 vzorků DNA, každý po 20 μ l reakce. Při pipetování postupujeme v seznamu shora dolů. Polymerázu přidáváme až na závěr, protože tehdy má ve směsi nejvhodnější podmínky.

Tabulka 1: Součásti MM 1 pro analýzu 5 vzorků

PCR voda	62 μ l
pufř	10 μ l
MgCl ₂	10 μ l
dNTP	4 μ l
MIX A	4 μ l
polymeráza	5 μ l

Tabulka 2: Součásti MM 1 pro analýzu 5 vzorků

PCR voda	62 μ l
pufr	10 μ l
MgCl ₂	10 μ l
dNTP	4 μ l
MIX B	4 μ l
polymeráza	5 μ l

3. Napipetujeme finální směs pro reakci. Do plata pro PCR napipetujeme vždy 19 μ l MM 1 a přidáme 1 μ l DNA. Do vedlejšího sloupečku napipetujeme 19 μ l MM 2 a přidáme 1 μ l DNA. Takto pokračujeme se všemi vzorky. Poté krátce zcentrifugujeme.
4. Plato vložíme do přístroje Thermocycler a spustíme PCR. Přístroj naprogramujeme podle následujícího schématu.

Tabulka 3: Schéma PCR

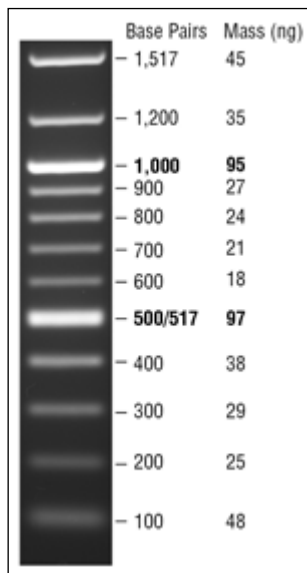
Číslo kroku	Teplota	Čas (mm:ss)
1	95°C	2:00
2	95°C	0:30
3	62°C	0:30
4	72°C	1:00
5	72°C	5:00
6	12°C	∞

} 39x

Krok č. 2 - 4 přístroj opakuje v cyklech. Celkem proběhne 39 takových cyklů.

8 ELEKTROFORÉZA

Analýza produktů z PCR byla provedena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Pro vizualizaci produktů bylo použito barvivo EZ-Vision DNA Dye. Jako kalibrační škála molekulové hmotnosti (velikosti fragmentů) byl použit žebříček typu N3231S (100 bp DNA Ladder).



Obrázek 6: 100 bp DNA Ladder

(Převzato z: https://www.neb.com/-/media/catalog/gel-photos/n3231_thumb.gif)

8.1 Postup analýzy produktů PCR pomocí elektroforézy

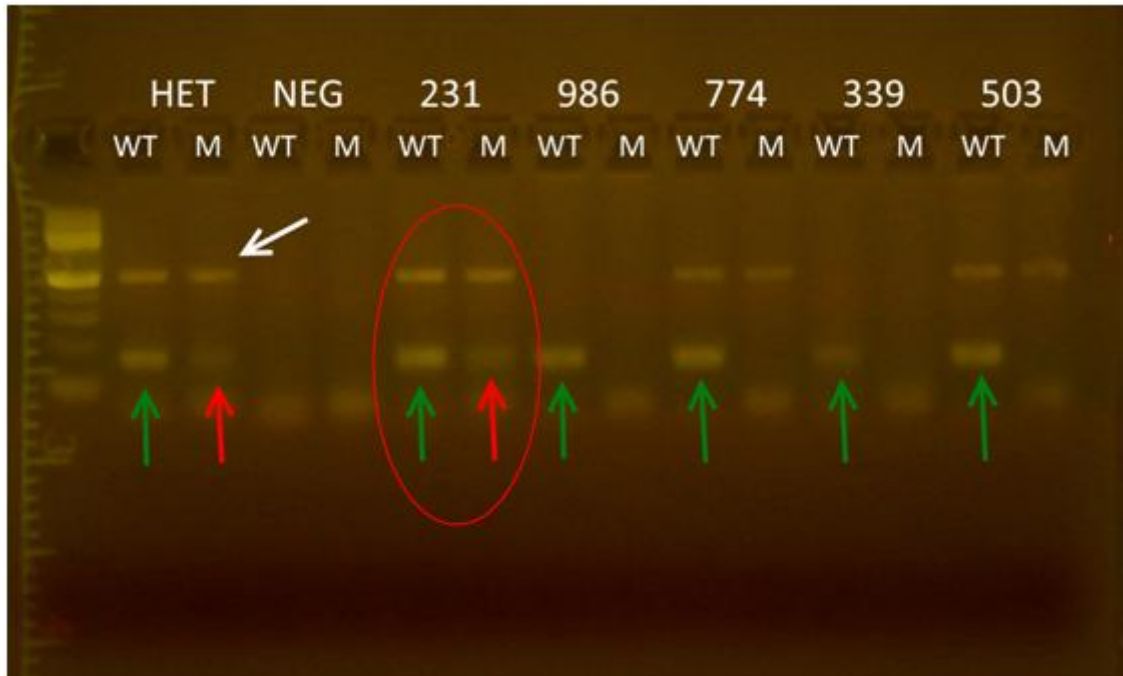
1. Nejprve připravíme agarózový gel. Do baňky typu Erlen odvážíme 2 g agarózy (2% agarózový gel, 50 ml pufru).
2. Skleněným válcem odměříme 50 ml pufru TAE, přidáme do baňky a krouživým pohybem promícháme.
3. Baňku dáme do mikrovlnné trouby a vaříme, dokud se agaróza nerozpustí a nevznikne čirý roztok.
4. Necháme vychladnout na cca 60°C (teplota, kdy několik sekund udržíme kádinku přiloženou ke hřbetu ruky).
5. Připravíme nalévací vanu, vložíme do ní hřebínek a rozehřátý agar do ní přelijeme. Špičkou od pipety odstraníme případné bublinky v gelu.

6. Gel necháme 30 minut ztuhnout.
7. Mezitím napipetujeme směsi, které budeme následně nanášet do jamek v gelu. Použijeme vždy 5 μ l naamplifikované DNA a přidáme 2 μ l barviva EZ-Vision DNA Dye.
8. Dále napipetujeme také žebříček. Napipetujeme 5 μ l žebříčku namíchaného s dodávaným pufrem a přidáme 2 μ l barviva EZ-Vision DNA Dye.
9. Po ztuhnutí gelu z něj vyjmeme hřebínek, který v gelu vytvoří jamky. Gel přeneseme do vany určené pro elektroforézu. Vanu zalijeme pufrem TAE tak, aby byl celý gel ponořený, maximálně však po příslušnou rysku.
10. Do krajní jamky gelu naneseeme 7 μ l žebříčku.
11. Do dalších jamek naneseeme vzorky, nanášíme vždy 7 μ l vzorku.
12. Zapojíme elektroforetickou vanu do zdroje a pustíme proud při konstantním napětí 80 V po dobu 25 minut.
13. Po ukončení elektroforézy přemístíme gel na UV-transluminátor a pod UV zářením odečteme výsledek.

8.2 Ukázka praktického odečtení výsledků elektroforetického gelu

Na obrázku č. 7 vidíme snímek pořízený během vizualizace produktů pomocí UV transluminátoru. Zelenými šipkami je označena wild type alela, červenými šipkami mutovaná alela. Bílou šipkou je označen namnožený APOB kontrolní produkt.

V červeném kroužku je zvýrazněn pacient č. 231, u kterého byla mutace delF508 detekována v heterozygotním stavu.



Obrázek 7: Snímek s výsledky pořízený z UV transluminátoru Legenda:

(Zdroj: autor bakalářské práce)

WT..... F508 wild type

M mutace delF508

HET ... kontrolní heterozygot

NEG... negativní kontrola

9 VÝSLEDKY

9.1 Izolace DNA

Tabulka 4 uvádí výtěžky izolované DNA a čistotu měřenou poměrem absorbance 260/280 nm a 260/230 nm.

Tabulka 4: Koncentrace a čistota izolované DNA

Pořadové číslo	Izolovaná DNA [ng/μl]	Celkový výtěžek ze 100 μl plné krve [ng]	Čistota 260/280	Čistota 260/230
1	27,5	2750	1,8	2,53
2	36,08	3608	1,79	1,92
3	30,83	3083	1,66	1,14
4	48,51	4851	1,78	1,35
5	3,58	358	1,23	0,65
6	24,4	2440	1,71	1,64
7	28,89	2889	1,62	0,98
8	21,94	2194	1,7	1,63
9	19,44	1944	1,6	1,68
10	56,16	5616	1,55	0,72
11	44,87	4487	1,45	0,64
12	4,09	409	1,52	0,74
13	4,76	476	1,72	2,6
14	7,75	775	1,46	1,06
15	4,87	487	1,65	0,64
16	45,11	4511	1,8	1,72
17	23,69	2369	1,73	1,22
18	8,66	866	1,87	1,61
19	81,39	8139	1,91	2,31
20	21,21	2121	2	2,16
21	7,97	797	1,95	0,47
22	32,53	3253	1,68	0,63
23	3,74	374	2,17	0,67

24	37,14	3714	1,98	2,61
25	133,63	13363	1,9	2,41
26	20,61	2061	2,14	2,3
27	18,43	1843	2,01	6,98
28	16,56	1656	1,83	0,99
29	168,75	16875	1,9	2,13
30	6,11	611	1,69	0,24
31	13,37	1337	2,11	1,02
32	26,77	2677	1,99	1,13
33	36,7	3670	1,65	0,58
34	8,86	886	2,08	0,74
35	27,22	2722	1,93	1,51
36	71,75	7175	1,72	0,86
37	10	1000	2,6	0,84
38	63,12	6312	1,97	2,19
39	18,72	1872	7,46	1,93
40	32,51	3251	3,3	1,16
41	22,97	2297	4,76	1,06
42	79,39	7939	2,32	2,77
43	74,71	7471	2,27	1,87
44	28,13	2813	2,93	0,68
45	85,05	8505	2,26	1,71
46	19,68	1968	5,21	1,62
47	23,04	2304	1,64	2,2
48	78,45	7845	1,78	1,79
49	40,96	4096	1,7	1,72
50	109,76	10976	1,85	2,47
51	21,97	2197	1,74	4,52
52	60,33	6033	1,79	1,87
53	24,44	2444	1,66	1,82
54	33,44	3344	1,4	0,65
55	14,99	1499	1,24	0,55

56	45,74	4574	1,8	2,59
57	52,52	5252	1,46	2,39
58	49,38	4938	1,75	1,38
59	125,33	12533	1,88	2
60	56,16	5616	1,76	1,52
61	65,67	6567	1,84	1,49
62	49,64	4964	1,77	1,44
63	31,58	3158	1,66	0,66
64	30,63	3063	1,79	1
65	15,77	1577	1,7	0,62
66	80,29	8029	1,61	0,86
67	57,04	5704	1,75	1,26
68	22	2200	1,87	2,09
69	8,85	885	1,73	0,49
70	42,01	4201	1,91	1,39
71	3,44	344	3,9	0,6
72	52,88	5288	1,85	1,34
73	123,01	12301	1,88	2,46
74	14,1	1410	2,54	5,98
75	32,54	3254	1,92	2,85
76	5,57	557	1,75	1,19
77	30,38	3038	1,91	2,37
78	21,39	2139	1,72	2,61
79	27,55	2755	1,79	1,84
80	29,33	2933	1,79	1,22
81	72,32	7232	1,86	1,6
82	50,53	5053	1,84	2,35
83	63,47	6347	1,86	2,58
84	5,64	564	1,45	1,65
85	11,86	1186	1,75	2,4
86	62,27	6227	1,85	2,4
87	7,78	778	1,39	0,31

88	53,34	5334	1,8	2,24	
89	9,51	951	1,81	0,54	
90	11,99	1199	2,22	2,6	
91	6,4	640	2,14	1,95	
92	61,77	6177	1,89	1,51	
93	11,33	1133	1,9	0,43	
94	14,18	1418	2,2	1,38	
95	8,77	877	2,21	6,09	
96	6,67	667	2,01	0,65	
97	24,12	2412	1,88	1,31	
98	71,76	7176	1,92	2,15	
99	68,46	6846	1,94	2,17	
100	137,71	13771	1,86	2,02	
101	98,58	9858	1,87	2,29	
102	129,23	12923	1,89	2,4	
103	38,23	3823	1,87	3,07	
104	102,81	10281	1,79	1,41	
105	123,58	12358	1,87	2,28	
106	208,01	20801	1,88	2,42	
107	50,85	5085	1,83	2,57	
108	72,03	7203	1,82	1,74	
109	32,13	3213	1,84	2,28	
110	137,18	13718	1,85	2,26	
111	26,2	2620	2,07	2,18	
112	35,57	3557	1,87	1,96	
113	56,49	5649	1,85	1,42	
114	60,54	6054	1,89	2,1	
115	110,86	11086	1,86	2,2	
Průměrná hodnota izolované DNA:	44,61 [ng/μl]	Průměrná čistota 260/280:	1,98	Průměrná čistota 260/230:	1,76

Celkem byla izolována DNA ze 115 vzorků. Průměrná hodnota izolované DNA byla 44,61 ng/μl, průměrná čistota DNA při poměru absorbancí A₂₆₀/A₂₈₀ byla 1,98, průměrná čistota DNA při poměru absorbancí A₂₆₀/A₂₃₀ byla 1,76. Nejvyšší výtěžnost izolace byla 208,01 ng/μl, nejnižší výtěžnost izolace byla 3,44 ng/μl. Čas potřebný k izolaci DNA z 15 vzorků krve (sada vzorků izolovaných společně) byl včetně měření koncentrací 240 minut.

Z celkových 115 vzorků odpovídalo při poměru A₂₆₀/A₂₈₀ čisté DNA 70 vzorků (60,9 %), zbylých 45 vzorků (39,1 %) bylo kontaminováno proteiny. Při poměru A₂₆₀/A₂₃₀ odpovídalo čisté DNA 44 vzorků (38,3 %), zbylých 71 vzorků (61,7 %) bylo kontaminováno organickými látkami.

9.2 Stanovení mutace delF508

Tabulka 5 uvádí výsledky stanovení mutace delF508 u mladých pacientů. U pacientů č. 24, 334, 361, 1168, 619, 1074, 42, 1110, 1075, 327, 1158, 869, 1145, 1112, 1093, 1008, 282, 1026, 209, 1154, 629, 982, 721, 1106, 534, 1079, 876, 30 a 1170 muselo být stanovení z důvodu nepřítomnosti kontrolního PCR produktu APOB opakováno.

Tabulka 5: Výsledky stanovení mutace delF508 u mladších pacientů

Číslo vzorku	Kontrolní APOB	F508 wild type	F508 mutace	Genotyp
24	-	+	-	∅
334	-	+	-	∅
203	+	+	-	zdravý homozygot
361	-	+	-	∅
1168	+	+	-	zdravý homozygot
858	+	+	-	zdravý homozygot
619	+	+	-	zdravý homozygot
150	+	+	-	zdravý homozygot
871	+	+	-	zdravý homozygot
537	+	+	-	zdravý homozygot
1074	-	+	-	∅
42	+	+	-	zdravý homozygot
888	+	+	-	zdravý homozygot
1110	-	-	-	∅
889	+	+	-	zdravý homozygot
273	+	+	-	zdravý homozygot
382	+	+	-	zdravý homozygot
1075	-	+	-	∅
327	+	+	-	zdravý homozygot
804	+	+	-	zdravý homozygot
1158	-	-	-	∅
869	+	+	-	zdravý homozygot
1145	-	+	-	∅
855	+	+	-	zdravý homozygot
1112	-	+	-	∅

1093	-	-	-	∅
1008	-	-	-	∅
282	+	+	-	zdravý homozygot
1026	+	+	-	zdravý homozygot
209	+	+	-	zdravý homozygot
583	+	+	-	zdravý homozygot
1154	-	+	-	∅
629	+	+	-	zdravý homozygot
991	+	+	-	zdravý homozygot
861	+	+	-	zdravý homozygot
531	+	+	-	zdravý homozygot
982	+	+	-	zdravý homozygot
897	+	+	-	zdravý homozygot
721	+	+	-	zdravý homozygot
1106	-	+	-	∅
658	+	+	-	zdravý homozygot
668	+	+	-	zdravý homozygot
534	+	+	-	zdravý homozygot
1079	-	+	-	∅
215	+	+	-	zdravý homozygot
876	+	+	-	zdravý homozygot
30	-	+	-	∅
1170	-	+	-	∅
899	+	+	-	zdravý homozygot
705	+	+	-	zdravý homozygot

Ze skupiny mladších pacientů mělo 34 jedinců (68 %) genotyp zdravý homozygot. Zbylých 16 vzorků (32 %) nebylo možné hodnotit, neboť ani po zopakování reakce nedošlo k amplifikaci DNA úseku pro kontrolní gen APOB či nebyl přítomen žádný PCR produkt.

Všichni pacienti, u nichž molekulárně genetické vyšetření splňovalo všechny parametry pro správné hodnocení výsledku, tedy měli alely genu CFTR typu wild type, tzn. nebyla zachycena žádná mutace delF508.

Tabulka 6 uvádí výsledky stanovení mutace delF508 u starších pacientů. U pacientů č. 352, 667, 193 34, 326, 268, 232, 524, 1073, 454, 520, 517, 986, 339, 1084, 303 a 1117 muselo být stanovení z důvodu nepřítomnosti kontrolního PCR produktu kontrolního genu APOB opakováno.

Tabulka 6: Výsledky stanovení mutace delF508 u starších pacientů

Číslo vzorku	Kontrolní APOB	F508 wild type	F508 mutace	Genotyp
631	+	+	-	zdravý homozygot
265	+	+	-	zdravý homozygot
493	+	+	-	zdravý homozygot
27	+	+	-	zdravý homozygot
614	+	+	-	zdravý homozygot
352	-	+	-	∅
839	+	+	-	zdravý homozygot
460	+	+	-	zdravý homozygot
261	+	+	-	zdravý homozygot
406	+	+	-	zdravý homozygot
536	+	+	-	zdravý homozygot
667	+	+	-	zdravý homozygot
672	+	+	-	zdravý homozygot
491	+	+	-	zdravý homozygot
234	+	+	-	zdravý homozygot
193	+	+	-	zdravý homozygot
231	+	+	+	zdravý heterozygot
34	-	+	-	∅
845	+	+	-	zdravý homozygot
390	+	+	-	zdravý homozygot
326	-	+	-	∅
268	-	+	-	∅
232	+	+	-	zdravý homozygot
524	+	+	-	zdravý homozygot
1073	-	+	-	∅
454	+	+	-	zdravý homozygot

520	+	+	-	zdravý homozygot
517	-	+	-	∅
986	-	+	-	∅
774	+	+	-	zdravý homozygot
339	-	+	-	∅
503	+	+	-	zdravý homozygot
475	+	+	-	zdravý homozygot
1000	+	+	-	zdravý homozygot
717	+	+	-	zdravý homozygot
584	+	+	-	zdravý homozygot
1084	-	+	-	∅
565	+	+	-	zdravý homozygot
450	+	+	-	zdravý homozygot
299	+	+	-	zdravý homozygot
229	+	+	-	zdravý homozygot
686	+	+	-	zdravý homozygot
303	-	+	-	∅
1117	-	-	-	∅
852	+	+	-	zdravý homozygot
679	+	+	-	zdravý homozygot
995	+	+	-	zdravý homozygot
383	+	+	-	zdravý homozygot
46	+	+	-	zdravý homozygot
773	+	+	-	zdravý homozygot

Ze skupiny starších pacientů mělo 38 jedinců (76 %) genotyp zdravý homozygot, 1 jedinec (5 %) měl genotyp zdravý heterozygot. Zbýlých 11 vzorků (22 %) nebylo možné hodnotit, neboť ani po zopakování reakce nedošlo k amplifikaci DNA úseku pro kontrolní APOB gen či nebyl přítomen žádný produkt.

U pacienta č. 231 jsme diagnostikovali přítomnost mutace delF508 v heterozygotním stavu. Všichni ostatní pacienti, u nichž molekulárně genetické vyšetření splňovalo všechny parametry pro správné hodnocení výsledku, měli alely genu CFTR typu wild type.

Tabulka 7 shrnuje kompletní výsledky molekulárně genetické analýzy přítomnosti mutace delF508 u dvou vyšetřovaných skupin pacientů. Celkem bylo provedeno 73 vyšetření splňujících všechny parametry pro správné hodnocení výsledku.

Tabulka 7: Shrnutí výsledků molekulárně genetické analýzy mutace delF508

Skupina pacientů	Zdravý homozygot	Heterozygot	Homozygot delF508
Mladší	100 %	0 %	0 %
Starší	97,4 %	2,6 %	0 %

Ve skupině mladších pacientů bylo ze 34 vyšetření splňujících všechny parametry 100 % vzorků s genotypem zdravý homozygot, 0 % vzorků s genotypem heterozygot a 0 % vzorků s genotypem homozygot delF508.

Ve skupině starších pacientů bylo ze 39 vyšetření splňujících všechny parametry 97,4 % vzorků s genotypem zdravý homozygot, 2,6 % vzorků s genotypem heterozygot a 0 % vzorků s genotypem homozygot delF508.

10 DISKUZE

V první části diskuse budou zodpovězeny výzkumné otázky uvedené v úvodu praktické části této bakalářské práce.

1. Jaká byla průměrná výtěžnost a průměrná čistota izolované DNA?

Průměrná výtěžnost izolace DNA ze 100 μl plné krve byla 44,61 ng/ μl . Průměrná čistota DNA při poměru absorbancí A_{260}/A_{280} byla 1,98, průměrná čistota DNA při poměru absorbancí A_{260}/A_{230} byla 1,76. Uvedené hodnoty jsou zcela dostačující pro provedení PCR o objemu 20 μl s 1 μl DNA o uvedené koncentraci a čistotě.

2. Jaká byla nejnižší koncentrace DNA, při které proběhla PCR?

Nejnižší koncentrace DNA, při které proběhla PCR, byla 11,33 ng/ μl . Vyšetření ASA PCR ukázalo, že u vzorků s nízkou koncentrací DNA je v některých případech nutné vyšetření opakovat. U některých vzorků nebylo možno vyšetření provést. U takovýchto vzorků je nutná nová izolace DNA, ideálně z nového alikvotu plné krve. Pokud nový alikvot není k dispozici, je třeba provést izolaci z většího objemu než 100 μl , ideálně z 200 μl a prodloužit dobu lýzy leukocytů v úvodní části izolace z 20 minut na 30 minut.

3. Jaká byla frekvence mutace delF508 ve skupině mladých pacientů s CRC a frekvence mutace delF508 ve skupině starších pacientů?

Ve skupině mladých pacientů nebyla pozorována přítomnost mutace delF508, ve skupině starších pacientů byla frekvence heterozygotů 2,6 %.

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce bylo zjistit, zda existuje souvislost mutace delF508 s patogenezi kolorektálního karcinomu. Pokud by tomu tak bylo, naznačovalo by to, že nejrozšířenější mutace transmembránového proteinu CFTR delF508 se podílí na patogenezi kolorektálního karcinomu, a protože je tato mutace přítomna přibližně u 3,8 % populace (Koziel, 2015), výsledek by ukazoval na možnou skupinu obyvatel v riziku. Možnou souvislost mezi změnami exprese genu CFTR, na něž má nefunkčnost jedné alely zřejmě vliv (v naší studii delF508), ukazuje např. práce „*ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly form a new hallmark of cancer*“ (Dvořák, 2017).

Na základě výše uvedeného jsme se rozhodli prokázat souvislost mutace delF508 s patogenezi kolorektálního karcinomu porovnáním přítomnosti mutace delF508 ve skupině mladých pacientů s kolorektálním karcinomem (tzn. těch, u kterých má genetická predispozice nesporný vliv na rozvoj tohoto onemocnění) a skupinou starších pacientů, kteří jsou většinou zařazováni mezi pacienty se sporadickým kolorektálním karcinomem (tzn. onemocněním, na jehož patogenezi má zásadní vliv prostředí a životní styl).

Podarilo se izolovat DNA ze 115 vzorků krve, získat koncentrace a čistotu, které jsou použitelné pro PCR a provést genetické vyšetření u 73 pacientů. U 27 pacientů nebylo možno ani přes opakované PCR vyšetření s vyšším množstvím vstupní DNA do PCR reakce získat výsledky v kvalitě potřebné pro jednoznačnou interpretaci výsledků metody ASA PCR. U těchto pacientů bude nutné získat nový alikvot krve a provést izolaci DNA z většího objemu než z použitých 100 µl plné krve.

Mutace delF508 nebyla identifikována u žádného pacienta ze 34 vyšetřených pacientů s nízkým věkem v době diagnózy kolorektálního karcinomu a byla identifikována u jednoho pacienta z 39 vyšetřených pacientů ve skupině starších pacientů.

Dosažené výsledky neukazují na souvislost mutace delF508 s patogenezi kolorektálního karcinomu a zároveň, protože jsme se nedostali k populační frekvenci přítomnosti této mutace, výsledky ukazují na nutnost rozšíření naší stanoveného souboru pacientů.

11 ZÁVĚR

Z celkového počtu 100 vyšetřovaných pacientů bylo genetickou analýzu možno provést u 73 pacientů. U 27 pacientů z důvodu zřejmě nízké kvality DNA nebylo možno genetickou analýzu metodou ASA PCR provést. Ve skupině mladých pacientů s kolorektálním karcinomem nebyla zachycena žádná mutace delF508. Ve skupině pacientů starší věkové kategorie byl nalezen jeden pacient v heterozygotním stavu. Uvedené výsledky při daném počtu vyšetřených pacientů ukazují, že zde není souvislost mezi přítomností mutací delF508 a patogenezí kolorektálního karcinomu.

Podařilo se zavést metodiku stanovení mutace delF508 metodou ASA PCR a zachytit pacienta v heterozygotním stavu ve vyšetřovaném souboru. Zde prezentované výsledky je třeba chápat jako pilotní. Pro statisticky signifikantní výsledky bude nutné rozšířit soubor vyšetřovaných pacientů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

- ADAM, Zdeněk, Jana KOPTÍKOVÁ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Praha: Grada, 2003. ISBN 8024706776.
- AUSUBEL, Frederick M. *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology*. 5th ed. New York: Wiley, 2002. ISBN 0471250929.
- BOUMENDJEL, Ahcne, Jean BOUTONNAT a Jacques ROBERT, ed. *ABC Transporters and Multidrug Resistance* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2009 [cit. 2018-03-25]. ISBN 9780470495131.
- COCOLIN, Luca a Danilo, ERCOLINI. *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. New York: Springer, 2008. ISBN 978-0-387-74519-0
- ČEŠKA, Richard, TESAŘ, Vladimír, Petr DÍTĚ a Tomáš ŠTULC, *Interna*. Praha: Triton, 2010. ISBN 978-80-7387-423-0.
- DARAWI, Mohd Nazif, Chin AI-VYRN, Kalavathy RAMASAMY et al. Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms. *BMC Medical Genetics* [online]. 2013, **14**(1), - [cit. 2017-11-23]. DOI: 10.1186/1471-2350-14-27. ISSN 1471-2350. Dostupné z: <http://bmcmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-14-27>
- DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant. 2., dopl. vyd.* Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 9788021071032.
- DAVIDSON, A. L., E. DASSA, C. ORELLE a J. CHEN. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2008, **72**(2), 317-364 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1128/MMBR.00031-07. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mibr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00031-07>

- DbSNP Short Genetic Variations. *NCBI* [online]. [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=113993960

- DEAN, Michael, Yannick HAMON a Giovanna CHIMINI. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *The Journal of Lipid Research* [online]. 2001, **42**(7), 1007-1017 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <http://www.jlr.org/content/42/7/1007.long>

- DVOŘÁK, Pavel, Martin PEŠTA a Pavel SOUČEK. ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly form a new hallmark of cancer. *Tumor Biology* [online]. 2017, **39**(5), 101042831769980- [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1177/1010428317699800. ISSN 1010-4283. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317699800>

- FARINHA, Carlos M. *CFTR and Cystic Fibrosis: From Structure to Function*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 978-3-319-65493-5.

- FILA, Libor. Cystická fibróza u dospělých. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2014, **16**(2), 54-60 [cit. 2018-02-28]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2014/02/03.pdf>

- JABLONSKÁ, Markéta. *Kolorektální karcinom: časná diagnóza a prevence*. Praha: Grada, 2000. ISBN 807169777x.

- JONES, P. M. a A. M. GEORGE. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* [online]. 2004, **61**(6), 682-699 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1007/s00018-003-3336-9. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-003-3336-9>

- HANAHAN, Douglas a Robert A WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [online]. 2000, **100**(1), 57-70 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400816839>

- HARTL, Daniel L. a Elizabeth W. JONES. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. 7th. Canada: Jones & Bartlett Learning, 2009. ISBN 978-0-7637-5868-4.

- HOLUBEC, Luboš. *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0636-9.
- CHOI, Cheol-Hee. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International* [online]. 2005, **5**(1), 30-37 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1186/1475-2867-5-30. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1277830/>
- KAP, Elisabeth J., Petra SEIBOLD, Dominique SCHERER, et al. SNPs in transporter and metabolizing genes as predictive markers for oxaliplatin treatment in colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer* [online]. 2016, **138**(12), 2993-3001 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1002/ijc.30026. ISSN 00207136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.30026>
- KOZIEL, Dorota, Stanislaw GLUSZEK, Artur KOWALIK, Malgorzata CHLOPEK a Liliana PIECIAK. Genetic mutations in SPINK1, CFTR, CTSC genes in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterology* [online]. 2015, **15**(1), [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1186/s12876-015-0302-6. ISSN 1471-230X. Dostupné z: <http://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12876-015-0302-6>
- KOZOVSKA, Zuzana, Veronika GABRISOVA a Lucia KUCEROVA. Colon cancer: Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2014, **68**(8), 911-916 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.10.019. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25458789>
- KRÁL, J., J. SLYŠKOVÁ, P. VODIČKA a J. ŠPIČÁK. Molekulární genetika kolorektálního karcinomu. *Klin Onkol* [online]. 2016, **29**(6), 419-427 [cit. 2018-02-28]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/210/5095.pdf>
- KUMAR, Vinay a Stanley L. ROBBINS. *Robbins basic pathology*. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2007. ISBN 1416029737.

- LEONARD, G. D. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *The Oncologist* [online]. 2003, **8**(5), 411-424 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1634/theoncologist.8-5-411. ISSN 1083-7159. Dostupné z: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.8-5-411>
- LODISH, Harvey F. *Molecular cell biology*. 7th ed. New York: W.H. Freeman and Co., 2013. ISBN 1-4292-3413-x.
- MILLER, S. A., D. D. DYKES a H. F. POLESKY. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* [online]. 1988, **16**(3), 1215 [cit. 2018-02-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334765/pdf/nar00145-0424.pdf>
- POTTER, John D. a Noralane M. LINDOR. *Genetics of colorectal cancer*. New York: Springer, 2009. ISBN 9780387095684.
- POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Speciální patologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-494-2.
- QIAGEN – DNeasy Blood & Tissue Handbook, 07/2006 (uživatelská příručka)
- SHAFIQUE, Shehnam. Polymerase chain reaction: procedure, principles, real time PCR, optimization, applications, PCR arrays, array system performance, protocol, variations. Neue Ausg. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Pub, 2012. ISBN 9783659134791.
- SKOPALÍKOVÁ, Jana. Využití metod next-generation sekvenování pro rekonstrukci fylogeneze polyploidních rostlin. Praha, 2015. Bakalářská práce. Karlova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- VARMA, Ajit. Modern tools and techniques to understand microbes. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 978-3-319-49195-0

SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP Binding Cassette
ALD	Adrenoleukodystrofie
APC	Adenomatosis polyposis coli
APOB	Apolipoprotein B
ARMS	Amplifikační refrakční mutační systém
ASA PCR	Alelově specifická polymerázová řetězová reakce
ATP	Adenosintrifosfát
BRCA	Breast cancer
Ca	Carcinoma
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CCD	Charge coupled device
CEA	Karcinoembryonální antigen
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CIN	Chromozomálně instabilní
CRC	Kolorektální karcinom
CT	Computer tomograph
DCC	Deleted in colorectal cancer
ddATP	Dideoxyadenosintrifosfát
ddCTP	Dideoxycytidintrifosfát
ddGTP	Dideoxyguanosintrifosfát
ddTTP	Dideoxythymidintrifosfátu

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynucleotide
dsDNA	Dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
E2F	E2F transkripční faktor
ECM	Extracelulární matrix
EDTA	Etylendiaminotetraoctová kyselina
FAP	Familiární adenomatózní polypóza
FGF	Fibroblastový růstový faktor
kb	Kilobáze
MDR	Multidrug resistance
MGMT	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MMR	Missmatch repair
MRI	Magnetická rezonance
mRNA	Messenger ribonukleová kyselina
MRP	Multidrug resistance proteins
MSI	Microsatellite instability
MSI-H	Microsatellite instability-high
MSI-L	Microsatellite instability-low
NBD	Nukleotid vázající doména
NGS	Next generation sequencing
NTP	Nukleosidtrifosfát
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCR-RFLP	Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

P-gp	P-glykoprotein
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleová kyselina
RTG	Rentgenové
ssDNA	Jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
SNP	Single-nucleotide polymorphism
SUR	Sulfonylmočovina
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TMD	Transmembránová doména
TP53	Tumor protein p53
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Součásti MM 1 pro analýzu 5 vzorků (str. 44)

Tabulka 2: Součásti MM 2 pro analýzu 5 vzorků (str. 45)

Tabulka 3: Schéma PCR (str. 45)

Tabulka 4: Koncentrace a čistota izolované DNA (str. 49)

Tabulka 5: Výsledky stanovení mutace delF508 u mladších pacientů (str. 54)

Tabulka 6: Výsledky stanovení mutace delF508 u starších pacientů (str. 56)

Tabulka 7: Shrnutí výsledků molekulárně genetické analýzy mutace delF508 (str. 58)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Nový model molekulární klasifikace CRC (str. 19)

Obrázek 2: Struktura proteinu CFTR (str. 26)

Obrázek 3: Schéma izolace DNA (str. 40)

Obrázek 4: Měření koncentrace a čistoty izolované DNA na přístroji Nanodrop 1000 (str. 41)

Obrázek 5: Přehled možných výsledků elektroforézy (str. 42)

Obrázek 6: 100 bp DNA Ladder (str. 46)

Obrázek 7: Snímek s výsledky pořízený z UV transluminátoru (str. 48)

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer

Příloha 2: Sterilní box pro PCR Scie-Plas UV 4

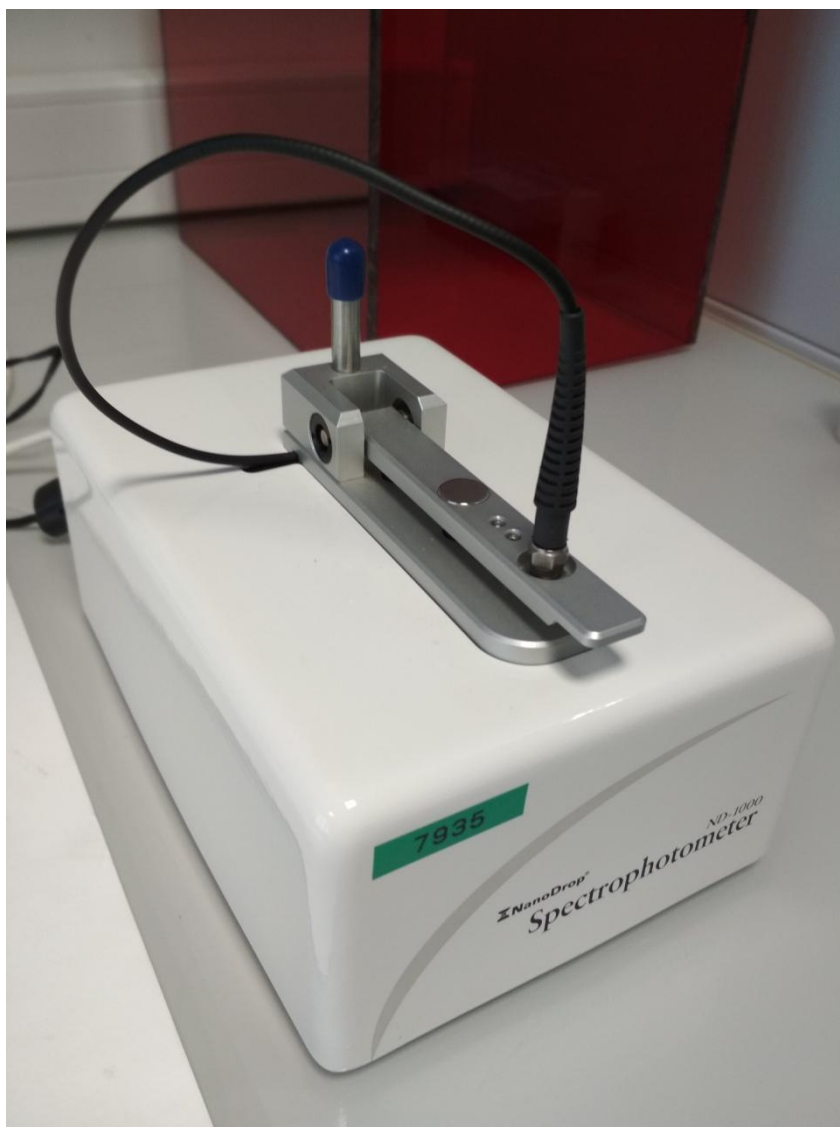
Příloha 3: Teplotní cyklátor Bio-Rad T100

Příloha 4: Bio-Rad Mini-Sub Cell GT

Příloha 5: FastGene FAS Digi UV transluminátor

PŘÍLOHA 1

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer



Zdroj: autor bakalářské práce

PŘÍLOHA 2

Sterilní box pro PCR Scie-Plas UV 4



Zdroj: autor bakalářské práce

PŘÍLOHA 3

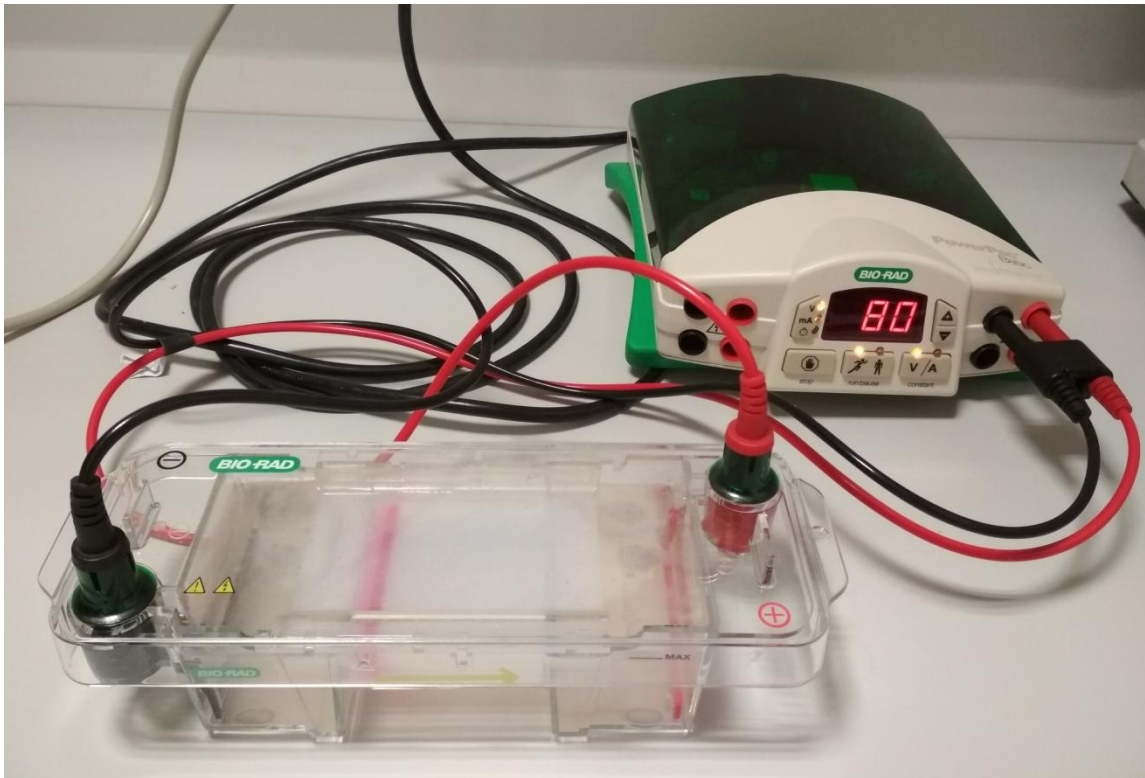
Teplotní cyklátor Bio-Rad T100



Zdroj: autor bakalářské práce

PŘÍLOHA 4

Bio-Rad Mini-Sub Cell GT



Zdroj: autor bakalářské práce

PŘÍLOHA 5

FastGene FAS Digi UV transluminátor



Zdroj: autor bakalářské práce