

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Bc. Karolína Perglerová

Diplomová práce

Úloha vybraných ABC transportérů
v rozvoji karcinomu prsu

Role of selected ABC transporters
in breast cancer development

Praha 2010

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Pavel Souček, CSc.

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Pavla Součka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze dne 3.5. 2010

Podpis:

Ráda bych na tomto místě poděkovala zejména svému školiteli RNDr. Pavlu Součkovi, CSc. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení, cenné rady a postřehy a také čas, který se mnou strávil při vyhotovení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Marii Ehrlichové a RNDr. Radce Václavíkové, PhD. za pomoc při osvojení si metod potřebných k zpracování praktické části mé diplomové práce a též za rady a čas při jejím vyhotovení. Poděkování patří také celému kolektivu laboratoře. Tato diplomová práce byla finančně podpořena grantem Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR, číslo grantu: IGA 9799-4.

Abstrakt

Karcinom prsu je v mnoha zemích nejčastější příčinou smrti u žen. Jednou z možností léčby tohoto onemocnění je použití protinádorových léčiv (chemoterapie). Individuální rozdíly v odpovědi pacientek na podané léky jsou častou příčinou selhání léčby. To, nakolik je podaný lék v těle využit, závisí z velké části i na tom, nakolik jsou molekuly léčiv transportovány skrze biologické membrány. Mezi proteiny, transportující molekuly léčiv, patří ABC transportní proteiny, například ABCB1, ABCC1 a ABCC2. Předpokládá se, že rozdíly v expresních hladinách těchto proteinů a jejich genetické variace mohou způsobovat individuální rozdíly ve farmakokinetice a ovlivňovat výsledky působení mnoha léků. Tato diplomová práce se zaměřuje na význam genové exprese ABCB1, ABCC1 a ABCC2 a také na identifikaci a význam jednonukleotidových polymorfismů v genu pro ABCC1 protein.

Klíčová slova: karcinom prsu; ABC transportér; genová exprese; polymorfismus

Abstract

Breast cancer is a leading cause of death among women in many countries. In the treatment of the breast cancer cytotoxic drugs (chemotherapy) are often used. Interindividual differences of drug response are an important cause of treatment failures. Bioavailability also depends on a major extent from the expression and activity of drug transport across biomembranes. In particular efflux transporters of the ATP-binding cassette family such as ABCB1, ABCC1 and ABCC2 have been identified as major determinants of chemoresistance in tumor cells. It was hypothesized that variance in the gene expression of membrane transporters and their genetic variance could explain at least in part interindividual differences of pharmacokinetics and clinical outcome of a variety of drugs. This thesis focuses on the functional significance of gene expression of ABCB1, ABCC1 and ABCC2 and single nucleotide polymorphisms in ABCC1 gene.

Keywords: breast cancer; ABC transporter; gene expression; polymorphism

(In Czech)

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	7
1 Úvod.....	9
2 Teoretická část	10
2.1 Nádorová onemocnění.....	10
2.1.1 Mechanismus kancerogeneze	10
2.1.2 Klasifikace nádorů	11
2.1.3 Výskyt rakoviny	12
2.2 Karcinom prsu	13
2.2.1 Typy karcinomu prsu	14
2.2.2 Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu.....	15
2.2.3 Léčba karcinomu prsu.....	17
2.3 Léková resistance	24
2.4 Transportní proteiny rodiny ABC	25
2.4.1 ABCB rodina.....	28
2.4.2 ABCC rodina.....	31
2.5 Genetická variabilita studovaných ABC transportérů.....	36
2.5.1 Variabilita ABCB1	38
2.5.2 Variabilita ABCC1	41
2.5.3 Variabilita ABCC2.....	42
2.6 Exprese studovaných ABC transportérů v normálních i nádorových tkáních	44
2.6.1 Exprese ABCB1	44
2.6.2 Exprese ABCC1	45
2.6.3 Exprese ABCC2.....	46
3 Cíl práce	48
4 Praktická část	49
4.1 Použité přístroje.....	49
4.2 Použité chemikálie a materiál.....	50
4.3 Příprava a charakterizace vzorků.....	51
4.3.1 Informovaný souhlas pacientky	52
4.4 Použité metody	52
4.4.1 Izolace DNA ze vzorků krve.....	52
4.4.2 Izolace RNA ze vzorků tkáně	52
4.4.3 Izolace DNA z mezifáze	53
4.4.4 Horizontální elektroforéza na agarosovém gelu	54
4.4.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace	55
4.4.6 Syntéza cDNA.....	56

4.4.7	Amplifikace cDNA pomocí PCR.....	56
4.4.8	Příprava standardů pro real-time PCR	57
4.4.9	Kvantifikace genové exprese pomocí real-time PCR	60
4.4.10	Genotypizace ABCC1 - stanovení SNP	62
4.5	Statistické vyhodnocení výsledků	66
5	Výsledky	67
5.1	Izolace RNA z tkáně a ověření izolace pomocí horizontální elektroforézy	68
5.2	Izolace DNA z mezifáze.....	68
5.3	Synzéza cDNA z izolované RNA a ověření izolace pomocí PCR amplifikace genu a horizontální elektroforézy.....	69
5.4	Příprava standardů pro real-time PCR – příprava PCR produktu z plasmidu, purifikace PCR produktu z gelu a ředění purifikovaného PCR produktu.....	70
5.5	Stanovení exprese genů ABCB1, ABCC1 a ABCC2 a kontrolního genu PPIA pomocí real-time PCR.....	72
5.6	Genotypizace ABCC1	77
5.7	Stanovení SNP pomocí sekvenace	77
5.8	Stanovení SNP pomocí real-time PCR.....	82
5.9	Statistické vyhodnocení výsledků	84
5.9.1	Vztahy mezi expresí v nádorové a nenádorové tkáni pacientek a klinicko-patologickými daty.....	84
5.9.2	Významné vztahy mezi genotypem pacientek a klinicko-patologickými daty	86
5.9.3	Významné vztahy mezi genotypem pacientek a expresí.....	86
6	Diskuze.....	87
6.1	Stanovení genové exprese ABC transportérů (ABCB1, ABCC1, ABCC2)	87
6.2	Genetická variabilita ABCC1	90
7	Závěr	93
	Použitá literatura	95

Seznam použitých zkratek

ABC	ATP-binding cassette
ACE	angiotensin-konvertující enzym
AMK	aminokyselina
AML	akutní myeloidní leukémie
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AT	kombinovaná chemoterapie doxorubicin (Adriamycin) a paclitaxel (Taxol) či docetaxel (Taxotere)
ATP	adenosintrifosfát
BRCA	tumor supresorový gen, z angl. „breast cancer“
CMF	kombinovaná chemoterapie cyklofosfamid, methotrexát, 5-fluorouracil
CLL	chronická lymfatická leukemie
DJS	Dubin-Johnsonův syndrom
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina, z angl. „double strand“
dTTP	deoxythymidintrifosfát
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAC	kombinovaná chemoterapie 5-fluorouracil, adriamycin, cyklofosfamid
FEC	kombinovaná chemoterapie 5-fluorouracil, epirubicin, cyklofosfamid
GSH	glutathion
Her-2	z angl. „human epidermal growth factor receptor 2“
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
LTC ₄	cysteinyl-leukotrien
MDR	mnohočetná léková resistance, z angl. „multidrug resistance“
MGB	minor groove binder
mRNA	messenger RNA (informační RNA)
NF	bez nukleas, z angl. „nuklease free“

PCR	polymerasová řetězová reakce, z angl. „polymerase chain reaction“
PPIA	peptidylprolyl isomerasa A (cyklofilin A)
PTEN	tumor supresorový gen, z angl. „phosphatase and tensin homolog“
RNA	ribonukleová kyselina
SNP	jednonukleotidový polymorfismus, z angl. „single nucleotide polymorphism“
STD	standart
TNM	klasifikace nádorů, z angl. „tumor, nodes a metastasi“
TBE	Tris/borát/EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	uridindifosfát
UICC	Mezinárodní unie proti rakovině, z angl. International Union Against Cancer
UV-VIS	ultrafialová oblast, oblast viditelného světla

1 Úvod

Každý rok karcinomem prsu v České republice onemocní zhruba 6000 žen, 2000 zemře. Karcinom prsu je řazen mezi chemosenzitivní onemocnění, což znamená, že může být léčen chemickými látkami – cytostatiky. Ty jsou využívána od sedmdesátých let minulého století, z počátku se podával 5-fluorouracil či cyklofosfamid, od poloviny devadesátých let již byl součástí chemoterapeutických režimů anthracyklin, od konce devadesátých let taxany a další cytostatika jako vinorelbin, gemcitabin či kapecitabin. V současnosti lze při kombinované chemoterapii metastazujícího karcinomu prsu dosáhnout 50-85% léčebných odpovědí v terapii první linie [1]. Důvodů selhání léčby cytostatiky může být několik, jedním z nich je i resistance vznikající díky zvýšené expresi některých transportních proteinů z rodiny ABC transportérů, které mohou transportovat protinádorová léčiva z buňky. Od objevení prvního popsaného ABC transportéru ABCB1 uplynulo již 34 let a ABC transportérům se věnovalo mnoho studií, přesto stále není zcela objasněno, jakými faktory a jak přesně jsou ovlivňovány exprese ABC transportérů v tkáních a zároveň jak hladiny exprese ovlivňují průběh nemoci a léčby. Tuto problematiku řeší i předkládaná diplomová práce, která se zaměřuje zejména na expresní hladiny genů tří ABC transportérů (ABCB1, ABCC1 a ABCC2) v nádorové i nenádorové tkáni pacientek a na roli genetické variability genu pro ABCC1.

2 Teoretická část

2.1 Nádorová onemocnění

Jako nádorové onemocnění charakterizujeme choroby, při kterých dochází k nekontrolovatelnému růstu buněk s autonomní povahou buněčné proliferace [2]. Nová a abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu se označuje jako karcinom, nádor či tumor. Komplexní proces vzniku nádorů je nazýván kancerogenese (nebo karcinogenese). Společným jmenovatelem těchto onemocnění jsou genetické změny způsobující porušení regulačních procesů, což následně vede ke ztrátě diferenciaci buněk, k jejich nekontrolovatelnému dělení a ke ztrátě tkáňové celistvosti [3, 4]. Nádorová onemocnění mohou postihovat všechny mnohobuněčné organismy včetně člověka. Čím je organismus složitější, tím více druhů konečně diferenciovaných buněk obsahuje (člověk asi 200), a tím více potřebuje genů kódujících různé regulační proteiny [5].

2.1.1 Mechanismus kancerogenese

Podstatou bezchybného ontogenetického vývoje a diferenciaci buněk každého mnohobuněčného organismu je průběžná regulace exprese genů v buňkách, tedy regulace transkripce (přepisu DNA do RNA), posttranskripčních úprav, translace (produkce proteinu dle informace obsažené v RNA) a posttranslačních úprav. Geny kódující proteiny, které se zapojují do této regulace (růstové faktory, receptory, proteinkinasy, transkripční faktory), se nazývají protoonkogeny; produkty těchto genů jsou pak označovány jako protoonkoproteiny. Vedle protoonkoproteinů se na regulaci buněčného cyklu podílí také tumorové supresorové geny, jejichž produkty působí jako přirozená „brzda“ proliferace somatických buněk [3]. Bylo identifikováno přes 50 antionkogenů (geny, které produkují proti účinku onkogenů působící produkty), např. geny Rb-1 (retinoblasma 1), p53 (gen proteinu 53), WT-1 (Wilms' tumor suppressor gene), APC (adenomatous polyposis coli gene), BRCA-1/2 (breast cancer 1/2 gene), p16 (gen proteinu p16), VHL (Von Hippel-Lindau syndrome suppressor gene), DCC (tumor suppressor gene Deleted in Colorectal Cancer), PTEN (phosphatase and tensin homolog) či gen pro E-cadherin. Kromě přirozeně vznikajících chyb při replikaci může být DNA poškozena také působením vnějších faktorů. Mezi hlavní faktory zvětšující pravděpodobnost vzniku

nádorů patří faktory fyzikální (radioaktivní, kosmické, ultrafialové a Rentgenovo záření; některé druhy velmi jemných pevných částic, např. azbestu nebo sloučenin berylia atd.), dále biologické vlivy (genetické předpoklady a některé viry – odhaduje se, že až 15 až 20% případů rakoviny je způsobeno onkoviry), a také chemické kancerogeny. Obvykle je ovšem potřeba pěti nebo šesti nezávislých mutací, které se musí odehrát v jediné buňce, aby došlo ke kancerogenezi. Mutace vedoucí ke vzniku nádorů se neobjevují najednou, ale postupně se hromadí v průběhu let. Někteří jedinci mají vrozenou zárodečnou mutaci v tumor supresorovém genu nebo protoonkogenu a množství dalších mutací potřebných pro rozvoj rakoviny je u nich menší než u jedinců bez mutací, a proto je u nich vznik nádorového onemocnění pravděpodobnější [6].

Proces kancerogeneze se sestává z několika fází – zahajuje ho iniciace, kdy dochází ke genetické poruše účinkem vnitřních a vnějších faktorů, porucha ale může zůstat bez funkčních důsledků řadu let. Teprve působením dalších podnětů dochází k následnému vývoji – k tzv. promoci, při které se objevují poruchy diferenciaci. V tomto období je ještě možné zastavit tento abnormální vývoj. V opačném případě proces pokračuje, mění se zásadním způsobem fenotyp buněk a vzniká maligní klon (stadium transformace). Transformované buňky ztrácejí schopnost odpovědi na regulační mechanismy, dochází k lokálnímu růstu nádoru (progrese) a posléze k šíření nádoru mimo prvotní ložisko (stadium metastazování) [5].

2.1.2 Klasifikace nádorů

Nádory lze podle biologických vlastností rozdělit na benigní a maligní. Benigní (nezhoubné) nádory nejsou pro člověka tolik nebezpečné, zůstávají ohraničeny v místě svého vzniku ve tkáni a jejich buňky se podobají normálním buňkám. Maligní (zhoubné) nádory obsahují oproti normální nenádorové tkáni méně diferencované buňky, které mají sníženou adhezivitu a nebývají závislé na růstových regulačních faktorech. Buňky nádoru také ztrácejí schopnost kontaktní inhibice a mívají poruchy regulace apoptosy. Naopak získávají schopnost neomezeně proliferovat a také bývají často aneuploidní. Buňky maligních nádorů jsou také schopny migrovat krevním řečištěm do vzdálenějších tkání a tam vytvářet nová nádorová ložiska – metastázy. Nádory jsou klasifikovány podle vzrůstající malignity do stupňů I – IV na základě morfologických znaků buněk a tkáně, kterými jsou nepravidelnost jádra, počet mitos, vaskulární proliferace, přítomnost nekros a stupeň diferenciaci buněk. Stupeň tedy určuje metastatický potenciál a agresivitu nádoru.

Stupňování je vždy vypracováno pro jednotlivé histologické typy nádorů a prakticky není možné jeho zobecnění. Existují i další klasifikační postupy, například TNM klasifikace (T – velikost tumoru; N – postižení mízní uzliny; M – přítomnost metastáz). Téměř všechny tkáně v těle mohou podléhat nádorové transformaci [7].

2.1.3 Výskyt rakoviny

- Výskyt rakoviny celosvětově

Sledování incidence (počet nových případů) nádorových onemocnění a mortality (počet úmrtí) je nezbytné pro stanovení priorit v boji proti rakovině. Podle dat z roku 2008 se v tomto roce vyskytlo 12,4 milionů nových případů a 7,6 milionů úmrtí. Mezi nejčastější nádorová onemocnění na světě z hlediska výskytu patřily nádory plic (1,52 milionu případů), prsu (1,29 milionu) a tlustého střeva (1,15 milionu). Kvůli špatné prognóze jsou nádory plic také nejčastější příčinou úmrtí (1,31 milionu), následují nádory žaludku (780 000 úmrtí) a jater (699 000 úmrtí). U žen se na přední příčce drží nádory prsu s přibližně 715000 nových případů diagnostikovaných v rozvinutých regionech (Evropa, Severní Amerika, Austrálie/Nový Zéland a Japonsko), což je 26,5% z celkového počtu případů. Dalšími často se vyskytujícími nádory u žen ve vyspělých zemích jsou nádory plic, rakoviny tlustého střeva a konečníku. V méně rozvinutých zemích se v počtu úmrtí na prvním místě drží rakovina děložního hrdla s přibližně 275 000 úmrtími (13,9% z celkového počtu), následována nádory prsou (252 000 úmrtí, 12,7%) a žaludku (189 000 úmrtí, 9,6%). U mužů hrají hlavní roli nádory plic, odhaduje se 455 000 úmrtí v rozvinutých regionech (27% z celkového počtu úmrtí) a 475 000 v méně rozvinutých zemích (18,2%) [8].

- Výskyt rakoviny v České Republice

Statistické studie pro Českou republiku ukazují, že zaujímáme 1. místo v Evropě v četnosti výskytu rakoviny tlustého střeva.

Nejčastějším zhoubným onemocněním u mužů v České republice jsou, stejně jako celosvětově, nádory plic. V roce 2003 onemocnělo 4600 mužů; výrazně však přibylo i nádorů tlustého střeva, konečníku a prostaty. Snižuje se naopak výskyt nádorů žaludku.

Nejčastějším zhoubným onemocněním u žen jsou nádory prsu. V roce 2003 nově onemocnělo přes 6000 žen; zářející je výrazný nárůst nových případů karcinomu plic, povzbuzující je naopak pokles výskytu karcinomu žaludku a nezvyšující se nálezy karcinomu děložního čípku [9].

2.2 Karcinom prsu

Nádorová onemocnění prsu provází lidstvo od počátku jeho dějin. První zmínky o této chorobě se našly již ve starých papýrech z doby 1600 let před Kristem [10].

Prsa jsou párový orgán, v němž je uložena mléčná žláza (glandula mammae), obklopená vazivovou a tukovou tkání pod kůží hrudi. Hlavní funkcí prsu je tvorba mléka nebo-li laktace. Začíná až krátce po porodu. Před porodem je z mléčné žlázy vyměšován pouze vodnatý sekret – mlezivo [11].

Na molekulární úrovni hrají důležitou roli v boji s nádorem prsu oblasti genetiky a molekulární biologie. V genetické kontrole procesu buněčného cyklu bylo identifikováno více než 150 různých genů. U jednotlivých typů nádorové transformace buněk dochází v průměru k poruše 10 až 15 z nich [12]. Metody molekulární biochemie umožňují podrobně studovat změny na úrovni syntézy DNA a proteinů v nádorových buňkách. Těchto informací se také začíná využívat v klinické praxi jako podklad pro rozhodování o dalším terapeutickém postupu. Genetické polymorfismy a tedy individuální rozdíly u jednotlivých žen se spolupodílí nejen na míře rizika vzniku nádoru, ale také na efektivitě aplikovaných léčebných postupů [13]. Česká republika se v posledních letech, podobně jako jiné vyspělé země, potýká s nárůstem incidence rakoviny prsu a s jejími důsledky. K výraznějšímu nárůstu incidence dochází především po roce 1990, což můžeme vysvětlit souhrou několika rizikových faktorů, které po převratu nabraly na síle (rozšířenější užívání hormonální terapie, životní styl populace přibližující se západnímu [14]). Nárůst odhalených zhoubných nádorů prsu je přičítán i většímu využívání mamografu, díky čemuž jsou lékaři schopni odhalit již nádory malého rozsahu. Po převratu počet mamografů narostl a jejich využívání se výrazně zvýšilo, v roce 1993 jich bylo v ČR v resortu zdravotnictví registrováno 56, v roce 2005 už 144 [15]. Současně se postupně prodlužuje střední délka života české populace a dochází ke klesání úmrtnosti [16]. Počet případů nádorových onemocnění prsu u žen však s přibývajícím věkem roste, což je jev, který u nás sledujeme již 30 let. Ve věkové skupině 25 až 29 let bylo v roce 2000 hlášeno 2,9 případů na 100 000 žen, nejvyšší počet nově hlášených onemocnění byl mezi 50 až 54

lety (168,7 na 100 000 žen) [17]. Díky prodlužování života české populace a nižší úmrtnosti se zvyšuje počet osob ve vyšším věku a tím i počet osob ohrožených onkologickými nemocemi. Tento fakt by měl být opodstatněním pro zvýšenou pozornost tvůrců podpory zdraví k onemocnění rakovinou prsu. Úmrtnost na rakovinu prsu od počátku 90. let stagnuje a v jejich druhé polovině dokonce navzdory rostoucí incidenci začíná klesat, viz. graf na obrázku č. 1. Na grafu s větším rozlišením by bylo klesání úmrtnosti ještě zřetelnější. Klesání úmrtnosti v ČR se přičítá především rozšíření skríninkových metod včasného záchytu nádoru, vyšší informovanosti žen médii o nutnosti pravidelného samovyšetřování prsů a zkvalitnění léčby.



Obrázek č. 1: Graf mortality a incidence u žen 15+ v České republice, období 1977-2007, staženo z www.svod.cz 27.04.10

2.2.1 Typy karcinomu prsu

Rozlišujeme několik druhů zhoubného nádoru prsu:

2.2.1.1.1 Duktální karcinom in situ

Jedná se rané stádium nádoru, který nemá schopnost metastazovat. Vzniká ve vývodech prsu a nepronurůstá do okolní tkáň. Pokud by nebyl odstraněn, mohl by se postupně změnit na zhoubný nádor. Všechny ženy s tímto nádorem mohou být vyléčeny. Nejlépe zjistitelný je pomocí rentgenu prsu - mamografie.

2.2.1.1.2 Invazivní (do okolí prorůstající) duktální karcinom

Tento nádor vzniká v mléčných vývodech, přičemž nádorové buňky pronikají (invaze) přes stěnu vývodů a napadají okolní tukovou tkáň. Odtud se mohou rozšířit do jiných částí těla (metastazovat). Tento typ zhoubného nádoru tvoří přibližně 80% případů.

2.2.1.1.3 Lobulární karcinom in situ

Nejedná se o zhoubný nádor, protože nemá schopnost zakládat vzdálené metastázy. Roste jenom v místě vzniku, proto se nazývá in situ. Jeho přítomnost ale zvyšuje riziko vzniku zhoubného nádoru prsu. Proto by měly být ženy s tímto typem karcinomu vyšetřeny lékařem jednou ročně včetně vyšetření zobrazovacími metodami (ultrazvuk, mamografie).

2.2.1.1.4 Invazivní (do okolí prorůstající) lobulární karcinom

Je to méně častý typ zhoubného nádoru prsu. Tvoří kolem 10 až 15 procent všech zhoubných nádorů prsu. Vzniká v lalůčkách (lobulech) prsní žlázy [9].

2.2.2 Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu

Na vznik rakoviny má vliv mnoho faktorů. Podezřelé byly kromě vlivu antikoncepčních pilulek či kouření např. i barvy na vlasy, v nichž se v 70.-80. letech zjistily velmi účinné kancerogeny a mutageny, které poškozují DNA a způsobují tak mutace [18]. Vliv těchto faktorů na vznik nádorů prsu se ale zatím prokázat nepodařilo. Mezi prokázané vlivy na výskyt nádorů prsu patří:

- Hormony

Díky vývoji poznání na molekulární úrovni, především gynekologické endokrinologie, se dnes za klíčovou determinantu nádoru prsu považují estrogény, změny jejich metabolismu a celkového působení v průběhu života ženy [13, 19-21]. Jako klíčový faktor pro vznik rakoviny prsu byl zjištěn estrogenový receptor v buňkách prsní žlázy [22]. Hladiny estrogenu v průběhu života ovlivňují díky těmto receptorům řadu buněčných pochodů důležitých také pro vznik rakoviny prsu. Význam estrogenu vystoupil do popředí s užíváním hormonální antikoncepce, s prodlužováním střední délky života a především s potřebami léčby nemocí a zdravotních potíží v postmenopauzálním období, které se

běžně léčí užíváním hormonální substituční terapie. Vliv užívání perorální antikoncepce zatím nebyl jednoznačně prokázán, zatímco vliv hormonální terapie již studie potvrdily [23].

- Věk a genetická zátěž

Věk a genetická zátěž jsou determinantami, proti kterým je nemožné působit, poznatky o nich lze ale využít k identifikaci rizikových skupin žen a na ně pak zaměřit specifická opatření podpory zdraví. Věk je obecně silný rizikový faktor vzniku nádorových onemocnění včetně rakoviny prsu [23]. Vrozená genetická zátěž (asi 10% případů) je výrazným faktorem ve vzniku rakoviny prsu. Existuje-li v rodinné anamnéze rakovina prsu, zvyšuje se riziko ženy, že onemocní již v mládí nebo že dojde k recidivě v případě vzniku rakoviny prsu. Díky poznatkům z genetiky víme, že mezi prokázané a dnes již v klinické praxi používané faktory vzniku rakoviny prsu patří mutace některých genů, např. BRCA1, BRCA2, méně často genů p53, PTEN nebo STK11 (gen pro serin/threonin kinasu 11) [24]. U mutací genů BRCA1 či BRCA2 dosahuje riziko onemocnění nádorem prsu až 85%, což je riziko téměř 10-krát vyšší než jakým je zatížena ostatní populace. Do rizikové populace patří žena, v jejíž rodině se objevil nádor prsu u dvou a více žen v přímé příbuzenské linii nebo v nízkém věku. Zde existuje již vysoká pravděpodobnost, že se jedná o dědičnou dispozici k onemocnění, přestože svou roli mohou hrát i životní podmínky a životní styl v rámci rodiny [14].

- Životní styl

Se způsobem života v rozvinutých zemích je spojeno mnoho faktorů, které nahrávají vzniku civilizačních nemocí. Hlavními důkazy jsou epidemiologické studie srovnání výskytu onemocnění. Celkově vykazovala nejvyšší incidenci v letech 1993–1997 Severní Amerika a země severní Evropy. Nejnižší incidenci onemocnění (27 žen na 100 000) najdeme v asijských zemích [25], oproti nejvyšší mezi americkými bílými ženami (130 žen na 100 000) [26]. Rakovina prsu zatím zůstává nemocí rozvinutých zemí, které ale také vykazují mezi sebou rozdíly, což některé výzkumy označují jako výsledek různého přístupu k používání mamografického skríninku, nebo je přičítají rozdílům v životním stylu a dědičné zátěži v těchto zemích. Důležitým faktorem v rámci životního stylu je výživa. Alkohol přináší ze zdravotního hlediska pro i proti, ve spojení s otázkou

vzniku rakoviny prsu ale může zvyšovat riziko vzniku, pokud si žena alkohol dopřává denně. Pravidelné užívání alkoholu je v současné době jediným faktorem týkajícím se výživy, který se uznává jako rizikový pro vznik rakoviny prsu [25].

2.2.3 Léčba karcinomu prsu

U prokázaného zhoubného nádoru patolog určí typ nádorového bujení a stupeň jeho schopnosti pronikat do okolí. Speciální laboratorní testy odejmuté nádorové tkáně pomáhají lékařům odhadnout další chování nádoru, např. citlivost či necitlivost na hormony a případně i další parametry, jako je přítomnost receptoru Her-2. Po dalších vyšetřeních je zjištěn rozsah onemocnění, na jehož základě se pak určí, jakým způsobem bude pacientka léčena. Obecně lze říci, že existují tři léčebné způsoby, které se v různé míře kombinují či doplňují. Je to léčba chirurgická, radiační a systémová. Zatímco léčba chirurgická a radiační jsou metodami léčby místní, léčba chemická, hormonální a biologická jsou metodami léčby celkové – systémové [27].

2.2.3.1 Místní léčba

1) Chirurgická léčba

Nejobvyklejším prvotním léčebným zásahem je operační výkon. Může jím být radikální výkon – amputace prsu nebo částečný výkon, kdy prs zůstane zachován. Rozsah výkonu záleží na více okolnostech, zejména na velikosti a umístění nádoru. Součástí výkonu je i odstranění podpažních uzlin. Mikroskopickým vyšetřením odebrané tkáně se zjišťuje typ nádorového bujení a jeho vztah k okolní zdravé tkáni. Operace prsu patří obecně mezi méně zatěžující chirurgické výkony. Propuštění z nemocnice je možné očekávat po několika dnech. Snaha je o co nejrychlejší zahojení operační rány. Nejčastějšími komplikacemi jsou serom či hematom, tj. hromadění tekutiny nebo krve pod jizvou, a vzácněji infekce [27].

2) Radioterapie

Radioterapie (léčba zářením) je nejstarší neoperační léčebnou metodou užívanou k léčbě zhoubných nádorů. Zajímavé je, že první onkologickou pacientkou v dějinách lidstva léčenou ozařováním je právě pacientka s karcinomem prsu v roce 1895. Léčba využívá paprsků, které buď vycházejí ze zářičů, při čemž jsou radioizotopy uzavřeny v kontejnerech nazývaných bomby (kobaltová bomba – izotop Co^{60} , cesiová bomba – izotop Cs^{137}), nebo využívá záření, které je uměle vyráběno v nejmodernějších přístrojích, tzv. lineárních urychlovačích. Paprsky z ozařovacích přístrojů působí změny v nádorových buňkách, jejichž následkem tyto buňky buď okamžitě zahynou, nebo ztrácejí schopnost nekonečného množení a po určitém čase zaniknou. Tyto účinky však nastávají nejen v nádorových buňkách, ale i v okolní zdravé tkáni. V léčbě karcinomu prsu existují dvě základní situace (indikace), kdy se bez radioterapie neobejdeme. První indikací, velmi častou, je léčba malých nádorů v počátečním stadiu choroby, kdy je provedena záchovná operace a není odstraněn celý prs. Po uvedeném typu operace je vždy nezbytné prs ozářit, protože pooperační ozáření po záchovné operaci snižuje pravděpodobnost recidivy onemocnění a zvyšuje šanci na vyléčení. Druhou indikací k ozáření je léčba pokročilejších nádorů, větších než 4–5 cm, kdy je nutné odstranit celý prs. U těchto nádorů je velká pravděpodobnost, že se onemocnění může na hrudní stěně objevit i po ablaci celého prsu, a proto se hrudní stěna ozařuje. Ozařovat je nutné i tehdy, pokud jsou postiženy podpažní (axilární) mízní uzliny. Ozáření ideálně doplňuje operaci, ale nemůže ji nikdy zcela nahradit. Účinnost záření na nádory prsu je největší právě po operaci, kdy předpokládáme minimální zbytkovou chorobu [27].

2.2.3.2 Systémová léčba

Léky se dostávají do krevního oběhu a jsou rozvedeny po celém těle pacienta, a postihují tak veškeré buňky. Pro co nejlepší výběr léčebného schématu potřebujeme znát řadu klinických parametrů, zejména přesný rozsah choroby, abychom nemocnou mohli zařadit do určité prognostické skupiny a mohli vhodně kombinovat hormonální i chemickou léčbu.

Rozdělení systémové léčby podle indikací

Při rozhodování o chemoterapii, hormonální terapii a biologické léčbě je třeba brát v úvahu rozsah nádoru, dávkování léčiv, správné načasování a možnost vzniku resistance na jednotlivá cytostatika i jiné léky. V zásadě existují tři indikační skupiny systémové léčby:

1) Adjuvantní systémová léčba

Adjuvantní systémová léčba je aplikována u žen po předchozí chirurgické léčbě, která odstranila celý nádor. V době, kdy k adjuvanci přistupujeme, je nemocná bez aktuálních známek nádorové choroby. Adjuvantní léčbou sledujeme zničení předpokládaných možných nádorových mikroložisek. Cílem je prodloužení beznádorového intervalu a celkové doby přežití až vyléčení.

2) Neoadjuvantní systémová léčba

Neoadjuvantní systémová léčba je aplikována u žen s pokročilým, ale technicky operabilním primárním nádorem s případným postižením regionálních uzlin nebo u žen s velkým primárním nádorem omezené operability (primární chemoterapie). V době, kdy se k tomuto typu léčby přistupuje, je nemocná bez jakýchkoliv známek vzdálených metastáz. Neoadjuvantní chemoterapií se sleduje zmenšení primárního nádoru, popřípadě i uzlin, zlepšení operability a umožnění záchovných operací (lumpektomie, segmentektomie, kvadrantektomie, tj. konzervativní chirurgické výkony). Neoadjuvance si podobně jako adjuvantní chemoterapie klade za cíl zničení předpokládaných skrytých a objektivně nezjistitelných mikrometastáz. Konečným cílem je kromě zachování prsu prodloužení beznádorového intervalu a prodloužení celkové doby přežití [27].

3) Paliativní systémová léčba

Nemocné s metastatickým karcinomem prsu se podrobují paliativní systémové léčbě. Systémovou léčbou sledujeme navození částečné či kompletní remise (ústupu choroby), usnadnění života s chorobou, prodloužení života s chorobou, případně u kompletní remise (úplné vymizení nádoru) navození co nejdelšího beznádorového intervalu [27].

Samotná systémová léčba zahrnuje několik možností léčby:

I. Hormonální léčba

Hormonální léčba patří mezi nejstarší způsob léčby karcinomu prsu. Indikace hormonální léčby je založena na průkazu hormonálních receptorů. Pokud nejsou v nádorové tkáni hormonální receptory přítomny, hormonální léčba se nepodává, neboť je neúčinná [27].

II. Biologická léčba

Biologická léčba znamená podávání látek, které ovlivňují řetězce dějů určitých receptorů nezbytných pro přežívání, množení a růst buněk. V současnosti jsou u nás pro léčbu karcinomu prsu registrovány léky trastuzumab (Herceptin), bevacizumab (Avastin) a lapatinib (Tyverb). Biologické léky existují ve dvou hlavních formách. Jsou to jednak protilátky proti receptorům na povrchu buněk, např. Her-2 (trastuzumab, bevacizumab) a jednak tzv. malé molekuly zaměřené proti nitrobuněčným komponentům řetězce nezbytných dějových drah. Biologické léky se podávají dlouhodobě (až rok i déle), a to v určitých intervalech a v kombinacích s cytostatiky či hormony i samostatně. Léčba biologickými látkami je neobyčejně nákladná, ale u přesně vymezené skupiny nemocných (např. nositelé znaku Her-2) je plně hrazena pojišťovny. Každá žena - nositelka znaku Her-2 má právo v případě, že je vhodná k léčbě Herceptinem, být odeslána k terapii do specializovaného centra [27].

III. Chemoterapie

Chemoterapie je léčba chemickými látkami – cytostatiky s prokázaným protinádorovým účinkem. V současné době existuje nejméně čtyřicet cytostatik s prokázanou účinností v léčbě karcinomu prsu. Procento účinnosti jednotlivých cytostatik použitých samostatně se pohybuje mezi 20 až 65%. Účinnost je značně zvýšena při jejich kombinování běžném v klinické praxi. Cytostatika působí v různé fázi buněčného cyklu a mají různý mechanismus účinku. Z cytoticketého hlediska lze většinu cytostatik rozdělit do dvou skupin: cytostatika účinná v průběhu celého cyklu a cytostatika účinná jen v některé fázi buněčného cyklu. Cytotoxické látky v buňce zasahují do nejrůznějších metabolických procesů, blokují enzymatické systémy. Početná skupina cytostatik působí na základě strukturální podobnosti s přirozenými metabolity (produkty látkové výměny). Nazývají se analoga nebo antimetabolity (podle způsobu účinku). Dále mohou poškozovat nukleové kyseliny, což způsobuje nemožnost dělení buňky až její smrt. Cytostatika s různým mechanismem účinku se kombinují, čímž se dosahuje většího léčebného účinku [27]. Cytostatika můžeme rozdělit dle mechanismu do několika skupin:

- Alkylační cytostatika

Chemicky reaktivní látky, které reagují s DNA - nositelkou genetické informace v buňkách. Ta se jejich působením může rozštěpit, popřípadě může dojít k pevnému spojení dvou řetězců nebo i dvou samostatných molekul DNA. Všechny tyto změny vedou k nesprávné funkci buňky a nemožnosti jejího dělení. Do této skupiny patří busulfan, chlorambucil, cyklofosfamid, dakarbazin, estramustin, fotemustin, ifosfamid, karmustin, lomustin, melfalan a temolozomid [28].

- Antidota a protektiva

Skupina léčiv, které chrání před některými nežádoucími účinky chemoterapie nebo ozařování, řadíme sem například amifostin, dexrazoxan, leukovorin a mesnu [28].

- Antimetabolity

Při dělení buňky se musí zdvojit genetická informace buňky nesená DNA. K vytvoření nové molekuly DNA jsou nutné 'stavební kameny', především sloučeniny purinů a pyrimidinů. Antimetabolity jsou látky, které různým způsobem blokuji vytváření těchto 'stavebních kamenů', bez nichž nemůže vzniknout nová DNA, buňka se pak nemůže dělit. Antimetabolity tímto mechanismem ovlivňují dělení všech buněk v organismu, tedy nejen buněk nádoru, ale i buněk zdravých tkání, které se musejí trvale obnovovat (krvinky, sliznice zažívacího traktu apod.). Do této skupiny látek patří 5-fluorouracil, 6-merkaptopurin, 6-thioguanin, cytarabin, fludarabin, gemcitabin, hydroxymočovina, kapecitabin, kladribin, methotrexát, pemetrexed, raltitrexed či tegafurum [28].

- Platinová cytostatika

Relativně jednoduché chemické látky obsahující platinu, mechanismus jejich účinku je obdobný jako u alkylačních látek - reagují s DNA. Ta se jejich působením může rozštěpit, popřípadě může dojít k pevnému spojení dvou řetězců nebo i dvou samostatných molekul DNA. Všechny tyto změny vedou k nesprávné funkci buňky a nemožnosti jejího dělení. Řadíme sem například cisplatinu, karboplatinu či oxaliplatinu [28].

- Protinádorová antibiotika

Antibiotika ze skupiny anthracyklinů, aktinomycinů popř. dalších působí interkalací - pevně se spojují s oběma řetězci DNA, ve kterých je uložena genetická informace. Toto pevné spojení brání replikaci DNA před dělením buňky, ale znemožňuje i transkripci genetické informace. Některá antibiotika mohou vést rovněž k poškození buněčné membrány a tím celé buňky. Do této skupiny látek řadíme například bleomycin, doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, idarubicin, mitomycin C či mitoxantron.

- Inhibitory topoisomerasy

Topoisomerasy jsou enzymy důležité pro replikaci DNA. Dvojitá šroubovice DNA se jejich účinkem „rozplétá“ a rozkládá na jednotlivé segmenty, které se po replikaci opět skládají a splétají dohromady. Při inhibici topoisomerasy I a topoisomerasy II jsou tyto

mechanismy blokovány – replikace je znemožněna a DNA se rozpadá. Zástupci této skupiny jsou například docetaxel, etoposid, ellipticin, VP-16, irinotekan, paclitaxel, topotekan, vinblastin, vincristin či vinorelbin [28].

Výběr chemoterapeutického režimu závisí hlavně na rozsahu onemocnění, rizikových faktorech a celkovém stavu pacientky. Nejčastěji aplikované léčebné preparáty při chemoterapii jsou:

Kombinovaná chemoterapie CMF (cyklofosamid, methotrexát, 5-fluorouracil)

Tato terapie výrazně snižuje riziko návratu nemoci a absolutního počtu úmrtí na zhoubný nádor prsu.

Anthracykliny (epirubicin, doxorubicin)

Chemoterapie založená na anthracyklinu je spojená s lepším léčebným účinkem, tedy výraznějším snížením rizika návratu nemoci, ale i s vyšším rizikem komplikací. K hlavním nežádoucím účinkům patří hlavně možnost poškození srdce, vypadávání vlasů, zvracení a pokles množství bílých krvinek spojený s možností infekce.

Taxany (docetaxel, paclitaxel)

Nejnovější klinické studie prokázaly, že přidání taxanu do adjuvantní chemoterapie k anthracyklinům může u některých pacientek zlepšit léčebné výsledky a zvýšit tak pravděpodobnost jejich přežití. Léčba je však spojená s výraznějšími nežádoucími účinky, ke kterým patří hlavně pokles bílých krvinek spojených s možností infekce, zažívací potíže, poškození sliznic, nervů a kůže. Většina změn je však vratná a po skončení chemoterapie se upraví do normy [29].

2.3 Léková resistance

Jednou z nejzávažnějších komplikací protinádorové léčby a nejdůležitější příčinou jejího selhání je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytotoxických látek. Maligní buněčné populace mohou být vůči chemoterapii resistantní již při první léčbě. V tomto případě jde o tzv. přirozenou (primární) resistenci. Získaná (sekundární) resistance vzniká až v průběhu cytostatické léčby, kdy se původně citlivé buňky stávají resistantními a účinnost cytostatické léčby se snižuje [30]. Lékovou resistenci v případě rakoviny je možno přirovnat k resistenci k antibiotikům [31]. Buněčná resistance k chemoterapeutikům vzniká z důvodu snížení koncentrace aktivní látky v místě účinku, v důsledku zvýšeného metabolismu nebo pozměněného transportu (množství, směr) této aktivní látky [32]. Při ztrátě citlivosti k určitému cytostatiku může být zachována citlivost k jiným léčivům. Pokud při ztrátě citlivosti k jednomu přípravku vzniká současně resistance na jiné, většinou strukturálně příbuzné cytostatikum, hovoříme o zkřížené resistenci. Byly však popsány případy zkřížené resistance mezi protinádorovými léčivy lišícími se jak strukturně, tak mechanismem účinku. Takové případy resistance pak nazýváme mnohočetná léková resistance (multidrug resistance, MDR) [30]. Mezi léčiva, na která vzniká resistance, patří anthracykliny (doxorubicin, daunomycin), vinka-alkaloidy, actinomycin D, valinomycin, gramicidin D, puromycin a také taxany (paclitaxel, docetaxel) [33].

Poprvé byla MDR popsána v roce 1970 na buněčné linii izolované z plic čínského křečka a na buněčné linii myši leukémie. Autoři zde pozorovali zkříženou resistenci buněk resistantních na aktinomycin D s vinblastinem a daunomycinem [34].

MDR vysvětluje případy necitlivosti některých nádorů k alternativním léčebným režimům, obsahujících nové druhy cytostatik nepoužitých v původní léčbě. Hlavní příčinou MDR je zvýšená exprese tzv. ABC transportních proteinů na membránách nádorových buněk, které pumpují molekuly léčiv do extracelulárního prostoru. Tím snižují akumulaci cytostatik v buňkách a jejich cytotoxický účinek. Jedná se především o zvýšenou expresi ABC transportérů ABCB1 z rodiny ABCB, dále proteinů rodiny ABCC (ABCC1-9) a nedávno objeveného ABCG2 [35].

2.4 Transportní proteiny rodiny ABC

Tabulka č. 1: Přehled vlastností proteinů z rodiny ABC transportérů [36]

Symbol (používané názvy)	Lokalizace	Délka genu/ počet AMK	Tkáňová exprese	Biologická funkce
ABCA (ABC1) podrodina				
ABCA1 (TGD, HDLTD1, CERP)	9q22-q31	6,9 kB 2261 AMK	většina tkání	regulace buněčného cholesterolu a homeostáza fosfolipidů
ABCA2	9q34	8 kB 2436 AMK	mozek, ledviny, plíce, srdce	
ABCA3 (ABC-C)	16p13.3	6,5 kB 1704 AMK	plíce a další tkáň	
ABCA4 (ABCR, RP19, ABC10 FFM, STGD, STGD, RIM, RMP)	1p22	7,3 kB 2273 AMK	retina, buňky fotoreceptorů	zprostředkování transportu molekul receptoru přes buněčnou membránu fotoreceptoru
ABCA5	17q21-q24	6,5 kB 1642 AMK	svaly, srdce, varlata	
ABCA6	17q21	5,3 kB 1617 AMK	játra	
ABCA7	19p13.3	6,6 kB 2146 AMK	leukocyty, thymus, kostní dřeň	homeostasa lipidů v buňkách imunitního systému
ABCA8	17q24	5,7 kB 1581 AMK	vaječníky	
ABCA9	17q24	6 kB 1624 AMK	srdce	
ABCA10	17q24	6,18 kB	svaly, srdce	účast v transportu cholesterolu
ABCA12	2q35	7 kB 2595 AMK	žaludek	
ABCA13	7p11-q11	450 kB 5058 AMK	trachea, varlata, kostní dřeň	
ABCB (MDR/TAP) podrodina				
ABCB1 (PGY1, MDR1, P-GP, GP170)	7q21	4,5 kB 1280 AMK	většina tkání, především s funkcí bariéry (játra, mozek, ledviny, střeva a placenta)	efluxní pumpa pro řadu xenobiotik, vysoká exprese zodpovědná za rozvoj resistance vůči cytostatikům
ABCB2 (TAP1, PSF1, RING4, APT1, D6S114E)	6p21.3	2,5 kB 808 AMK	většina tkání	transport peptidů
ABCB3 (TAP2, PSF2, RING11, D6S217E, ABC18)	6p21.3	2,8 kB 653 AMK	většina tkání	transport peptidů
ABCB4 (PGY3, MDR2/3, MDR3, PFIC-3, ABC21)	7q21	4,5 kB 1279 AMK	hepatocyty	bilární sekrece fosfatidylcholinu z hepatocytů
ABCB5	7p14	7,5 kB	všudypřítomný	
ABCB6 (ABC14, UMAT, MTABC3)	2q33-q36	2,4 kB 752 AMK	mitochondrie buněk	účast na transportu železa
ABCB7 (ATM1P, ASAT)	Xq13.1-q13.3	2,4 kB 752 AMK	mitochondrie buněk	transport hemu z mitochondrií do cytosolu
ABCB8 (M-ABC1)	7q35-q36	2,4 kB 718 AMK	mitochondrie buněk	transport hemu z mitochondrií do cytosolu a fosfolipidů v buňkách

ABCB9 (TAPL)	12q24	3,5 kB 723 AMK, 766 AMK	srdce, mozek, lysosomy	
ABCB10 (M-ABC2, MTABC2)	1q42	4,1 kB 738 AMK	mitochondrie buněk	
ABCB11 (BSEP, SPGP, PFIC2, PGY4, ABC16)	2q24	5,4 kB 1321 AMK	hepatocyty	aktivní transport žlučových solí
ABCC (CFTR/MRP) podrodina				
ABCC1 (MRP1, MRP, ABCC, GS-X, ABC29)	16p13.1	6,5 kB 1531 AMK	mnoho tkání, zejména plíce, varlata	multispecifický transportér, substráty jsou GSH, cysteiny, LTC ₄ , aflatoxin B1, glukuronidy, sulfátové konjugáty ster.hormonů a žluč. solí, některá léčiva
ABCC2 (MRP2, CMOAT)	10q24	5,5 kB 1545 AMK	játra, střeva, ledviny	biliární transport xenobiotik, např. vinblastin
ABCC3 (MRP3)	17q21.3	6,5 kB 1527 kB	játra, střeva, ledviny	biliární a střevní exkrece organických aniontů
ABCC4 (MRP4)	13q32	6,5 kB 1325 AMK	většina tkání	transport cyklických nukleotidů, nukleosidových monofosfátových analogů a prostaglandinů
ABCC5 (MRP6)	3q27	6.6 kB 1437 AMK	většina tkání, zejména játra	transport cyklických nukleotidů, nukleosidových monofosfátových analogů
ABCC6 (MRP6)	16p13.1	6,5 kB 1503 AMK	ledviny, hepatocyty	transport peptidů a GSH konjugátů
ABCC7 (CFTR)	7q31.2	6 kB	plíce, střeva, cholangiocyty,	chloridový kanál
ABCC8 (SUR1)	11p15.1	5 kB 1581 AA	slinivka	modulátor sensitivních draselných kanálů
ABCC9 (SUR2)	12p12.1	5 kB 1549 AMK	srdce a kosterní svalstvo, nízké hladiny v ostatních tkáních	draselný kanál
ABCC10 (MRP7)	6p21	5.5 kB 1464 AMK	nízké hladiny ve všech tkáních	transport 17β-estradiol-D-17β-glukuronidu
ABCC11 (MRP8)	16q12.1	4.6 kB 1382 AMK	všechny tkáně, hlavně játra a prsní tkáň	
ABCC12	16q12	5 kB 1359 AMK	nízké hladiny ve všech tkáních	
ABCC13	21q11.2	325 AMK	kostní dřev a periferní výskyt	
ABCD (ALD) podrodina				
ABCD1 (ALD, ALDP)	Xq28	2.8 kB 745 AMK	peroxisomy	peroxisomální transport mastných kyselin
ABCD2 (ALDL1, ALDR)	12q11	3.5 kB 740 AMK	peroxisomy	peroxisomální transport mastných kyselin
ABCD3 (PXMP1, PMP70)	1p21-22	3.3 kB 659 AMK	peroxisomy	peroxisomální transport mastných kyselin
ACD4 (PXMP1L, P70R)	14q24.3	2.9 kB 606 AMK	peroxisomy	peroxisomální transport mastných kyselin
ABCE (OABP) podrodina				
ABCE1 (RNASEL1, OABP)	4q31	2.9 kB 402 AMK	vaječníky, varlata	inhibitor RNas
ABCF (GCN20) podrodina				
ABCF1 (ABC50)	6p21.33	3.14 kB 807 AMK	všechny tkáně	úloha ve zvýšení proteosyntézy při zánětlivých procesech

ABCF2	7q35-q36	2.2 kB 623 AMK	všechny tkáně	
ABCF3	3q25.1 -q25.2	2.8 kB 709 AMK	všechny tkáně	
ABCG (bílá) podrodina				
ABCG1 (ABC8, Bílý)	21q22.3	2.7 kB 638 AMK	mozek, plíce	vylučování cholesterolu
ABCG2 (BCRP1, MXR, ABCP)	4q22	2.4 kB 655 AMK	placenta, srdce, játra, střeva	transport xenobiotik, steroidů, organických anionů, úloha v rozvoji resistance vůči mitoxantronu a anthracyklinům
ABCG3	8p12			
ABCG4 (Bílý 2)	11q23.3	3.5 kB 627 AMK	makrofágy, mozek, oko	
ABCG5 (Bílý , Sterolin 1)	2p21	2.3 kB 651 AMK	játra, tenké střevo	transport a exkrece sterolů
ABCG8 (Bílý 4, Sterolin 2)	2p21	2 kB 673 AMK	játra, tenké střevo	transport a exkrece sterolů

Termín „ABC transportér“ se poprvé objevil v roce 1992 v článku Christophera Higginse jako název sjednocující tuto skupinu proteinů [37]. Rodina ATP-binding cassette transportérů představuje jednu z největších a nejčastěji exprimovaných skupin proteinů, které známe [38]. Nalezneme je ve všech organismech od bakterií po člověka [39]. Většina jejich členů je zodpovědná za aktivní transport mnoha látek, jako jsou fosfolipidy, ionty, peptidy, steroidy, polysacharidy, aminokyseliny, organické anionty, žlučové kyseliny, léky a další xenobiotika, skrze biologické membrány [38] v téměř všech tkáních a typech buněk [40]. Existuje nejméně 49 členů této rodiny, kteří se dále dělí do 7 podrodin označených ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF a ABCG [41], jak je znázorněno v tabulce č. 1. Typický ABC transportér je charakterizován přítomností tří konzervovaných peptidových motivů – Walker A, Walker B a tzv. ABC (či C) motivu (sekvence ALSGGQ) [40]. Většina ABC transportérů vyžaduje navázání ATP na jejich nukleotid-vazebné domény a následnou hydrolyzu navázaného ATP k přenosu substrátu přes membránu. Walker A a Walker B jsou umístěny v každé nukleotid-vazebné doméně a to ve vzdálenosti 100 – 200 aminokyselin od sebe. Lysinový zbytek Walkeru A se účastní vazby β -fosfátu ATP, zatímco zbytek kyseliny asparagové Walkeru B interaguje s Mg^{+2} . C motiv je pak umístěný mezi Walkerem A a Walkerem B. Funkce této části molekuly není doposud známa, ačkoliv se zjevně účastní rozpoznání, vazby a hydrolyzy ATP [42]. ABC transportní proteiny se typicky skládají ze dvou vazebných domén pro nukleotidy a dvou transmembránových domén. Transmembránové domény obsahují šest až dvanáct transmembránových α -helixů a dva hydrofilní helixy, které nesou jedno nebo dvě vazebná

místa pro ATP a určují substrátovou specifitu transportního proteinu [43]. Výjimkou je např. ABCG2, který obsahuje pouze jednu vazebnou doménu pro nukleotid a jednu transmembránovou doménu a je proto nazýván „poloviční“ transportér. ABCC1 a ABCC2 jsou také strukturně atypické díky jedné transmembránové doméně navíc na NH₂ konci [42].

2.4.1 ABCB rodina

ABCB rodina je zajímavá tím, že se sem řadí jak 4 „celé“ transportéry, které obsahují dvě vazebné domény pro nukleotidy a dvě transmembránové domény, tak 7 „polovičních“ transportérů, které obsahují od každé domény pouze jednu [44]. ABCB2 a ABCB3 jsou „poloviční“ transportéry, které formují heterodimery a transportují peptidy do endoplasmatického retikula [45]. ABCB4 a ABCB11 proteiny se oba nacházející v játrech a podílejí se na sekreci žlučových kyselin. Mutace lidského genu ABCB4 je hlavní příčinou vzniku progresivní intrahepatální cholestázy 3. typu. Mutace v lidském genu ABCB11 jsou spojeny s progresivní familiární intrahepatální cholestázou 2. typu. Zbývající čtyři „poloviční“ transportéry - ABCB6, ABCB7, ABCB8 a ABCB10, se nacházejí na mitochondriích, kde se účastní metabolismu železa a transportu Fe/S prekurzorů proteinů. Nejbližší homolog transportérů spojených se zpracováním antigenu (ABCB2 a ABCB3), „poloviční“ transportér ABCB9, je lokalizován na lysosomech [45].

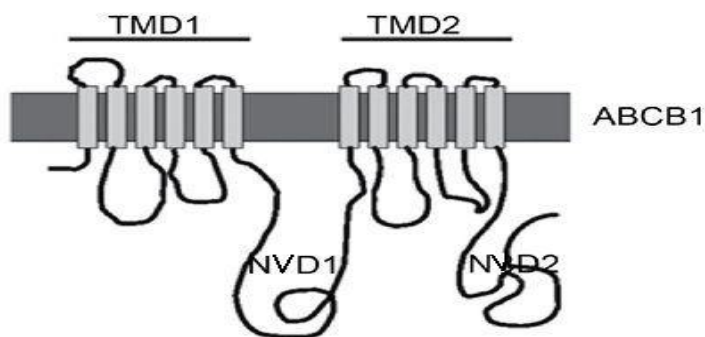
2.4.1.1 *ABCB1 protein*

Lidský ABCB1 je prvním popsáním ABC transportérem, roku 1976 ho identifikovali Juliano a Ling [46]. Jeho molekulová hmotnost je 141479 Da. Gen pro ABCB1 se nachází na chromosomu 7q21. Skládá se z 28 exonů, které kódují 1280 aminokyselin. Analýza primární sekvence proteinu ABCB1 ukázala opakující se motiv transmembránových domén, ABC domény a oblast spojující obě homologní poloviny bílkoviny. Dvě poloviny tvoří jediný transportér, v němž transmembránové šroubovice tvoří "pór", ve kterém dochází k přemístění substrátu a nukleotid-vazebná doména sbírá energii z navázaného a hydrolyzovaného ATP. Membránová topologie ABCB1 byla osvětlena pomocí experimentů vkládání epitopů a odpovídá původnímu modelu - šest šroubovic v obou transmembránových doménách. Linker propojující obě poloviny proteinu hraje zásadní roli při interakci dvou podjednotek. Kryoelektronová mikroskopie (při

rozlišení 8Å) naznačila, že transmembránové domény tvoří trychtýřovitou komoru, která se otevírá směrem do extracelulárního prostoru a jeví se být uzavřená na intracelulárním konci. Dvě nukleotid-vazebné domény jsou v intracelulárním prostoru umístěny blízko sebe, což umožňuje rozsáhlé interakce mezi dvěma katalytickými místy. Hydrolyza ATP a transport léků jsou podporovány různými částmi proteinu a jejich spolupráce zajišťuje hydrolyzu ATP, když je substrát přítomen. Substrát je přemísťován tak, jak je uvolňována energie z ATP a dvě ABC jednotky kooperují [47].

2.4.1.1.1 Struktura ABCB1

ABCB1 je typický ABC transportní protein složený ze dvou homologních polovin. Každá obsahuje 6 transmembránových domén a nukleotid-vazebnou doménu, mezi nimiž je spojovací oblast. Bylo zjištěno, že i po delecii centrální části spojovací oblasti je exprimováno stále stejné množství lidského ABCB1 jako u divokého typu, avšak protein ztrácí transportní schopnost. Naopak vložením nukleotidu požadované struktury se aktivita proteinu obnovuje. Tyto poznatky tedy vedou k závěru, že interakce dvou polovin proteinu je nezbytná pro funkci proteinu a že spojovací oblast mezi těmito polovinami zajišťuje správnou interakci obou polovin, zejména nukleotid-vazebných domén. Biochemická charakterizace lidského i křeččího ABCB1 ukázala, že nukleotid-vazebné domény nejsou schopné hydrolyzovat ATP zároveň, ale stechiometrie reakce je 1 mol ATP/1 mol ABCB1. Mutace v savčím ABCB1, které ovlivňují substrátovou specifitu, se objevují v celé molekule včetně transmembránových oblastí či nukleotid-vazebných domén. Tento protein je glykosylován na třech místech (N91, N94 a N99). Glykosylace se jeví potřebná k dopravě proteinu k povrchu buňky, avšak není potřebná pro transportní funkce ABCB1. ABCB1 může být též fosforylován A a C kinasami na čtyřech serinech na spojovacím regionu. I po odstranění těchto míst proteinu zůstává normální transportní funkce a stále vyvolává lékovou resistenci [48]. Obrázek předpokládané struktury ABCB1 je na následující straně – obrázek č. 2.



Obrázek č. 2: Předpokládaná struktura proteinu ABCB1, popis v textu, převzato z [47]

2.4.1.1.2 Substrátová specifita ABCB1

Léky rozličných chemických struktur s různými účinky, jako například vinka-alkaloidy, blokátory vápníkových kanálků, anthracykliny, antiarytmika, epipodophyllotoxiny, antihypertenziva, antibiotika, imunosupresiva, cytotoxické látky, steroidní hormony či inhibitory HIV proteasy interagují s ABCB1. Jedinými obecnými rysy substrátů ABCB1 se zdají být hydrofobicita, molekulová hmotnost 300-2000 Da a to, že jím nejsou transportovány anionické látky. Některé substráty mohou při fyziologickém pH mít pozitivní náboj, avšak díky amfifilnímu charakteru mohou do buněk vstupovat pasivní difúzí. Ačkoliv modulátory mohou zvrátit MDR, ABCB1 účinně transportuje většinu z nich. I přes vývoj několika generací ABCB1 modulátorů se prozatím odstranění MDR neseťkává s velkým úspěchem [48]. Přehled substrátů ABCB1 je v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Substráty ABCB1, převzato z [49]

Protinádorová léčiva	aktinomycin, etoposid, docetaxel, doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, etoposid, irinotecan, mitomycin C, mitoxantron, paclitaxel, tamoxifen, temioisid, teniposid, topotecan, vincristin, vinblastin, vindesin
Antiarytmika	digoxin, digitoxin, chinidin, amiodaron
Inhibitory HIV proteasy	amprenavir, indinavir, nelfinavir, sequinavir, ritonavir
Imunosupresiva	cyklosporin A, tacrolimus, rapamycin
Steroidy	aldosteron, dexamethason, estradiol, hydrokortison
Antiemetika	domperidon, ondansetron
Hypolipidemika	atorvastatin, lovastatin
Antibiotika	erytromycin, levofloxacin, sparfloxacin, β -blokátory, celiprolol, talinolol
Blokátory vápníkových kanálů	diltiazem, mibefradil, nifedipin, verapamil, N-dealkylverapamil
H1 antihistaminika	fexofenadin, terfenadin
H2 antihistaminika	cimetidin, ranitidin
Opiáty	morfin, lorepamid
Ostatní	debrisoquin, fenytoin, rifampin, amitriptylin, losartan, emetin, kolchicin

2.4.2 ABCC rodina

Přehled členů ABCC rodiny a jejich vlastností je uveden v tabulce č. 1 na stranách 25-26. Proteiny této rodiny obsahují 1325-1545 aminokyselin. Proteiny ABCC7-10 netransportují žádný substrát, ale díky společným předkům se řadí mezi ABCC transportéry [40]. ABCC7/CFTR je chloridový kanál a jako takový není považován za přenašeče. Jeho mutace jsou příčinou cystické fibrosy. ABCC8/SUR1 a ABCC9/SUR2, sulfonylmočovinné receptory, jsou ATP-citlivé podjednotky draselného kanálu a není známo, že by transportovaly nějaký substrát. Jejich mutace způsobují genetickou poruchu, tzv. hyperinzulinovou hypoglykémii u novorozenců. ABCC10 je pouze pseudogen kódující zkrácený protein vysoce exprimovaný v játrech plodu člověka. Je velmi podobný ABCC2, avšak chybí u něj transportní aktivita [40].

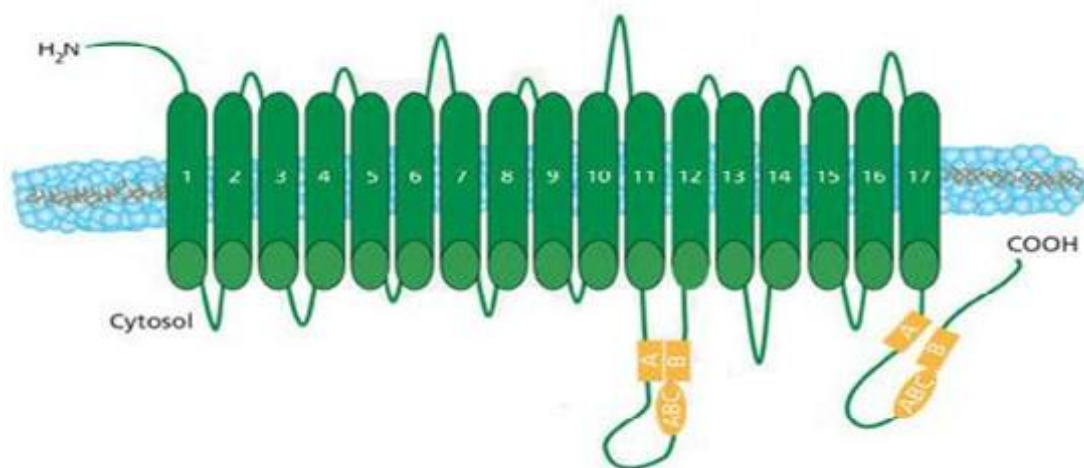
2.4.2.1 *ABCC1 protein*

ABCC1 byl objeven v roce 1992, kdy Cole a kol. objevili na buněčné linii lidského karcinomu žaludku H69 resistantní na adriamycin gen kódující ABC transportní bílkovinu [50]. Po detailnějším prozkoumání transfekovaných buněčných linií bylo zjištěno, že snížení exprese ABCC1 je doprovázeno obnovením chemosensitivity. ABCC1 je exprimován, stejně jako ABCB1, na cytoplasmatické membráně a na membránách endoplasmatického retikula [51]. Navzdory podobnosti s ABCC2 je ABCC1 lokalizován na apikální straně membrány polarizovaných buněk [52].

2.4.2.1.1 Struktura ABCC1

Lidský ABCC1 protein se skládá z 1531 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 171561 Da [53]. Gen pro ABCC1 je lokalizován na 16. chromosomu v oblasti p13.1 [50]. Bylo prokázáno, že gen pro ABCC1 je spíše vzdálený příbuzný genu pro ABCB1 a je více podobný ABCC7/CFTR genu. Největší sekvenční homologie mezi proteiny ABCC1 a ABCB1 byla nalezena v oblasti ATP-vazebných domén, které jsou také v rámci celé nadrodiny nejvíce evolučně konzervovány. Terciární struktura těchto dvou proteinů je ale rozdílná. Na N-konci molekuly je membránová doména složená z pěti transmembránových úseků (α -helixů), dále následují dvě homologní části, každá složená z šesti transmembránových úseků (α -helixů) a ABC domény [54, 55]. Předpokládaná struktura proteinu ABCC1 je znázorněná na obrázku č. 3 na následující stránce. Předpokládá se, že obě homologní části tohoto proteinu se

v průběhu evoluce vyvinuly ze společného genového předka kódujícího ABC transportní proteiny. V případě ABCC podskupiny fúzoval tento gen s jiným genem/geny kódujícím jiný membránový protein, čímž se k oběma homologním polovinám připojilo pět transmembránových domén na N-konci molekuly. N-konec ABCC1 proteinu je umístěn extracelulárně, což je velmi atypická topologie pro nadrodinu ABC transportních proteinů. Současná data naznačují, že právě extracelulárně umístěný N-konec může být charakteristickým znakem ABCC podskupiny [56]. ABCC1 je na obou polovinách molekuly glykosylován. Čerstvě nasyntetizovanému 170 kD velkému ABCC1 polypeptidu trvá zhruba 90 minut než se glykosyluje na svoji 190 kD formu. Glykosylovaný protein má poločas rozpadu 20 hodin, což je pro membránové proteiny typická hodnota [57]. Byla rovněž prokázána *in vivo* fosforylace ABCC1 několika různými kinasami, hlavně na serinových zbytcích [58].

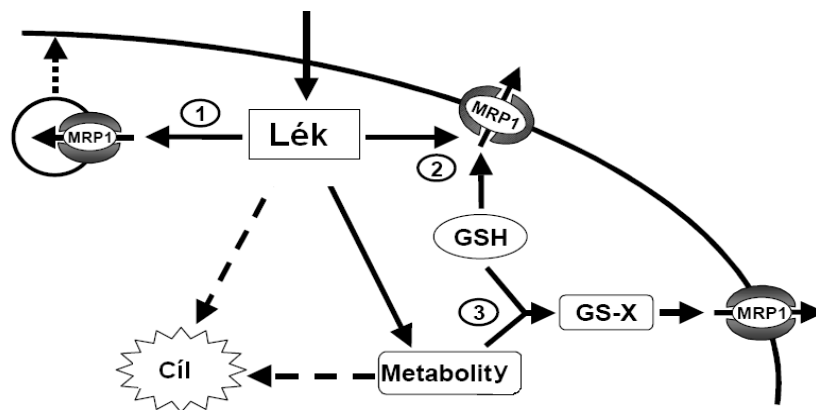


Obrázek č. 3: Předpokládaná struktura proteinu ABCC1, popis v textu, staženo z [59]

2.4.2.1.2 Substrátová specifita ABCC1

ABCC1 transportuje široké spektrum hydrofobních, záporně nabitých substrátů, ačkoliv jeho afinita k cysteinyl-leukotrienu (LTC_4) je ze všech zkoušených substrátů nejvyšší [60]. LTC_4 se syntetizuje z leukotrienu A_4 poté, co leukotrien A_4 konjuguje s GSH. LTC_4 se podílí na kontrole kontrakce hladkých svalů a na vaskulární permeabilitě. Fyziologická funkce ABCC1 jako přenašeče LTC_4 v leukocytech syntetizujících LTC_4 napovídá, že inhibitory ABCC1 by se mohly podílet na regulaci zánětlivých procesů [61]. Bylo prokázáno, že kromě LTC_4 konjugovaného s GSH může ABCC1 transportovat široké spektrum látek patřících do skupiny konjugátů GSH od samotné oxidované formy GSH

přes kyselinu ethakrynovou, záporně nabitě sulfáty, glukuronidy a některé žlučové soli, až po aktivovaný aflatoxin B1 [62]. ABCC1 také transportuje glukuronid- a sulfát-konjugované estrogény 17 β -estradiol-D-17 β -glukuronid a estron-3-sulfát. Další fyziologické substráty jsou sulfátované žlučové kyseliny, bilirubin, prostaglandin A či GSH v redukovaném i oxidovaném stavu. ABCC1 také transportuje malé hydrofobní peptidy [63]. ABCC1 také zbavuje buňku xenobiotik jednak mechanismem exportu z buňky bez toho, aby transportované látky byly konjugáty s GSH, dále exportuje glutathionové konjugáty. Bylo prokázáno, že ABCC1 také transportuje látky intracelulárně, odděluje je od zbytku buňky uložením v měchýřcích nacházejících se v intracelulárních membránách, vzniklých pravděpodobně z Golgiho aparátu [64, 65]. Mechanismus transportu je znázorněn na obrázku č. 4. K jeho substrátům řadíme i řadu léčiv včetně cytostatik. K transportu nekonjugovaných léků jako např. vincristinu či daunorubicinu vyžaduje ABCC1 přítomnost GSH, lék je pak přenášen mechanismem kotransportu [66, 67]. Z léků ABCC1 dále transportuje doxorubicin, etoposid, methotrexát, camptothecin, CPT-11, SN-38, cyklofosfamid [40].



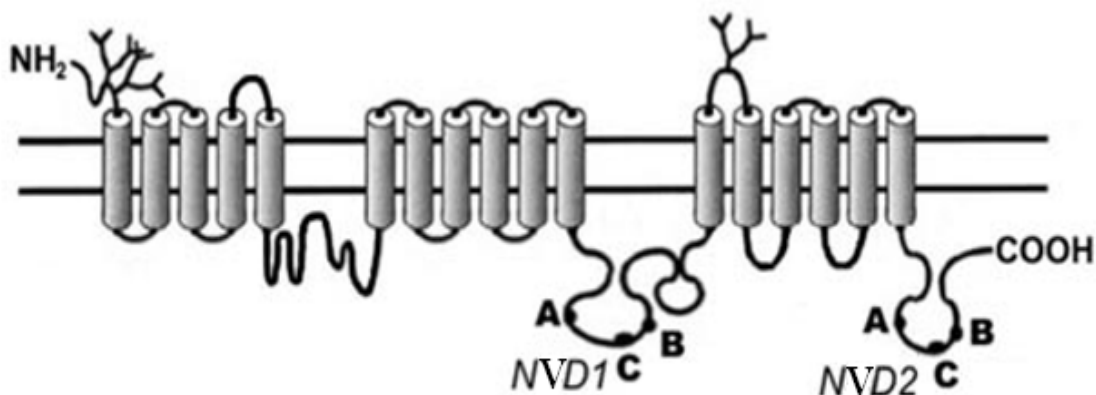
Obrázek č. 4: Model MDR způsobené ABCC1: ABCC1 zabraňuje léku dosažení cíle v buňce, a to 1) izolací do intracelulárních měchýřků 2) exportem z buňky s nebo bez kotransportu s GSH 3) metabolity léků mohou být detoxikovány konjugací s GSH a následným transportem z buňky pomocí ABCC1, upraveno podle [68]

2.4.2.2 *ABCC2* protein

První informace o tomto proteinu byly získány na konci 80. let, kdy experimenty za použití organických aniontů typu konjugovaného bilirubinu a LTC₄ prokázaly existenci jednosměrného přenašeče lokalizovaného na apikálních (kanalikulárních) membránách buněk tkání s exkreční funkcí. Původní název cMOAT (kanalikulární multispecifický transportér organických aniontů) byl změněn po identifikaci *ABCC2* kódujícího genu [69]. Gen kódující *ABCC2* se nachází na 10. chromosomu v pozici 10q24 [70].

2.4.2.2.1 Struktura *ABCC2*

Lidský *ABCC2* je fosfoglykoprotein o molekulové hmotnosti 174191 Da složený z 1545 aminokyselin [36]. Ty jsou uspořádány do pěti strukturně příbuzných částí, z nichž tři tvoří transmembránové domény skládající se ze šesti (resp. pěti) α -helixů, a dvě tvoří intracelulární vazebné domény pro nukleotidy - ABC-domény. Třetí transmembránová doména, charakteristická pro některé přenašeče skupiny ABCC včetně *ABCC2*, je tvořena pouze pěti α -helixy a NH₂-konec je proto uložen extracelulárně. Struktura *ABCC2* je znázorněna na obrázku č. 5 [71].



Obrázek č. 5: Předpokládaná struktura a umístění *ABCC2* transportéru v buněčné membráně. Intracelulárně lokalizované domény pro vazbu nukleotidů jsou označeny NVD1, resp. NVD2. Walker A a B motivy jsou označeny A, resp. B a vysoce konzervovaná aminokyselinová sekvence charakterizující ABC nadrodinu transportérů je označena C. Ukázána jsou i místa obou extracelulárně orientovaných N-glykosylací jako rozvětvené úseky. Převzato z [71]

Obě vazebné domény pro nukleotidy vykazují u jednotlivých proteinů vysokou identitu, obzvláště v jádrovém úseku asi 200 aminokyselin.

Sekvenční analýza ABCC2 proteinu ukázala jistou míru shody uvnitř ABCC podrodiny transportérů, a to nejvyšší ve srovnání s ABCC1 (48%) a ABCC3 (47%). Naopak strukturální podobnost s ABCB1 byla zjištěna poměrně malá (18%) [72].

2.4.2.2.2 Substrátová specifita ABCC2

ABCC2 má velmi podobné spektrum substrátů jako dříve objevený a popsáný ABCC1. Mezi substráty s vysokou afinitou patří amfifilní anionty, především konjugáty s GSH a kyselinou glukuronovou, např. LTC₄, bilirubin-glukuronid nebo estrogeny (17β-estradiol-D-17β-glukuronid). ABCC2 dále transportuje nekonjugované sloučeniny, např. fluorescenční barvivo Fluo-3, modelovou látku pro studium jaterního transportu sulfobromoftalein, anionické protinádorové léčivo methotrexát, inhibitor HMG-CoA reduktasy pravastatin, ACE inhibitor temokaprilát a další. Z antimikrobních látek jsou popsány substráty ABCC2 např. inhibitory HIV proteas nebo fluorochinolony [73]. Kromě xenobiotik se ABCC2 podílí i na transportu farmakologicky aktivních složek potravy jako např. flavonoidů (resp. jejich metabolitů) quercetin-4'-β-glukosidu a epikatechin-sulfátu [72, 74].

Základní fyziologickou funkcí ABCC2 je transmembránový transport konjugovaných metabolitů endogenních látek a xenobiotik do žluči, moči a střevního lumina. V játrech ABCC2 zajišťuje jeden z mechanismů tvorby žluče, který je nezávislý na sekreci osmoticky aktivních solí žlučových kyselin. Význam této funkce byl dokumentován výraznou redukcí tvorby žluče u ABCC2 deficientních potkanů [72]. Tkáňová distribuce ABCC2 koresponduje s distribucí konjugačních enzymů fáze II, UDP-glukuronyltransferasou a glutathion-*S*-transferasou, což potvrzuje navržený model efektivní synergie metabolismu a následně transportu organických aniontů [75]. Na úrovni střevní sliznice může tento transportér svým aktivním efluxem (transport z buňky ven) xenobiotik hrát obdobnou protektivní roli, jaká již byla navržena pro ABCB1. V závislosti na finální aktivitě ABCC2 je potom důsledkem změny biologická dostupnost jeho substrátů [71, 72]. Zvýšená exprese ABCC2 v mozkových kapilárách vzbudila zájem jako potenciální příčina farmakoresistentní epilepsie. Při *in vivo* studiích byl u ABCC2 deficientních potkaních kmenů pozorován usnadněný průchod fenytoinu, valproátu či

karbamazepinu přes hematoencefalickou bariéru. Podobné výsledky potvrdily i studie, které použily probenecid jako inhibitor ABCC2 u zdravých potkanů [76]. Obecně lze tedy konstatovat, že ABCC2 může, stejně jako podobně lokalizovaný ABCB1, limitovat mozkovou a fetální penetraci celé řady látek přítomných v (maternální) plazmě. Díky značné podobnosti v tkáňové distribuci obou přenašečů je pravděpodobná i jistá příbuznost ve farmakologické a toxikologické projekční funkci, která se nicméně týká jiných (i když částečně se překrývajících) spekter substrátů. Podíl ABCC2 na mnohočetné lékové resistenci naznačila zvýšená exprese tohoto transportéru v mnoha vzorcích různých karcinomů [77, 78]. Přímé důkazy přinesly transportní studie na buněčných liniích transfekovaných ABCC2 cDNA, které ukázaly značnou resistenci těchto buněk mimo jiné k cisplatině, etoposidu, vincristinu, mitoxantronu, doxorubicinu, epirubicinu a methotrexátu [72, 79].

2.5 Genetická variabilita studovaných ABC transportérů

Více jak 99,9% genomové DNA je v lidské populaci shodné. I tak malá variabilita DNA hraje významnou roli v celkové charakteristice lidského organismu, jak odpovídá na nemoci, léčbu nebo vliv prostředí [80]. Mutace jsou náhodné změny v genetickém materiálu. Z hlediska lokalizace těchto změn v genotypu rozdělujeme mutace na genové (změny v molekule DNA), chromosomální (chromosomální aberace – změny struktury a tvaru chromosomu), genomové (změny v chromosomálním počtu) a mutace nechromosomální (mimojaderné) [81]. Pokud k mutacím dojde v zárodečných buňkách, podílejí se na vzniku genetické variability organismů. V případě, že mutace vzniknou postnatálně v somatické buňce, uplatní se pouze u jedince, který mutaci získal. Přes 80% z variability v populaci tvoří jednonukleotidové polymorfismy (SNP, z angl. single-nucleotide polymorphism). Polymorfismus znamená současnou existenci dvou i více alternativních genotypů v populaci. Locus je polymorfní, jestliže se vzácnější alela v populaci vyskytuje s alespoň 1%-ní frekvencí [82]. SNP je sekvenční variace vyskytující se při záměně některého z nukleotidů (A,T,C nebo G) v primární sekvenci DNA za nukleotid jiný. Jako nejčastější záměna byla popsána výměna cytosinu (C) za thymin (T), což lze vysvětlit velmi vysokou incidencí deaminace 5-methylcytosinu na thymin v dinukleotidech CpG (cytosin sousedí s guaninem). SNP se může vyskytnout jak na kódující (gen) tak nekódující oblasti genomu. Genetický fond každého člověka obsahuje

jedinečné SNP vzory tvořené různými genetickými variacemi. Bylo zjištěno, že většina SNP není odpovědná za vlastní onemocnění. Namísto toho slouží jako biologické markery pro specifikaci místa na lidské genomové mapě asociovaného s nemocí, neboť jsou zpravidla umístěny blízko genu identifikovaného jako původce onemocnění. Tento postup, často používaný v nepřímé diagnostice dědičných chorob, je založen na analýze vazebné nerovnováhy genů. Příležitostně může být přítomnost SNP vlastním původcem onemocnění, což nám umožní vyhledat a izolovat odpovědný gen. V případě onemocnění, u kterého byl identifikován defektní gen, lze prověřit DNA izolovanou ze souboru zdravých a postižených pacientů na přítomnost různých SNP vzorů a pomocí asociační studie identifikovat SNP vzor charakteristický pro přítomnost nemoci. Většina SNP nemá vliv na funkci buňky, ale některé mohou způsobit predispozici člověka k nemoci nebo ovlivnit jeho odpověď na podaný lék [80].

Tabulka č. 3: Metody stanovování SNP, jejich výhody a omezení, převzato z [80]

Metoda	Výhody	Současné omezení
Čipová matrice	Prověření velké škály polymorfismů	Specifita určena hybridizací není možno rozlišit všechny polymorfismy Každý nový SNP vyžaduje přípravu nové matrice Vyžaduje současně PCR amplifikaci
Real-time PCR	Uzavřená reakce Eliminace kontaminace Nevyžaduje elektroforetickou separaci Amplifikace cílového místa Jednokroková amplifikace a detekce	Omezené použití multiplexních reakcí Specifika určena hybridizací – není možno rozlišit všechny polymorfismy
Invader assay	Izotermální reakce nevyžadující PCR Uzavřená reakce – eliminace kontaminace Jednokroková amplifikace a detekce	Omezené použití multiplexních reakcí Neschopná detekovat malé delece a inzerce Vyžaduje velmi čisté sondy pro zamezení kontaminace
Extenze primeru	Aplikovatelné pro MALDI-TOF Nevyžaduje použití značení	Není možno detekovat jednonukleotidové repetice, inzerce a delece
Oligonukleotid. ligasová reakce	Vysoká úroveň citlivosti a specifity Detekce všech variant bodových mutací a malých delecí a inzerce	Nutnost provést PCR před nebo po ligačním kroku Omezené použití multiplexních reakcí
Sekvenace	Analýza všech změn primární struktury DNA do velikosti 1000bp / reakce Velmi přesná	Omezená detekce mutací s malou četností v populaci Citlivá na kontaminující DNA
SSCP	Detekce mutací s nízkou četností Rychlá	Nepostihne 30% možných mutací Nespecifikuje umístění polymorfismu Nemusí detekovat mutaci blízko častého polymorfismu
DGGE, DHPLC	Detekce mutací s nízkou četností Rychlá	Testování velké škály změn nepostihne 13% polymorfismů Nutno použít oligonukleotid s GC svorkou Technicky náročné reprodukovat výsledky Nespecifikuje umístění polymorfismu
Sekvenčně specifická PCR	Metodicky a finančně nenáročné	Omezené použití multiplexních reakcí

Genetická variabilita by měla být zohledněna rovněž v souvislosti s chemoterapeutickou léčbou. Chemoterapie je jedna z možností obrany před většinou nádorů, ovšem jen část pacientů na tuto léčbu vykazuje optimální odpověď. Léčba musí být správně aplikována – to znamená, že musí být použita optimální dávka a čím dál více je jasné, že bude třeba brát v úvahu i genetickou variabilitu konkrétních pacientů (individualizovaná léčba). Porušení těchto postupů může vést ke vzniku resistance během léčby [83]. Analýza lidského genomu ukázala na obsah přibližně tisíce genů kódujících transportní proteiny (včetně iontových kanálů a iontoměníčů), což činí přibližně 4% všech genů. Expresí těchto proteinů vzniká široká individuální variabilita [84]. Teprve v poslední době byly popsány dědičné variace (polymorfismy, mutace) v jednotlivých transportérech jako důležitý faktor odlišného účinku léků.

Existuje mnoho možností, jak zkoumat SNP, v tabulce č. 3 na předchozí straně uvádím přehled nejpoužívanějších metod včetně výčtu jejich výhod a omezení. Vlivem jednotlivých genetických variant na účinek podané látky se zabývá farmakogenetika [85].

2.5.1 Variabilita ABCB1

V genu ABCB1 je popisován vysoký výskyt SNP. K dubnu 2009 bylo identifikováno v genu ABCB1 1279 SNP, z nichž 62 se nacházelo v kódující oblasti genu (22 bylo synonymních (beze změny AMK) a 40 nesynonymních (způsobujících záměnu AMK) [86]. První zpráva o funkčním SNP genu ABCB1 je z roku 1989. Z lidských nadledvin, kde je ABCB1 hojně zastoupen, byla izolována v celé délce genu cDNA a odvozeno pořadí aminokyselin. Ve srovnání s ABCB1 získaným z buněk resistantních na kolchicin byla v aminokyselinové sekvenci nalezena substituce Gly→Val v kodonu 185. Buňky, do kterých byla vnesena cDNA nesoucí informaci pro Val 185, získaly větší resistenci ke kolchicinu [87].

Většina studií podpořila teorii, že polymorfismy genu ABCB1 mohou ovlivnit odpověď na chemoterapii. Například ABCB1 haplotypy 1236C>T, 2677G>T a 3435C>T snižují odvod irinotecanu a jeho metabolitů ledvinami. 1236C>T je spojený se zvýšeným vystavením SN-38 a jeho proléčiva irinotecanu. U pacientů s dětskou akutní lymfoblastickou leukémií s genotypem 3435CT či TT docházelo méně často k návratu nemoci ve srovnání s pacienty s CC genotypem, což bylo pravděpodobně způsobeno nižší expresí ABCB1 u jedinců s alelou T. SNP 1236C>T, 2677G>T a 3435C>T také ovlivňují výsledek terapie při akutní myeloidní leukémii. Během léčby solidních nádorů, jako jsou

například nádory prsu, ovlivňoval SNP 3435C>T odpověď na neoadjuvantní chemoterapii a jeho přítomnost může předpovídat resistenci k chemoterapii. SNP 2677G>T/A významně ovlivňuje výsledek léčby nádorů vaječníků. Vyšší pravděpodobnost odpovědi na léčbu paclitaxelem byla u homozygotů a heterozygotů (T/T či T/A). Přehled všech dosud objevených SNP je zanesen v několika databázích (např. Pharmacogenetics Research network website: <http://www.pharmGKB.org>; National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) [83]. SNP ABCB1, které mohou být potenciálně významné v chemoterapii, jsou přehledně zpracovány v tabulce č. 4 na následující straně.

Mezi SNP významné u karcinomu prsu patří 3435T>C (Ile1145Ile), u něhož můžeme pozorovat zvýšení odpovědi na anthracyklinovou a taxanovou terapii u neoadjuvantně léčených pacientů [88]. Pacienti s alelou T (genotyp TT či TC) také vykazovali nižší kontrolu růstu nádoru a nižší přežívání než pacienti s genotypem CC [89]. U slovenských pacientů podstupujících anthracyklinovou terapii byla u fenotypu CC pozorována delší doba, než došlo k progresi [90].

Tabulka č. 4: Souhrn SNP ABCB1 ovlivňujících účinnost protinádorových léčiv

SNP (oblast, AMK)	Léky	Fenotyp	Model	Reference
+103T>C (5'konec, nekódující)	Doxorubicin, Vincristin	Snížená transkripce	Osteosarkom	Stein a kol., 1994 [91]
+8T>C (5'konec, nekódující)		Neznámý	Leukémie	Rund a kol., 1999 [92]
1236C>T (exon12, synonymní)		Vyšší exprese	AML	Illmer a kol., 2002 [93]
2677G>T/A (exon21, A893S/T)		Nižší exprese	Placenta	Tanabe a kol., 2001 [94]
		Nižší exprese	Placenta	Hitzl a kol., 2004 [95]
		Vyšší exprese	AML	Illmer a kol., 2002 [93]
		Alelově spec. exprese	Buněčné linie, lymfom	Mickley a kol., 1998 [96]
		Přežití	Leukémie	Illmer a kol., 2002 [93]
		Přežití	Leukémie	van den Heuvel-Eibrink a kol., [97]
		Horší přežití	AML	Kim a kol., 2006 [93, 98]
	Paclitaxel	Větší účinnost	Rakovina vaječníků	Green a kol., 2006 [99]
2995G>A (exon24, A999T)		Žádné	Buněčné linie, lymfom	Mickley a kol., 1998 [96]
3435C>T (exon26, synonymní)		Nižší exprese	Placenta	Hitzl a kol., 2004 [95]
		Vyšší exprese	mRNA střeva	Nakamura a kol. 2002 [100]
		Vyšší exprese	AML	Illmer a kol., 2002 [93]
	Irinotecan	Nižší „clearance“	Pacienti s rakovinou	Sai a kol., 2003 [101]
	Digoxin	Nižší odtok	CD56+ NK buňky	Hitzl a kol., 2001 [102]
	Digoxin	Vyšší hladiny plasmy	Zdraví dobrovolníci	Hoffmeyer a kol., 2000 [103]
		Lepší přežívání	Leukémie	Illmer a kol., 2002 [93]
		Nižší návrat leukémie CNS	Pacienti s rakovinou	Stanulla a kol., 2005 [104]
	Cyclosporin	Vyšší AUC	Pacienti s transplantací jater	Bonhomme-Faivre a kol., 2004 [105]
	Neoadjuv. chemoterapie	Lepší účinnost chemoterapie	Rakovina prsu	Kafka a kol., 2003 [88]
		Horší přežívání	AML	Kim a kol., 2006 [93]
	Platinová chemoterapie	Lepší přežívání	Rakovina jícnu	Wu a kol., 2006 [106]
	Docetaxel	Bez rozdílů	Pacienti	Puisset a kol., 2004 [107]
	Irinotecan	Bez rozdílů	Pacienti s rakovinou	Mathijssen a kol., 2004 [108]
	Vincristin	Bez rozdílů	Leukémie	Plasschaert a kol., 2004 [109]
		Bez rozdílů	Vzorky tlustého střeva	Taniguchi a kol., 2003 [110]

2.5.2 Variabilita ABCC1

V genu ABCC1 bylo identifikováno mnoho dědičných mutací, zejména SNP, lokalizovaných v nekódujících i kódujících oblastech genu [111]. Většina studií genetické variability ABCC1 byla provedena *in vitro* na buněčných liniích, přičemž byly odhaleny některé polymorfismy, které ovlivňují funkci ABCC1.

SNP 2012G>T v exonu 16 vedoucí k substituci vysoce konzervovaného glycinového zbytku na pozici 671 za Val nevykazoval žádné funkční rozdíly oproti divokému ABCC1 genu [112]. Mutace v exonu 2 – 128G>C, která má za následek C43S substituci, narušuje umístění ABCC1 v plasmatické membráně a snižuje buněčnou resistenci k vincristinu a arsenitu [113]. Letourneau a kol. zkoumal 10 ABCC1 SNP a jejich vliv na expresi a funkci v transfekovaných HEK293T buňkách, přičemž pouze 296G>A (A989T) působil výrazný pokles v transportu 17 β -glukuronidu [114]. Wang a kol. zkoumali SNP genu ABCC1 u 480 vzorků od různých etnik. Genetický profil SNP odhalil velkou rozmanitost haplotypu a nízké LD skóre. SNP na 5'-konci. SNP 260G>C se chová podle tohoto zjištění, vykazuje tedy rozdílnou aktivitu v *in vitro* promotor-reporterové esěji [115]. SNP ABCC1 podezřelé z vlivu na chemoterapii jsou přehledně zpracovány v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Souhrn SNP ABCC1 ovlivňujících účinnost protinádorových léčiv

SNP (lokalizace, oblast a AMK záměna)	Léky	Fenotyp	Model	Reference
-260G>C (5'-konec, nekódující)		Vyšší aktivita	Transfekované buněčné linie	Wang a kol., 2005 [115]
128G>C (exon2, C43S)	Vincristin, arsenit	Snížená resistence	Transfekované buněčné linie	Leslie a kol., 2003 [113]
1299G>T (exon10, R433S)	LTC ₄ , doxorubicin	Snížený transport LTC ₄ , snížená resistence doxorubicinu	Transfekované buněčné linie	Conrad a kol., 2002 [116]
2012G>T (exon16, G671V)	LTC ₄	Žádné změny v aktivitě	Transfekované buněčné linie	Conrad a kol., 2001 [112]
	Dooxorubicin	Srdeční toxicita	ne-Hodgkinský Lymfom	Wojnowski a kol., 2005 [117]
2965G>A (exon22, A989T)	Estradiol 17 β -glukuronid	Snížený transport	Transfekované buněčné linie	Letourneau a kol., 2005 [114]

Nyní se tedy zkoumá souvislost těchto SNP s odpovědí na onemocnění či podávání léků. Wojnowski a kol. zkoumali, jak je farmakogenomicky předurčena anthracykliny

indukovaná kardiotoxicita. Studie velkého množství SNP na 82 genech proběhla u pacientů s lymfomem ne-Hodgkinského typu. Byly pozorovány významné souvislosti mezi ABCC1 SNP 2012G>T a haplotypem ABCC2 s akutní toxicitou vyvolanou doxorubicinem [117].

Wang a kol. [118] pomocí sekvenace zkoumali ABCC1 gen ve 4 populacích (čínské, malajské, indické a bělošské) a identifikovali 60 SNP. 18 z nich bylo v exonech. Wang a kol. zkoumali, zda některé ze SNP mohou mít potenciální poškozující efekt na strukturu proteinu. Jako SNP s tímto potenciálním efektem byly pomocí počítačového modelování stanoveny SNP 1299G>T (exon10, R433S) a 2012G>T (exon16, G671V). SNP 1299G>T je lokalizován blízko transmembránové domény a SNP 2012G>T v konzervovaném glycinovém zbytku blízko konzervovaného Walker A motivu nukleotid-vazebné domény. Tyto poznatky naznačují, že by tyto SNP mohly mít funkční význam. Ve studii bylo zjištěno, že tímto SNP je zaměněn argininový zbytek na pozici 433 za serin, což má za následek snížení transportu LTC₄ a zvýšení resistance k doxorubicinu [116]. SNP 1299G>T byl nalezen ve 2% bělošské populace a 2012G>T ve 3%. To, že by SNP 2012G>T mohl mít vliv na funkci proteinu naznačuje i dřívější studie – Conrad a kol. [112] popsali snížení exprese genu vlivem tohoto SNP. Wang a kol. [118] také identifikovali SNP, který se vyskytoval ve velké míře v bělošské populaci - 1062T>C (exon 9, N354N, 31,9%).

2.5.3 Variabilita ABCC2

Mutace ABCC2 genu byly identifikovány u Dubin-Johnsonova syndromu (DJS), vzácné autosomální recesivní poruchy charakterizované hyperbilirubinemií, což potvrzuje význam ABCC2 v exkreci žluče [119, 120]. Řada mutací, od bodových mutací k delecím, vede k rychlé degradaci mRNA, což narušuje tvorbu proteinu [121]. Homozygotní mutace v genu pro ABCC2 obvykle způsobují absenci imunochemicky detekovatelného ABCC2 u pacientů s DJS. 0,5% až 1% populace je nositeli heterozygotních mutací v ABCC2, rozdíly jsou mezi etniky [122]. Vzhledem k důležité roli ABCC2 z farmaceutického hlediska byla vyřčena hypotéza, podle které může genetická variabilita tohoto genu pozměnit farmakokinetiku a odpověď na léky proti rakovině. Vliv ABCC2 na účinnost chemoterapeutik jako irinotecan a jeho metabolity byla prokázána na zvířatech, kdy došlo ke ztrátě funkce po vložení mutace ABCC2 genu [123]. Vliv těchto mutací na účinnost chemoterapeutik zatím ovšem nebyl u člověka dosud studován. Mnoho přirozeně se vyskytujících mutací a SNP v ABCC2 bylo popsáno i u jedinců bez DJS. Z nich jsou

nejčastěji pozorovány 24C>T (promotor), 1249G>A (exon 10) a 3972C>T (exon 28). 1249G>A je spojeno se záměnou aminokyseliny Val na Ile v pozici 417, přičemž 3972C>T je „tichý“ SNP na pozici 1324. Tyto SNP jsou také často pozorovány v buněčných liniích rakovinných buněk [124]. Hulot a kol. zkoumali pacienty s lymfomem B-buněk, kteří podstoupili infuzi vysokých dávek methotrexátu, ale měli 3x nižší rychlost vyloučení methotrexátu a nefrotoxicity. Tito pacienti byly heterozygoti s ohledem na SNP 1271A>G (R412G). Zkoumání tohoto SNP ukázalo podobnou hladinu exprese jako divoký gen, zatímco mutantní ABCC2 gen nenapomáhal vylučování methotrexátu a jiných ABCC2 substrátů [125]. Innocenti a kol. identifikovali 3972C>T jako SNP, který by mohl být zodpovědný za ABCC2 aktivitu při vylučování irinotecanu, kdy AUC (Area under the curve) irinotecanu a metabolitů bylo vyšší u pacientů s homozygotním variantním genotypem [126]. Většina genetických variant ABCC2, které nejsou spojeny s DJS, tedy zatím nejsou tolik významné pro léčbu rakoviny [127]. Přesto však expresní hladiny ABCC2 u zdravých jedinců vykazují až 15-násobné rozdíly v játrech a ve střevech [128]. SNP ABCC2 související s léčbou nádorových onemocnění jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Souhrn SNP u ABCC2 ovlivňujících účinnost protinádorových léčiv

SNP (lokalizace, oblast a AMK záměna)	Léky	Fenotyp	Vzorek	Literatura
1271A>G (exon10, R421G)	Methotrexát	Snížená eliminace léků, zvýšená nefrotoxicita	Pacient s lymfomem	Hulot a kol., [125]
3972C>T (exon28, nesynonymní)	Irinotecan	Snížená eliminace léků	Pacienti s rakovinou	Innocenti a kol., [126]

2.6 Exprese studovaných ABC transportérů v normálních i nádorových tkáních

Exprese ABC transportérů je významná jak u zdravých tkání, tak u tkání s patologickými změnami, jako například tkání nádorových. Zvýšená či snížená exprese může mít vliv na léčbu nádoru či na vznik MDR.

2.6.1 Exprese ABCB1

Vysoké hladiny proteinu ABCB1 jsou exprimovány například na apikální straně membrány epitelových buněk ledvin, střeva a plic. Protein ABCB1 je také exprimován v mozковém mikrovaskulárním endothelu, placentě, adrenální kůře mozkové, varlatech, děloze, lymfocytech či v hematopoetických buňkách. Exprese ABCB1 v těchto tkáních a jeho vysoce konzervovaná struktura naznačuje jeho důležitou roli v ochraně savčích buněk před mnoha toxickými látkami a v transportu exogenních látek [129].

Rozsáhlé studie genové i proteinové exprese ABCB1 byly provedeny u rakoviny prsu, a to za použití různých metod, ne vždy zcela optimalizovaných, výsledky těchto studií tedy mohou kolidovat. Spojitost mezi expresí ABCB1 a klinickými výsledky chemoterapie (MDR fenotyp) byla objasněna velkým počtem studií využívajících RNA hybridizační metody či metody imunohistochemické. Uvádí se, že u více než 40% nádorů byla zjištěna vysoká exprese ABCB1, ale vzhledem k širokému spektru metod jsou pozorovány značné rozdíly. I přes to byla jasně prokázána spojitost se zvýšeným rizikem selhání chemoterapie. Selhání léčby bylo více než trojnásobně vyšší u pacientů s vysokými expresemi genu či proteinu ve srovnání s pacienty s nádory ABCB1 neexprimujícími. Vysoká exprese ABCB1 byla též naměřena ve vzorcích od pacientů po chemoterapii, u kterých docházelo k selhání léčby. Novější studie využívající real-time PCR u pacientů, kteří podstoupili primární chemoterapii, ukazují velké rozdíly v genových expresích: vysoká exprese ABCB1 snižuje účinnost v první linii chemoterapeutické léčby a zároveň předpovídá špatnou prognózu u pacientů trpících pokročilou chorobou [129]. V další studii však u nádorů prsu léčených neoadjuvantně nebyly nalezeny významně vyšší hladiny exprese genu pro ABCB1 u pacientů se sníženou odpovědí na chemoterapii. Exprese ABCB1 tedy nejspíše hraje větší roli v resistenci u nádorů léčených sekundární chemoterapií, pokud je čas léčby dostatečně dlouhý, aby mohlo dojít k indukci exprese

[130]. U pacientů s ranými nádory prsu, kteří podstoupili adjuvantní terapii CMF, může exprese proteinu ABCB1 predikovat menší pravděpodobnost návratu nemoci [130].

ABCB1 je také exprimován v jiných rakovinných buňkách, kde též způsobuje lékovou resistenci [131]. Některé tumory, které vzniknou z tkání s přirozeně vyšší expresí ABCB1, mohou být „vnitřně“ drogově resistantní (například nádory ledvin, tlustého střeva, pankreatu a jater). Tumory s nízkými hladinami exprese ABCB1 (například nádory krve) někdy po chemoterapii vykazují zřetelné zvýšení exprese ABCB1 – dochází k získání resistance. Zatím není plně pochopena zvýšená exprese ABCB1 jako odpověď na chemoterapii. Exprese ABCB1 je tedy nejspíše indukována chemoterapeutiky, mechanismus ovšem zůstává neznámý. Po vystavení exogenním a endogenním vlivům (metabolické modifikace, hypoxie, chemoterapie) se mohou rakovinné buňky adaptovat. Zvýšení exprese ABCB1 je součástí adaptace [129].

2.6.2 Exprese ABCC1

Protein ABCC1 je exprimován ve všech normálních tkáních. V nejvyšší koncentraci se nachází v plicích, varlatech, ledvinách a periferních krevních jednojaderných buňkách [132]. V polarizovaných buňkách je ABCC1 lokalizován v bazotelární plasmatické membráně [133-136]. V endotheliálních buňkách mozkových kapilár se ABCC1 nachází na lumenální straně [137].

Nadměrná exprese proteinu ABCC1 byla sledována u celé řady buněčných linií vypěstovaných z různých nádorů, např.: rakoviny plic, prsu, žaludku, tlustého střeva, prostaty, melanomu, neuroblastomu a gliomu, fibrosarkomu a epidermoidního karcinomu i různých typů leukemických buněk. Profily MDR nalezené v těchto buňkách se ovšem lišily. Přestože buněčné modely jsou pro výzkum MDR významné, exprese či funkce ABCC1 byly zkoumány i u klinických vzorků. Zvýšená hladina ABCC1 byla nalezena u velkého množství hematologických i solidních tumorů (reference viz. tabulka č. 7 na následující straně) [138].

Konkrétně u nádorů prsu byl ABCC1 protein nalezen u neléčených pacientů a v menším množství i v normální prsní tkáni. Potenciální role ABCC1 ve farmakogenetice rakoviny prsu zatím zůstává neznámá [139].

Tabulka č. 7: Typy tumorů se zvýšenou expresí ABCC1

Typ tumoru	Reference
AML	[140], [141], [142], [143]
ALL	[144]
CLL	[145], [146]
Nemalobuněčné nádory plic	[147], [148], [149, 150], [150], [151]
Malobuněčné nádory plic	[147], [148]
Nádory prsu	[152], [153], [154]
Nádory prostaty	[155, 156]
Nádor žaludku	[157], [158]
Nádory tlustého střeva	[159], [160]
Nádory endometria	[161]
Gliom	[162]
Neuroblastom	[163], [164]
Retinoblastom	[165]

2.6.3 Exprese ABCC2

Protein ABCC2 byl naklonován u mnoha různých živočišných druhů – u lidí, psů, myší, potkanů či králíků. V těle je exprimován převážně v kanalikulární membráně hepatocytů [166-171], je také přítomen ve výběžcích na apikální straně membrány proximálních tubulů ledvin [172, 173], v absorbujících enterocytech [174, 175] a na apikální membráně epitelálních buněk žlučníku [176]. V mnoha předešlých studiích se nepodařilo určit množství ABCC2 mRNA či proteinu v mozku či buněčném preparátu z mozku v různých živočišných druzích včetně člověka [177]. Taipalensuu a kol. se zaměřili na lidské jejunum a naměřili expresi genů ABC transportérů v následujícím pořadí: ABCC2 > ABCB1 ~ ABCC3 > ABCC5 a ABCC1 > ABCC4 [178]. ABCC2 je exprimován v podobných místech jako ABCB1 a ABCG2 [179]. Exprese ABCC2 v jaderných membránách lidských tkání je specifická pro slabě diferenciované buňky, zahrnující kmenové buňky [180]. V lidské placentě byla přítomnost ABCC2 zjištěna na apikální straně syncytiotrofoblastové membrány [181].

Bylo prokázáno, že expresní hladiny ABCC2 jsou regulovány pomocí hormonů. Například ethynylestradiol silně redukuje expresi Abcc2 proteinu u potkanů [182], obdobně také pohlavní steroidy snižují jeho expresi v posttranskripční fázi březosti [183].

ABCC2 je často exprimován i v rakovinných buňkách, zejména u rakoviny tlustého střeva, rakoviny prsu či rakoviny vaječnicků. U rakoviny prsu ABCC2 nekoreluje s rychlostí odezvy ani s časy přežití, naproti tomu u rakoviny vaječnicků absence exprese ABCC2 mRNA vedla k prodloužení času přežití bez progresu u pacientek léčených platinou ve stádiu FIGO III (systém stážování International Federation of Gynecology and Obstetrics). K posouzení role ABCC2 v rozvoji nádorových procesů je nezbytné vyšetření dalších klinických vzorků [184].

3 Cíl práce

- Příprava vzorků, tzn. izolace RNA a DNA z nádorové i okolní nenádorové tkáně pacientek s rakovinou prsu a syntéza cDNA z izolované RNA
- Stanovení exprese genů ABCB1, ABCC1 a ABCC2 v nádorové a nenádorové (kontrolní) tkáni pacientek s karcinomem prsu pomocí real-time PCR s absolutní kvantifikací
- Optimalizace podmínek pro stanovení SNP rs35587, rs60782127 a rs45511401 v genu ABCC1 pomocí DNA sekvenace a stanovení těchto SNP u pacientek s karcinomem prsu
- Optimalizace podmínek pro stanovení SNP rs35587 pomocí real-time PCR a srovnání výsledků stanovení tohoto SNP metodami real-time PCR a sekvenace DNA
- Statistické vyhodnocení genových expresí a genetické variability ABC transportérů ve srovnání s klinicko-patologickými charakteristikami pacientek

4 Praktická část

4.1 Použité přístroje

Autokláv OT 032 (Nüve, Ankara, Turecko)

„Biohazard box“ EN 12469 (Schoeller Instruments, Praha, Česká Republika)

Centrifuga Hermle Z233MK-2 (Maschinenfabrik Berthold Hermle, Gosheim, Německo)

Centrifuga Hermle Z360K (Maschinenfabrik Berthold Hermle, Gosheim, Německo)

Elektroforetický zdroj Owl EC-105 Compact (Thermo Scientific, Waltham, USA)

Homogenizátor Precellys 24 (Bertin technologies, Aix en Provence, Francie)

Incubátor Dry bath incubator (Major science, Saratoga, USA)

Incubátor Techne Dri-Block (Techne, Staffordshire, Anglie)

PCR thermocykler GeneAmp 9600 PCR System (Applied biosystems, Austin, USA)

Přístroj na přípravu MiliQ (ultračistá voda) QuantumTM (Millipore, Billerica, USA)

Real time PCR cykler Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie)

Rotátor Bio rotator RS-Multi (Boeco, Hamburg, Německo)

Sekvenátor ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied biosystems, Austin, USA)

Spektrofotometr Infinite M200 (Tecan, Grodig, Rakousko)

Spektrofotometr UV-visible spectrophotometer Cary 300 (Varian, Palo Alto, USA)

Sterilizátor Chirana HS 62 A (LABO-MS, Praha, Česká Republika)

Transiluminátor Benchtop 2UVTM (UVP, Upland, USA)

4.2 Použité chemikálie a materiál

Chemikálie a materiál, které byly použity v experimentech, pocházejí z těchto zdrojů:

Ambion Foster City, USA	Nuclease-free Water (not DEPC-treated)
Applied biosystems Austin, USA	ABI PRISM [®] BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits 5x Sequencing Buffer Hi-Di Formamide TaqMan [®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase [®] UNG TaqMan [®] Drug Genotyping Assay C_1003676_1_ TaqMan [®] Gene Expression Assays: Hs00184491_m1, Hs00219905_m1, Hs00166123_m1, Hs99999904_m1
Invitrogen Gaithersburg, USA	TRIzol Reagent Quant-iT [™] PicoGreen [®] dsDNA Kit Quant-iT [™] RiboGreen [®] RNA Kit primery: ABCC1f, ABCC1r ABCB1f, ABCB1r
Lachema Brno, Česká Republika	Citronan sodný p.a.
MBI Fermentas Vilnius, Litva	RevertAid [™] First Strand cDNA Synthesis Kit
New England Biolabs Ipswich, USA	6x Gel Loading Dye λ DNA/EcoRI+HindIII marker ØX174 DNA-HaeIII Digest marker
Penta, Praha, Česká Republika	Ethanol Chloroform p.a.
Qiagen Hilden, Německo	Plasmid Midi Kit

Ridel-de Haën Hannover, Německo	Boric Acid p.a. EDTA
Sigma Aldrich Steinheim, Německo	Agarosa (for routine use) Ethidium bromid 0,1 µg/ml primery: ex9f, ex9r ex10f, ex10r ex16f, ex16r PPIAf, PPIAr ABCC2f, ABCC2r TRIzma base reagent
Top-Bio Praha, Česká republika	2x Combi PPP Master Mix 10x PCR Blue Buffer without Mg ⁺² 10x Taq buffer without Mg ⁺² 50x dNTP Master Mix (12,5 mM) MgCl ₂ (25 mM) PCR H ₂ O
Zymo research Orange, USA	Zymoclean Gel DNA Recovery Kit

Ultračistá voda použitá pro většinu aplikací byla připravená pomocí přístroje na přípravu MiliQ (ultračisté vody) QuantumTM. Pro práci s RNA byla použita Nuclease-free voda (NF) dodaná firmou Top-Bio. Spotřební materiál (špičky, zkumavky) byl sterilizován pomocí autoklávu Nüve OT 032 (121 °C, 23 min, 101,5 kPa).

4.3 Příprava a charakterizace vzorků

Do studie bylo zařazeno celkem 40 pacientek s karcinomem prsu (diagnóza C50 dle UICC). U 19 pacientek byla již dříve izolována RNA z nádoru i okolní nenádorové tkáň, DNA z krve a syntetizována cDNA RNDr. Radkou Václavíkovou, PhD.. Vzorky nádorů, nenádorových okolních tkání a krve byly pacientkám odebrány během operace primářem MUDr. Václavem Pechou (Onkochirurgie, Medicon a.s. Praha). Všechny pacientky se podrobily před operací neoadjuvantní chemoterapii režimy založenými na anthracyklinech nebo taxanech (FAC, FEC, AT, docetaxel, paclitaxel apod.). Na Onkochirurgii byly

z lékařských záznamů získány i základní klinicko-patologické informace o pacientkách a jejich průběhu onemocnění (především klinické stádium před a po chemoterapii, TNM dle UICC, histologický typ a stupeň nádoru, exprese receptorů pro estrogen, progesteron a Her-2, dávka, režim a odpověď na chemoterapii). K odběrům krve byly použity Vacutainery s protisrážlivou látkou K₃EDTA. Vzorky tkání byly získány po důkladném histologickém zpracování v Biopstické stanici Biolab s.r.o. (garant projektu MUDr. Markéta Trnková), díky kterému byla získána nádorová a okolní nenádorová prsní tkáň sledovaných pacientek.

4.3.1 Informovaný souhlas pacientky

Všechny pacientky byly poučeny o účelu studie a potvrdily svým podpisem souhlas se svoji účastí ve studii (informovaný souhlas). Studie byla schválena Etickou komisí Státního zdravotního ústavu v rámci grantového projektu Interní Grantové Agentury Ministerstva zdravotnictví ČR č.: 9799-4.

4.4 Použité metody

4.4.1 Izolace DNA ze vzorků krve

Izolaci DNA ze vzorků krve provedla RNDr. Radka Václavíková, PhD. fenol-chloroformovou extrakcí, kdy jsou do organické fáze extrahovány bílkoviny a DNA zůstává ve vodné fázi, ze které je poté precipitována ethanolem a nakonec je rozpuštěna v ultračisté vodě. RNDr. Radka Václavíková, PhD. dále ověřila úspěšnost izolace DNA horizontální elektroforézou v agarosovém gelu. Koncentrace takto izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí Infinite M200.

4.4.2 Izolace RNA ze vzorků tkáně

RNA izolujeme z tkáně metodou fenol/chloroformové extrakce s guanidin-isothiokyanátem pomocí TRIzol Reagent. Centrifugací se tato suspenze rozdělí na vodnou fázi obsahující RNA, rozhraní obsahující část denaturovaných proteinů a fenolickou část obsahující další proteinové molekuly. RNA díky použití pufru a fenolu s

nízkým pH (<4) a při nízké objemové koncentraci chloroformu (do 20% použitého objemu fenolu) zůstává ve vodné fázi, zatímco DNA je za těchto podmínek ve vodě nerozpustná. Guanidin isothiokyanát stabilizuje buněčný obsah a chrání RNA před účinkem RNAs a tak tento extrakt může být uchováván dlouhodoběji při -80°C (převzato z pracovního manuálu pro TRIzol Reagent od Invitrogen).

Se vzorky tkáně bylo pracováno na suchém ledu a v laminárním boxu, použité nástroje byly sterilizované 5 hodin při 130°C a byly použity špičky bez RNAas. Ke tkáni bylo přidáno 1000 µl TRIzol Reagent a poté byla podrcena pomocí homogenzátoru tkání. K materiálu bylo poté přidáno 200 µl chloroformu. Po vortexování a inkubaci 3 minuty při laboratorní teplotě byly vzorky centrifugovány (15 min, 4°C, 12000 ot/min). Horní fáze byla přenesena do čisté zkumavky (Eppendorf) a následně byl přidán stejný objem ledového isopropanolu. Mezifáze a spodní fáze byla dále využita pro izolaci DNA. Horní fáze s isopropanolem se po promíchání nechala inkubovat 10 min při laboratorní teplotě a byla centrifugována (15 min, 4°C, 12000 ot/min). Supernatant byl odstraněn, sediment byl promyt 500 µl 70% ethanolu a následně opět centrifugován (5 min, 4°C, 12000 ot/min). Horní vrstva ethanolu byla poté odebrána a zbytek ethanolu byl následně odpařen při 60°C. Po vysušení byla peleta rozpuštěna v NF vodě v množství odpovídajícím velikosti pelety (40-80 µl). Takto získaná RNA byla uchovávána při -80°C do dalšího použití.

4.4.3 Izolace DNA z mezifáze

Princip izolace DNA z mezifáze je vysrážení přidáním koncentrovaného ethanolu. Po odstředění se na dně zkumavky objeví mléčně zkalený sediment (peleta). S nukleovými kyselinami se srážejí i soli, které zvyšují účinnost srážení nukleových kyselin a dávají peletě bílé zbarvení, tyto soli musí být z DNA odstraněny [185].

K organické fázi a mezifázi bylo přidáno 300 µl 100% ethanolu, směs byla promíchána překlápěním a poté se nechala inkubovat při laboratorní teplotě 3 min. Směs byla zcentrifugována (5 min, 25°C, 12000 ot/min) a ethanolový supernatant obsahující proteiny byl odstraněn do odpadu. Peleta byla 2x promyta 0,1 M roztokem citronanu sodného a inkubována 30 min za periodického míchání na rotátoru. Po inkubaci byla směs centrifugována (5 min, 25°C, 12000 ot/min). Následovala resuspendace DNA v 1 ml 75% ethanolu, inkubace této směsi 20 min při laboratorní teplotě za periodického míchání, centrifugace (5 min, 25°C, 12000 ot/min) a odsátí supernatantu. Zbytek ethanolu byl vysušen při laboratorní teplotě a k peletě bylo přidáno 80-100 µl ultračisté vody dle

velikosti pelety, čímž byla peleta rozpuštěna. Rozpouštění probíhalo při teplotě 55°C přibližně 10 minut, poté byla zkumavka uložena v lednici a roztok DNA byl inkubován přes noc, načež druhý den byl roztok stočen a vodná fáze obsahující DNA byla odebrána do čisté zkumavky. Koncentrace takto izolované DNA byla stanovena spektrofotometriky pomocí Infinite M200.

4.4.4 Horizontální elektroforéza na agarosovém gelu

Principem elektroforézy je dělení nabitých částic dle různé elektroforetické pohyblivosti. Molekuly nukleových kyselin mají díky fosfátovým skupinám záporný náboj, jehož velikost je dána v podstatě pouze délkou řetězce, proto se při horizontální elektroforéze dělí zejména dle své velikosti a případně dle tvaru. Abychom mohli rozdělení nukleových kyselin na gelu pozorovat, musíme je označit pomocí ethidium bromidu. Ten se interkaluje mezi vlákna nukleových kyselin a červeno-oranžově fluoreskuje během ozáření ultrafialovým zářením na transluminátoru o vlnové délce 260-360 nm. Pro posouzení velikosti jednotlivých fragmentů se používají velikostní markery známých molekulových hmotností, což jsou komerčně dostupné směsi fragmentů DNA definovaných velikostí [186].

Byla připravena 1% (pro RNA) a 3% (pro DNA) (w/v) agarosa v 25 ml 0,5xTBE pufru (5x konc. TBE - 0,45 M Tris, 1 M kyselina boritá, 0,01 M EDTA, ultračistá voda). Agarosa v pufru 0,5xTBE byla zahřívána v mikrovlnné troubě do té doby, než se rozpustila, průběžně byla promíchávána. Gel byl přelit do vaničky na elektroforézu a do gelu byl vložen hřeben, který vytvořil jamky pro nanášení vzorků. Po ztuhnutí gelu byl hřeben odstraněn, vanička byla umístěna do aparatury na elektroforézu, která byla poté naplněna elektrodoým 0,5xTBE puforem. Dále byly do jamek nanášeny vzorky s barvivem 6x Loading Dye. Do jedné jamky byly vždy aplikovány 4 μ l ϕ X174-markeru (pro DNA) či DNA/EcoRi+HindIII (pro RNA). Elektroforéza probíhala 25 (RNA) – 45 (DNA) minut při napětí 100-110 V. Po ukončení elektroforézy byl gel umístěn na 10 min do roztoku ethidium bromidu (0,1 μ g/ml) a poté na UV transluminátor, kde bylo pozorováno elektroforetické rozdělení molekul.

4.4.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace

Přístroj Infinite M200 umožňuje měřit fluorescenčně koncentraci RNA (DNA) na principu vazby fluorescenční barvičky RiboGreen (PicoGreen) na nukleové kyseliny. Je to velmi citlivá metoda (až 1000x citlivější než absorbance), která navíc eliminuje příspěvek kontaminant jako jsou bílkoviny a nukleotidy běžně přítomné ve vzorcích.

Metoda umožňuje měřit koncentraci RNA v rozsahu 1 ng/ml – 1 µg/ml podle použití dvou různých koncentrací RiboGreen barvy (high range assay 20 ng/ml – 1 µg/ml, low range assay 1 ng/ml – 50 ng/ml) a DNA v rozsahu 250 pg/ml – 1000 ng/ml v low range assay.

Alespoň 4 hodiny před měřením byly připraveny potřebné roztoky, množství dle vzorků:

1x TE pufr (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)

Quant-iT pracovní roztok – naředění komponenty A 200x v roztoku 1x TE pufru

Standardní pracovní roztok (2 µg/ml) – 4 µl komponenty B + 196 µl 1x TE pufru

RNA pracovní roztok – pouze u RNA, 1-2 µl vzorku + 198-199 µl 1x TE pufru

	DNA	RNA
Komponenta A	Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent	Quant-iT RiboGreen RNA reagent
Komponenta B	dsDNA STD stock (100 µg/ml)	RNA STD stock (100 µg/ml)

Standardní křivka byla připravena následovně:

Poloha na destičce	1x TE DNA/RNA (µl)	Standardní pracovní roztok DNA/RNA (µl)	Quant-iT pracovní roztok DNA/RNA (µl)	Koncentrace DNA/RNA (ng/ml)
A1	0/0	100	100	1000/1000
A2	50/50	50	100	500/500
A3	90/95	10/5	100	100/50
A4	98/99,5	2/0,5	100	20/5
A5	100	0	100	Blank

Vzorky byly spolu s TE pufrém a komponentou A (DNA: 1 µl DNA + 99 µl 1x TE + 100 µl komponenty A; RNA: 10 µl RNA pracovního roztoku + 90 µl 1x TE pufru + 100 µl komponenty A) rozpipetovány a byla změřena koncentrace s excitačním maximem nastaveným na 480 nm a emisním maximem nastaveným na 520 nm.

4.4.6 Syntéza cDNA

cDNA je připravována reverzní transkripcí z RNA pomocí reverzní transkriptasy. Reverzní transkriptasa je součástí RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kitu pro přípravu cDNA.

Nejprve bylo rozpipetováno do každé zkumavky 1 µl náhodných hexamerů (0,2 µg/µl) použitých jako primerů a doplněno do 13 µl ultračistou vodou a vzorky obsahujícími 0,5 µg RNA. Po promíchání a stočení se směs nechala inkubovat 5 min při 70°C, poté byla ochlazená na ledovém stojanu. Byl přidán mix, který pro každý vzorek obsahoval 4 µl pufru, 2 µl 10 mM směsi nukleotidů a 1 µl inhibitoru RNasy. Směs po promíchání byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě, poté ochlazená na ledovém stojanu. Do čistých zkumavek byly odebrány 2 µl směsi jako kontrola bez reverzní transkriptasy, a ke vzorkům bylo přidáno po 1 µl reverzní transkriptasy (200 µg/µl). Nakonec byla směs inkubována 10 min při laboratorní teplotě, 60 min při 42°C a reakce byla zastavena inkubací 10 min při 70°C.

4.4.7 Amplifikace cDNA pomocí PCR

PCR je metoda pro *in vitro* syntézu a amplifikaci cílové DNA sekvence pomocí specifických párů primerů (oligonukleotidů). PCR se provádí v thermocykleru, který je schopen střídat různé teploty v krátkém časovém úseku během jednoho cyklu.

Složení reakční směsi na vzorek bylo následující:

Sterilní ultračistá H ₂ O	3,7 µl
2x Combi PPP Master Mix*	5 µl
Primer (10 µM) forward	0,4 µl
Primer (10 µM) reverse	0,4 µl
cDNA	0,5 µl

*složení: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerasa, monoklonální anti-Taq DNA polymerasa (38nM), stabilizátory a aditiva

Jako kontrola čistoty reagensů byla použita směs všech reagensů v množstvích stejných, v jakých byly přidávány do PCR reakce, pouze bez přidání 0,5 µl cDNA.

Reakční podmínky v thermocykleru byly následující:

94°C 5 minut

38 cyklů

94°C 30 sek (= rozvolnění cDNA)

64°C 30 sek (= nasednutí primerů)

72°C 30 sek (= prodlužování řetězců)

72°C 5 minut (= polymerasa dosyntetizuje fragment DNA)

8°C (udržování této teploty, dokud vzorky nebyly odebrány)

Amplifikace požadovaného úseku genu byla vizualizována pomocí horizontální elektroforézy (3% gel, napětí 110V, 30 min, marker θ X174).

4.4.8 Příprava standardů pro real-time PCR

Pro přípravu standardů bylo třeba naklonovat plasmid s přítomným studovaným genem a z něj poté připravit PCR produkt. Přípravu plasmidu provedla Ing. Marie Ehrlichová pomocí transformace *Escherichia coli* DH5 α buněk a izolace plasmidu pomocí kitu Plasmid Midi Kit.

Jako kontrola přípravy plasmidu byla provedena elektroforéza 2 μ l plasmidu v 1% agarosovém gelu.

Z hotového plasmidu byl posléze připraven PCR produkt – pomocí specifických primerů byl amplifikován insert. Nejprve bylo provedeno PCR v thermocykleru s následujícími programy:

PPIA:

94°C 5 min

35 cyklů

94°C 30 sek

60°C 30 sek

72°C 1 min

72°C 5 min

8°C (udržování této teploty, dokud vzorky nebyly odebrány)

ABCB1:

94°C 5 min

15 cyklů

94°C 30 sek

70-55°C 1 min

72°C 2 min

20 cyklů

94°C 30 sek

65°C 1 min

72°C 2 min

72°C 10 min

8°C (udržování této teploty, dokud vzorky nebyly odebrány)

ABCC1:

94°C 5 min

15 cyklů

94°C 30 sek

70-55°C 1 min

72°C 1 min 30 sek

20 cyklů

94°C 30 sek

60°C 1 min

72°C 1 min 30 sek

72°C 5 min

8°C (udržování této teploty, dokud vzorky nebyly odebrány)

ABCC2: viz. ABCC1

Složení reakčních směsí bylo následující:

Složka	PPIA, ABCC1	ABCC2	ABCB1
ultračistá H ₂ O	3,95 µl	3,7 µl	4,7 µl
10x Taq pufr bez Mg ⁺²	1 µl	1 µl	1 µl
MgSO ₄ , 16 mM	1 µl	1 µl	1 µl
dNTP, 2,5 mM	0,8 µl	0,8 µl	0,8 µl
Primery reverse + forward, 100 µM	0,5 + 0,5 µl	0,5 + 0,5 µl	0,5 + 0,5 µl
Taq polymerasa	1,25 µl	0,5 µl	0,5 µl
Plasmid	1 µl	2 µl	1 µl

Použité primery:

PPIA:

forward: 5'AGGGTTCCTGCTTTCAGA

reverse: 5'CCCAGTTGCTGCCTACATTT

ABCB1:

forward: 5'ACTGGCGCTTTGTTCCAG

reverse: 5'TGGAGAGATCCTCACCAAGC

ABCC1:

forward: 5'CTGGGCTTATTTTCGGATCAA

reverse: 5'GCCCAAACGAGAACTGGTA

ABCC2:

forward: 5'TTCCTGGGGATAATCAGCAC

reverse: 5'AGAGAACAGGATGGGGTCCT

Připravený PCR produkt byl rozdělen pomocí elektroforézy na 1% agarosovém gelu a izolován z gelu kitem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit. Po proběhnutí elektroforézy byly vyříznuty proužky gelu obsahující požadovanou DNA a zváženy. Ve sterilních zkumavkách byl k proužkům přidán solubilizační ADB pufr (na 100 mg gelu

300 µl) a byly rozpouštěny 10 minut v suchém bloku nastaveném na 55 °C za průběžného promíchávání. Rozpuštěné výřezy z gelu byly po 700 µl aplikovány na kolonky a centrifugovány (1 min, 10000 ot/min). Eluovaný roztok byl vylit do výlevky. Poté bylo dvakrát aplikováno na kolonky 200 µl promývacího pufru a odstředeno 1 minutu při 10000 ot/min. Eluovaný roztok byl opět vylit do výlevky. Následovalo odstranění zbytků promývacího pufru centrifugací (10000 ot/min, 1 min). Kolonky byly přeneseny do čistých 1,5 ml mikrokumavek a na kolonky se aplikovala ultračistá voda. Množství vody odpovídalo množství gelu a výsledku elektroforézy, tj množství očekávaného produktu. Po 1 minutě byla DNA eluována odstředěním (10000 ot/min, 1 min). Výsledky purifikace byly ověřeny pomocí elektroforézy 4 µl produktu v 1% agarosovém gelu. Koncentrace purifikovaného PCR produktu byla zjištěna pomocí UV-VIS spektrofotometru Cary 300.

4.4.9 Kvantifikace genové exprese pomocí real-time PCR

Metoda je založena na klasickém PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu (u klasického PCR se detekuje až finální produkt). Základní podmínkou je přítomnost fluorescenční próby, která se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Data jsou tedy sbírána během celého PCR procesu na speciálních thermocyklerech s optikou umožňující excitaci fluorescenčních značek a následnou detekci fluorescence v každé jamce. Próby pracují na principu FRET (fluorescence resonance energy transfer) mezi fluorescenčním barvivem (F) a zhášečem (Q). Nárůst fluorescenční aktivity je způsoben zvýšením vzdálenosti mezi molekulou F a Q po rozštípnutí navázané sondy polymerasou. Hlavní výhodou metody oproti "klasickému" PCR je možnost kvantifikace syntetizovaného produktu, a to buď relativní, tj. porovnáním s jinou skupinou vzorků (např. kontrolní), nebo absolutní, tj. z kalibrační křivky rekombinantní DNA o známém množství [187]. Absolutní metoda kvantifikace byla použita v našem případě. Při hodnocení platí skutečnost, že čím vyšší je obsah nukleových kyselin v testovaném vzorku (např. mRNA jako výraz úrovně exprese daného genu), tím rychlejší je přírůstek fluorescence.

Nejprve bylo třeba připravit kalibrační křivky. Pomocí změřené koncentrace připraveného purifikovaného PCR produktu (viz. 2.4.7) mohly být naředěny standardy o známé koncentraci. Pro ředění standardů byla použita ultračistá voda. Poté byl připraven

mix, který byl po 15 µl rozpipetován do 0,1 ml mikrozkušavek. Složení mixu po každý vzorek, blank i standardy bylo následující:

ultračistá H ₂ O	4 µl
TaqMan® Gene Expression Assays*	1 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix**	10 µl

* obsahuje dva nezačtené primery (18 µM/primer), 6-FAM™ značenou TaqMan próbu s MGB (5 µM)

**mix optimalizovaný proTaqMan reakci, obsahuje AmpliTaq Gold DNA polymerasu, AmpErase UNG, dNTP s dUTP, pasivní referenční barvivo ROX™ a optimalizovaný pufr

K blanku bylo přidáno 5 µl sterilní ultračisté vody, vzorky a standardy byly rozpipetovány po 5 µl do k mixu a mikrozkušavky s takto připravenou reakční směsí byly vloženy do thermocykleru. Programy byly pro jednotlivé transportéry nastaveny takto:

ABCC1:

50°C	2 min
95°C	10 min

50 cyklů:

95°C	15 sek
60°C	1 min

ABCC2:

50°C	2 min
95°C	10 min

50 cyklů:

95°C	15 sek
60°C	1 min

ABCB1:

50°C 2 min
95°C 10 min

50 cyklů

95°C 15 sek
58°C 1 min

Jako kontrolní gen byl využit PPIA, který byl stanoven za stejných podmínek PCR amplifikace jako geny ABC transportérů. V thermocykleru byl použit následující program:

PPIA:

50°C 2 min
95°C 10 min

50 cyklů

95°C 15 sek
58°C 1 min

Výsledky byly poté vyhodnoceny v programu RotorGene 6000 Series Software verze 1.7.

4.4.10 Genotypizace ABCC1 - stanovení SNP

4.4.10.1 Stanovení SNP pomocí real-time PCR

Pro detekci produktů pomocí kvantitativní PCR byly použity sondy TaqMan[®]. Jedná se o oligonukleotidy s fluorescenční značkou na 5'-konci. Na 3'-konci mají navázaný nefluorescenční zhášecí a molekulu vázající se do malého žlábků DNA, tzv. MGB (minor groove binder). Pokud je zhášecí v blízkosti fluorescenční značky, tlumí její fluorescence. Naopak pokud se fluorescenční značka dostane z vlivu zhášecí, dojde k emisi fluorescence. V reakci jsou vždy použity dvě sondy. Každá je sekvenčně specifická pro jednu variantu sledovaného SNP a má vlastní fluorescenční značku (VIC[®] a FAM[™] (6-carboxyfluorescein)). Sondy se vážají na vnitřní část amplifikované sekvence a pokud tvoří homoduplex, jsou rozloženy 5'-exonukleasovou aktivitou Taq DNA-polymerasy. To způsobí oddálení fluorescenční značky a zhášecí a emisi odpovídající fluorescence. Pro zlepšení stability komplexu templátové DNA a sondy slouží molekula MGB. Detekovaná fluorescence určuje jaký SNP je v amplifikovaném úseku (pokud detekujeme fluorescence pouze fluorochromu VIC[®], jedná se o homozygota jednoho typu, pokud detekujeme pouze

FAM™, jedná se o homozygota druhého typu, a pokud detekujeme oba fluorochromy, jedná se o heterozygota (upraveno dle návodu pro TaqMan® SNP Genotyping Assay od Applied Biosystems).

Ke stanovení jsme použili DNA izolovanou z krve, u které byla změřena koncentrace na přístroji Infinite M200 a poté byly vzorky naředěny na 0,2 µg/100 µl. Složení reakční směsi bylo následující:

TaqMan® Drug Genotyping Assay	0,25 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix	5 µl
DNA	4,75 µl

Jednotlivé složky směsi byly napipetovány do mikrozkušavek a vloženy do přístroje RotorGene 6000. Pro genotypizaci byl navolen program:

95°C 10 min

55 cyklů

92°C 15 sek

60°C 1 min 30 sek

Popsanou metodou jsme stanovovali SNP v exonu 9 1062T>C. Fluorescence fluorochromu VIC® byla detekována u genu ABCC1 divokého typu (tedy s alelou C), FAM™ pak u homozygotů s alelou T. Byla použita sonda C_1003676_1_.

4.4.10.2 Stanovení SNP pomocí sekvenace

Sekvenace DNA (též sekvenování či sekvencování DNA) je souhrnný termín pro biochemické metody, jimiž se zjišťuje pořadí nukleových basí (A, C, G, T). Nejprve bylo nutné amplifikovat specifický úsek DNA, který obsahoval SNP, pomocí PCR reakce. Jelikož je sekvenace metoda citlivá na kontaminaci DNA (viz. tabulka č. 4), bylo potřeba elektroforeticky ověřit připravený PCR produkt a případně optimalizovat PCR reakci, aby byl amplifikován pouze námi požadovaný produkt.

K reakci, která probíhala v celkovém množství složek 10 μ l, byly potřeba tyto reagensy:

ultračistá H₂O (doplnění do 10 μ l)

pufr bez Mg⁺²

MgCl₂ (v koncentracích 0,8 mM, 1 mM, 1,25 mM, 1,4 mM či 1,6 mM v reakci)

dNTP (v koncentraci 0,2 mM v reakci)

10 mM primery forward + reverse (používané v množstvích 0,25 μ l či 0,5 μ l)

1 μ l Taq polymerasy (bezbarvá)

DNA izolovaná z krve (používaná v množství 1 μ l či 2 μ l, koncentrace 20 ng/ μ l)

Základní amplifikační programy, se kterými se pracovalo a obměňovaly se změnami teplot a optimalizací počtu cyklů, byly tyto:

A) 94°C 3 min

10 cyklů

94°C 30 sek

62-52°C (každý cyklus snížení o 1°C) 30 sek

72°C 30 sek

25 cyklů

94°C 30 sek

62°C 30 sek

72°C 30 sek

72°C 10 min

8°C (udržování této teploty, dokud vzorky nebyly odebrány)

B) 94°C 3 min

35 cyklů

94°C 30 sek

62 30 sek

72°C 1 min

72°C 10 min

8°C (udržování této teploty, dokud vzorky nebyly odebrány)

Pro ověření amplifikace specifického PCR produktu byla provedena elektroforéza v 2% agarosovém gelu, jako marker byl použit θ X174.

4.4.10.2.1 Sekvenační PCR reakce

Sekvenační PCR reakce byla provedena pomocí kitu BigDye Terminator Sequencing Kit. Složení reakční směsi bylo následující:

ultračistá H ₂ O	2,5 µl
BigDye Terminator Mix	1 µl
5x BigDye Sequencing Buffer	0,5 µl
10 µM sekvenční primer (viz. tab. č. 14 na straně 78)	0,25 µl
PCR produkt	0,75 µl

Byl použit následující PCR program:

96°C 1min

30 cyklů

96°C 10 sek

50°C 5 sek

60°C 4 min

8°C (udržování této teploty, dokud vzorky nebyly odebrány)

4.4.10.2.2 Purifikace sekvenčních produktů

K PCR produktům byla nejprve přidána směs 0,5 µl 125 mM EDTA a 0,5 µl 3 M acetátu sodného a poté 12,5 µl 100% ethanolu. Směs byla inkubována 15 min ve tmě. Dále byla směs centrifugována (15 min, 6000 ot/min, 4°C). Potom byly mikrozkušavky otevřené překryty buničinou, obráceny a centrifugovány (1 min, 1000 ot/min, 4°C) aby došlo k odstranění supernatantu. Tento krok byl proveden dvakrát: bylo přidáno 17,5 µl 70% ethanolu a znovu proběhla centrifugace (15 min, 6000 ot/min, 4°C). Po druhém odstranění supernatantu byly vzorky vysušeny při 50°C ve tmě 15 min. Nakonec byla peleta resuspendována v 10 µl deionizovaného formamidu a ponechána při 4°C ve tmě. Před samotnou sekvenací proběhla denaturace v thermocykleru – 5 min při 94°C.

4.4.10.2.3 Sekvenace

Přečištěné a zdenaturované produkty PCR byly sekvenovány pomocí automatického sekvenátoru ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Přístroj obsluhovala Ing. Ivona Hlavatá. K vyhodnocení SNP byl použit software Sequencing Analysis 5.3.1 od Applied Biosystems.

4.5 Statistické vyhodnocení výsledků

Významnost výsledků byla hodnocena statistickým programem SPSS v15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Pro analýzy vztahů mezi SNP a klinickými daty pacientek byl použit Pearsonův chi-kvadrát test. Pro analýzy vztahů genových expresí k faktoriálním veličinám jako jsou SNP nebo některá klinická fakta byly použity neparametrické testy Mann-Whitney nebo Kruskal-Wallis, protože expresní data byla rozložena nenormálně (podle testu Kolmogorova-Smirnova). Spojité veličiny (např.: věk při diagnóze vs. exprese nebo velikost nádoru v mm vs. exprese) byly korelovány pomocí neparametrického Spearmanova testu. K vyjádření rozdílů mezi expresí v nádorové a nenádorové tkáni byl použit neparametrický Friedmanův test. Rozdíly a vztahy dosahující hladiny významnosti nižší než 0,05 (oboustranný test) byly považovány jako statisticky významné a prezentovány ve výsledkové části.

5 Výsledky

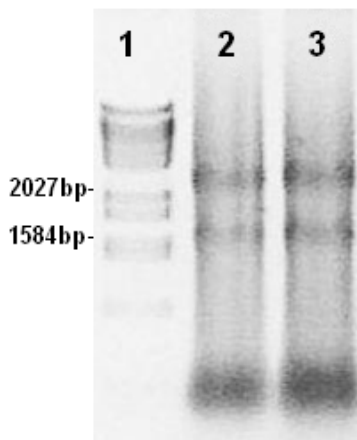
Soubor pacientek sledovaný v této práci byl charakterizován na základě řady klinicko-patologických údajů (tab. č. 8). Průměrný věk pacientek byl $53,3 \pm 8,9$ let a průměrná velikost nádoru byla $31,3 \pm 13,9$ mm.

Tabulka č. 8: Klinicko-patologické charakteristiky sledovaných pacientek

		Počet vzorků	Procent
Stav menopauzy	premenopauzální	18	45,0
	postmenopauzální	19	47,5
	neznámo	3	7,5
Histologický typ nádoru	invazivní ductální karcinom	36	90,0
	invazivní lobulární karcinom	3	7,5
	neznámo	1	2,5
Histologický stupeň (G)	I	4	10,0
	II	17	42,5
	III	12	30,0
	neznámo	7	17,5
Stav uzlin	pozitivní	21	52,5
	negativní	15	37,5
	neznámo	4	10,0
Stadium (S)	I	1	2,5
	II	20	50,0
	III	15	37,5
	neznámo	4	10,0
T	T1	2	5,0
	T2	22	55,0
	T3	9	22,5
	T4	3	7,5
	neznámo	4	10,0
N	N1	15	37,5
	N2	12	30,0
	N3	9	22,5
	neznámo	4	10,0
M	M0	36	90,0
	neznámo	4	10,0
Receptor pro estrogen	negativní	8	20,0
	pozitivní	31	77,5
	neznámo	1	2,5
Receptor pro progesteron	negativní	11	27,5
	pozitivní	28	70,0
	neznámo	1	2,5
Léčba	anthracykliny	10	25,0
	taxany	1	2,5
	anthracykliny+taxany	26	65,0
	neznámo	3	7,5

5.1 Izolace RNA z tkáně a ověření izolace pomocí horizontální elektroforézy

Od 21 pacientek (P84-P144) byla k dispozici nádorová a nenádorová prsní tkáň, z níž byla pomocí TRIzol reagentu izolována RNA a pomocí horizontální elektroforézy byla ověřena úspěšnost izolace. U 4 vzorků nenádorové tkáně došlo k degradaci RNA (viz. tabulky 10-12 na stránkách 75-76, vzorky označené jako CH), u všech ostatních vzorků jsme pozorovali elektroforetické rozdělení nedegradované RNA – tedy dva proužky náležející ribosomální RNA 18S a 28S viz. obrázek č. 6.



Obrázek č. 6: Výsledek elektroforézy izolované RNA: komínek 1 - λ -marker; komínky 2-3 - vzorky RNA

5.2 Izolace DNA z mezifáze

Podařilo se nám optimalizovat postup izolace, zejména jsme zvýšili množství izolované DNA pomocí inkubace při zvýšené teplotě a inkubace rozpouštěné DNA přes noc. DNA jsme izolovali ze vzorků P84-P144, poté jsme ověřili úspěch izolace a zároveň kvantifikovali množství DNA pomocí spektrofotometrie na Infinite M200. Tato DNA nebyla v naší práci použita a bude dále využita v rámci studie methylačního stavu vybraných genů.

5.3 Synzéza cDNA z izolované RNA a ověření izolace pomocí PCR amplifikace genu a horizontální elektroforézy

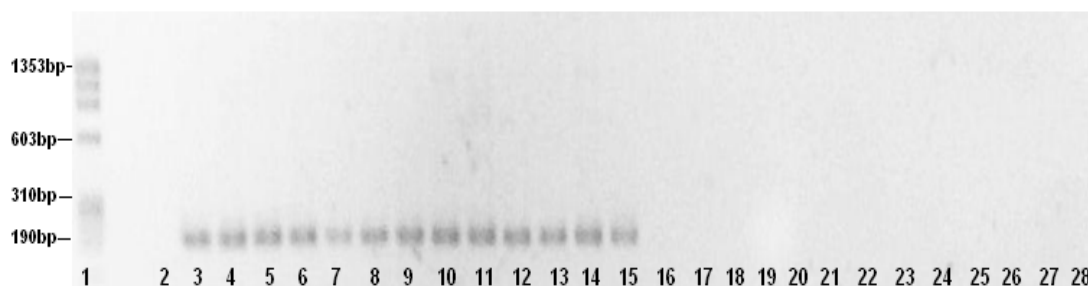
Pro syntézu cDNA byla třeba stanovit koncentraci izolované RNA, což bylo provedeno pomocí spektrofotometru Infinite M200. K reakci bylo třeba 0,5 µg RNA, pomocí změřené koncentrace jsme tedy vypočítali, kolik µl roztoku obsahujícího RNA je do reakce potřeba přidat. Syntézu cDNA jsme provedli s vypočítaným množstvím RNA a pro posouzení případné kontaminace syntetizované cDNA genomovou DNA byla provedena PCR amplifikace fragmentu kontrolního genu ubikvitinu C za vzniku produktu o délce 190 bp, přičemž z genomové DNA by vznikl PCR produkt o délce 1009 bp. Amplifikovaná oblast obsahovala první intron. Primery byly již dříve navrženy pomocí programu MacOligo v4.0 a databáze GenBank.

Použité primery:

forward (umístěn v exonu 1): 5'-ATT TGG GTC GCA GTT CTT GT

reverse (umístěn v exonu 2): 5'-TCC AGC AAA GAT CAG CCT CT

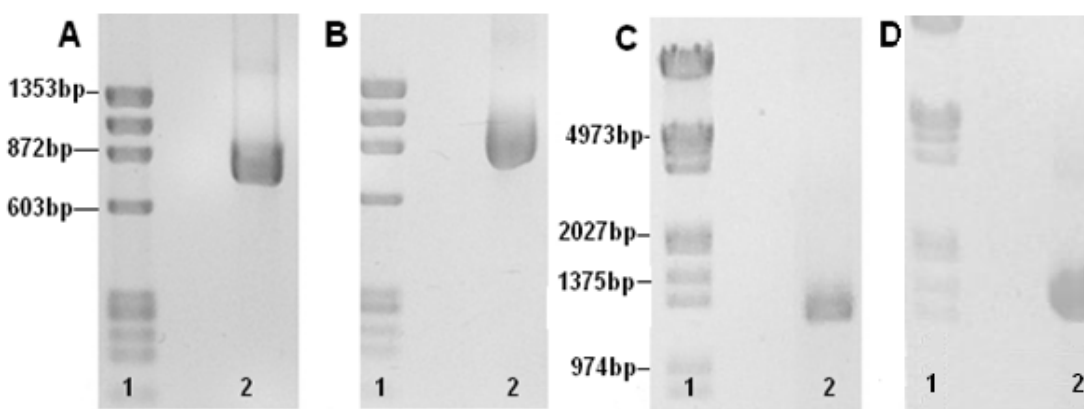
Jako kontrola čistoty složek reakce byl použit roztok všech složek kromě cDNA. Příklad výsledku kontrolní elektroforézy je na obrázku č. 7. Takto připravená cDNA je všech vzorků byla následně použita pro studium genetické exprese ABC transportérů pomocí real-time PCR.



Obrázek č. 7: Výsledek elektroforézy po kontrolním PCR syntézy cDNA: komínek 1 - marker Φ X174; komínek 2 - kontrola PCR (bez cDNA); komínky 3-15 - vzorky cDNA; komínky 16-28 - negativní kontroly syntézy cDNA

5.4 Příprava standardů pro real-time PCR – příprava PCR produktu z plasmidu, purifikace PCR produktu z gelu a ředění purifikovaného PCR produktu

Z plasmidu, připraveného Ing. Marií Ehrlichovou, byl pomocí specifických primerů amplifikován insert s požadovaným genem. Připravený PCR produkt byl rozdělen pomocí elektroforézy na 1% agarosovém gelu, výsledek jsme srovnali s markerem a vyhodnotili. Délky amplifikovaných úseků byly následující: PPIA 738 bp, ABCC2 849 bp, ABCC1 1242 bp a ABCB1 1502 bp. Proužek v gelu odpovídající velikosti amplifikovaného insertu jsme purifikovali pomocí kitu Zymoclean Gel DNA Recovery Kit a výsledný produkt jsme rozpustili v ultračisté vodě. Velikost a čistotu produktu jsme opět ověřili pomocí elektroforézy, výsledky jsou na obrázku č. 8. Koncentrace DNA byla následně určena pomocí spektrofotometrie na přístroji Cary 300 a byl vypočítán počet kopií genu na jednotku koncentrace. Poté byly připraveny standardy ředěním uvedeným v tabulce č. 9 na následující straně.



Obrázek č. 8: Kontrolní elektroforéza amplifikovaného úseku genu: A) komínek 1 - marker 0X174, komínek 2 - amplifikovaný úsek genu PPIA; B) komínek 1 - marker 0X17; komínek 2 - amplifikovaný úsek genu ABCC2; C) komínek 1 - marker λ DNA/*EcoRI* + *Hind* III, komínek 2 - amplifikovaný úsek genu ABCC1; D) komínek 1 - marker λ DNA/*EcoRI* + *Hind* III, komínek 2 - amplifikovaný úsek genu ABCB1

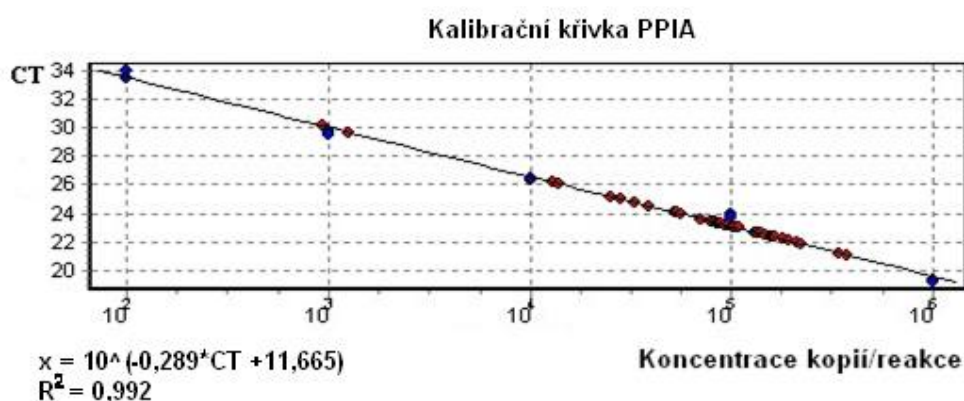
Tabulka č. 9: Naměřené koncentrace připravených PCR produktů, jejich molekulové hmotnosti a počty kopií genu obsažené ve standardech

	PPIA			ABCC1			ABCC2			ABCB1		
c (µg/µl)	0,1503			0,233			0,226			0,2355		
M (g/mol)	228279,95			382657,40			262033,38			465082,95		
Počet kopií genu/µl	3,9 x10 ¹¹			3,6 x10 ¹¹			5,1 x10 ¹¹			3 x10 ¹¹		
Ředění	Přidáno /µl	H ₂ O /µl	Počet kopií	Přidáno /µl	H ₂ O /µl	Počet kopií	Přidáno /µl	H ₂ O /µl	Počet kopií	Přidáno /µl	H ₂ O /µl	Počet kopií
Q1	PCR prod./ 5	995	1,95 x10 ⁹	PCR prod./5	995	1,8x10 ⁹	PCR prod./ 5	995	2,55x10 ⁹	PCR prod. /5	995	1,1775x10 ⁹
Q2	Q1/5	995	9,75 x10 ⁶	Q1/5	995	9x10 ⁶	Q1/5	995	1,27x10 ⁷	Q1/5	995	5,8875x10 ⁶
S5	Q2/ 20,5	979,5	1 x10 ⁶	Q2/ 111	889	5x10 ⁶	Q2/ 77,5	922,5	5x10 ⁶	Q2/ 26,7	973,3	1 x10 ⁶
S4	S5/ 100	900	1 x10 ⁵	S5/200	800	1x10 ⁶	S5/ 100	900	5x10 ⁵	S5/ 100	900	1 x10 ⁵
S3	S4/ 100	900	1 x10 ⁴	S4/100	900	1x10 ⁵	S4/ 100	900	5x10 ⁴	S4/ 100	900	10000
S2	S3/ 100	900	1000	S3/100	900	1x10 ⁴	S3/ 100	900	5000	S3/ 100	900	1000
S1	S2/ 100	900	100	S2/100	900	1000	S2/ 100	900	500	S2/ 100	900	100
S0				S1/100	900	100	S1/ 100		50			

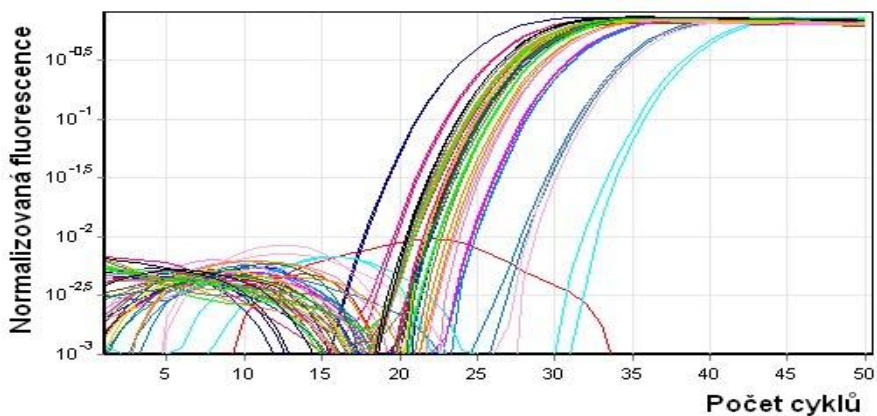
Z těchto standardů byla sestrojena kalibrační křivka umožňující přesné určení hladiny exprese mRNA jednotlivých genů.

5.5 Stanovení exprese genů ABCB1, ABCC1 a ABCC2 a kontrolního genu PPIA pomocí real-time PCR

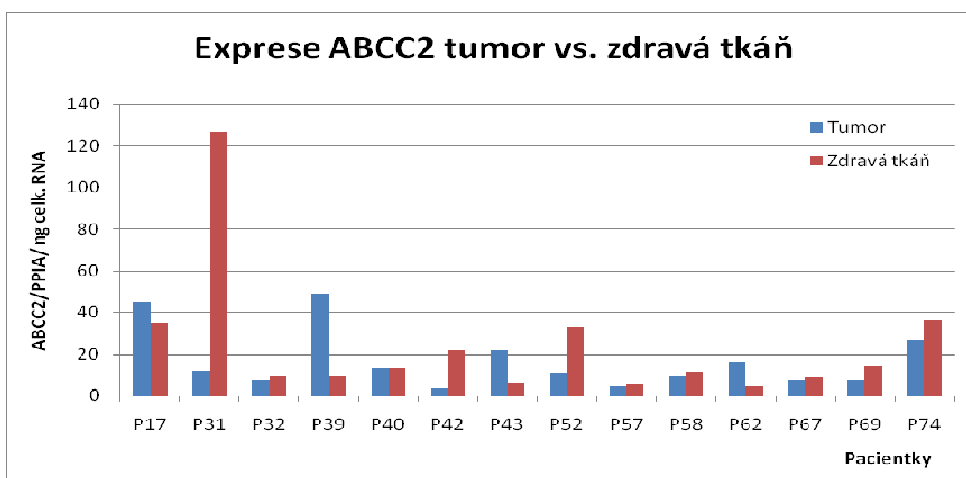
Poté, co jsme si připravili standardy pro kalibrační křivku, jsme mohli stanovit exprese pomocí real-time PCR pomocí absolutní kvantifikace. Nejprve jsme optimalizovali ředění cDNA přidávané do reakce, aby hodnoty exprese byly nejlépe mezi krajními hodnotami kalibrační křivky. Po optimalizaci jsme již mohli přistoupit k samotnému stanovení exprese, přičemž každý den měření byla naředěna nová kalibrační křivka z Q1, jelikož jsme zjistili, že naředěný PCR produkt velmi rychle degraduje. Všechny vzorky i standardy byly kvůli kontrole a přesnosti nanášeny ve dvojicích. V případě, že byl rozdíl mezi duplikáty více než 10% bylo stanovení daného vzorku opakováno. U všech vzorků byla detekována exprese sledovaných genů a vyhodnocena real-time PCR reakce softwarem Rotor-Gene 6000 série verze 1.7 metodou absolutní kvantifikace s využitím kalibrační křivky příslušných standardů. Standardní kalibrační křivka PPIA je na obrázku č. 9. Počet kopií ABCB1, ABCC1 a ABCC2 v každém vzorku byl vztažen na ng celkové RNA, stejně tak byl vyhodnocen i počet kopií kontrolního genu PPIA. Nakonec byla provedena normalizace počtu kopií ABCB1, ABCC1 a ABCC2 na počet kopií PPIA – výsledky vyhodnocení jsou v tabulkách č. 11-13 a znázorněny v grafech na obrázcích č. 11-14 na stranách 73-76. Jako ukázka stanovení exprese je uveden záznam z měření exprese kontrolního genu PPIA (obrázek č. 10 na následující straně). Jako limit pro výpočet počtu kopií jsme používali cyklus (C_T), v němž signál fluorescence překročil přednastavenou prahovou hodnotu (určenou fluorescenční hladinu) a začal exponenciálně růst.



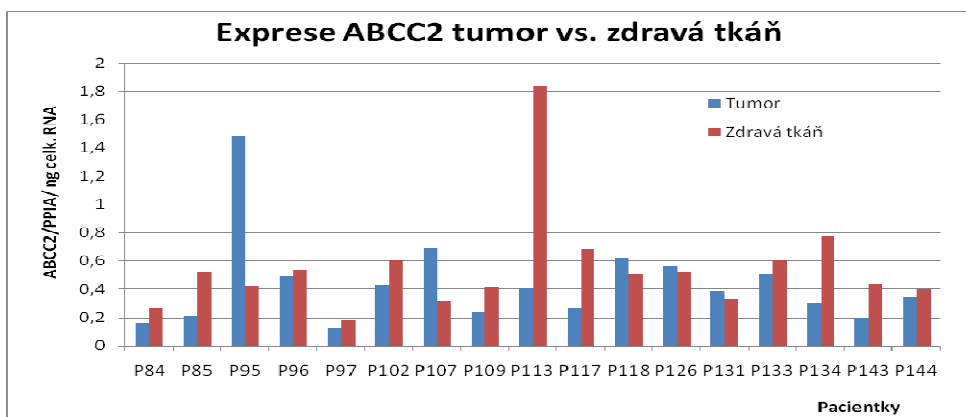
Obrázek č. 9: Kalibrační křivka PPIA, modře standardy, červeně vzorky



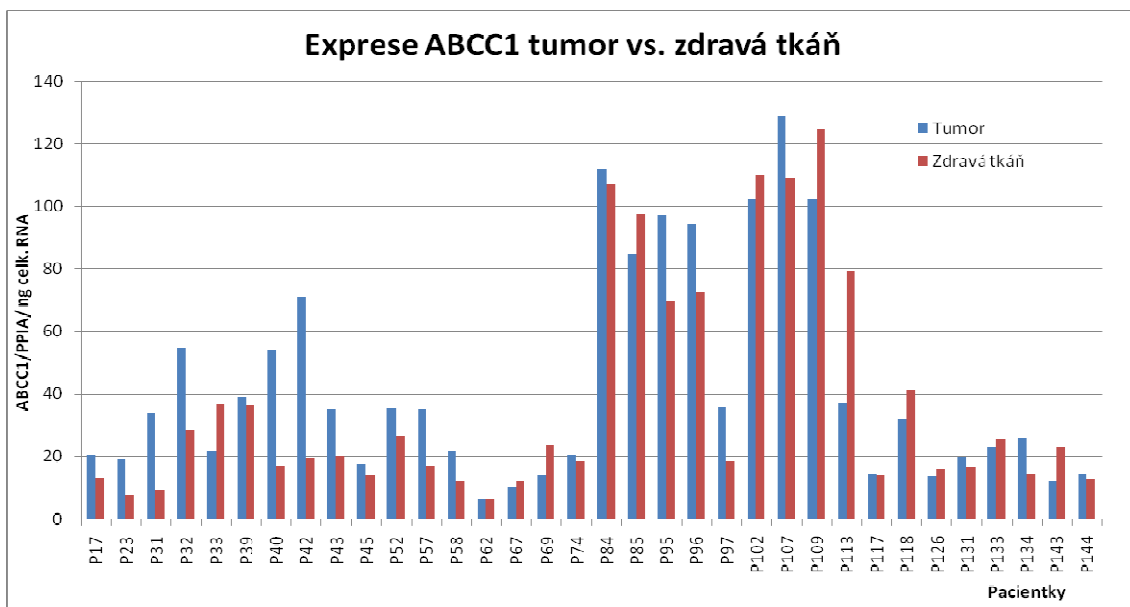
Obrázek č. 10: Výstup z programu RotorRene - kvantifikace genové exprese u PPIA



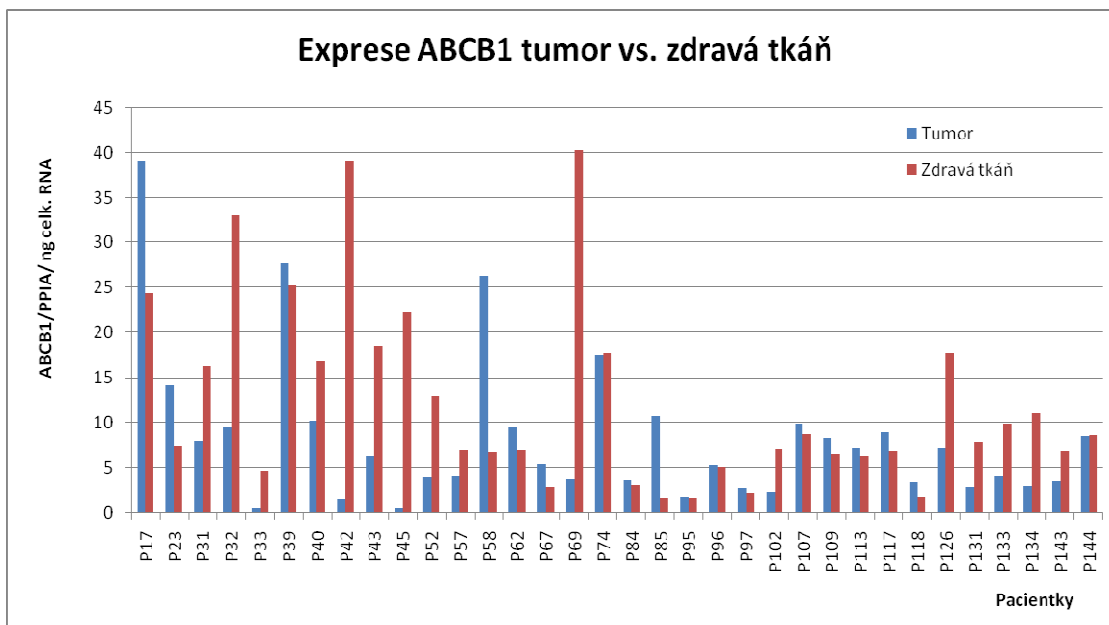
Obrázek č. 11: Graf znázorňující rozdíly exprese mezi nádorovou tkání a zdravou tkání u ABCC2 vzorky P17-P74



Obrázek č. 12: Graf znázorňující rozdíly exprese mezi nádorovou tkání a zdravou tkání u ABCC2 vzorky P84-P144



Obrázek č. 13: Graf znázorňující rozdíly exprese mezi nádorovou tkání a zdravou tkání u ABCC1



Obrázek č. 14: Graf znázorňující rozdíly exprese mezi nádorovou tkání a zdravou tkání u ABCB1

Tabulka č. 10: Expres ABCB1 u pacientek s rakovinou prsu normalizovaná vůči kontrolnímu genu PPIA

Vzorky	ABCB1/PPIA/ ng celk. RNA v nádoru	ABCB1/PPIA/ ng celkové RNA ve zdravé tkáni	Vzorky	ABCB1/PPIA/ ng celk. RNA v nádoru	ABCB1/PPIA/ ng celkové RNA ve zdravé tkáni
P17	39,1	24,3	P85	10,7	1,6
P31	8,0	16,3	P90	1,8	CH
P32	9,4	33,0	P95	1,7	1,6
P33	0,4	4,6	P96	5,3	5,0
P39	27,6	25,1	P97	2,7	2,1
P40	10,2	16,8	P102	2,3	7,1
P42	1,4	39,1	P107	9,8	8,6
P43	6,2	18,4	P109	8,2	6,4
P45	0,4	22,2	P113	7,2	6,3
P47	1,1	CH	P117	8,9	6,8
P52	3,9	13,0	P118	3,3	1,7
P55	18,7	CH	P126	7,2	17,8
P57	4,0	7,0	P129	5,6	CH
P58	26,2	6,6	P131	2,8	7,8
P62	9,5	7,0	P132	3,9	CH
P67	5,3	2,8	P133	3,9	9,8
P68	ND	CH	P134	2,9	11,0
P69	3,7	40,3	P141	2,3	CH
P74	17,6	17,8	P143	3,5	6,7
P84	3,5	3,0	P144	8,1	8,6

ND=nedetekováno, CH=chybějící vzorek (nepodařilo se izolovat RNA)

Tabulka 11: Expres ABCC1 u pacientek s rakovinou prsu normalizovaná vůči kontrolnímu genu PPIA

Vzorky	ABCC1/PPIA/ ng celk. RNA v nádoru	ABCC1/PPIA/ ng celkové RNA	Vzorky	ABCC1/PPIA/ ng celk. RNA v nádoru	ABCC1/PPIA/ ng celkové RNA
P17	20,3	13,0	P85	84,4	97,6
P31	33,9	9,1	P90	1,1	CH
P32	54,6	28,3	P95	97,1	69,5
P33	21,5	36,5	P96	94,3	72,3
P39	38,7	36,2	P97	35,7	18,3
P40	53,9	17,0	P102	102,2	109,9
P42	70,8	19,3	P107	128,7	108,9
P43	34,9	20,0	P109	102,4	124,4
P45	17,4	13,9	P113	36,9	79,4
P47	23,5	CH	P117	14,5	14,0
P52	35,1	26,2	P118	31,6	41,2
P55	40,4	CH	P126	13,6	15,8
P57	35,0	16,8	P129	5,4	CH
P58	21,7	11,9	P131	19,7	16,7
P62	6,5	6,4	P132	1,9	CH
P67	10,1	12,0	P133	23,0	25,1
P68	ND	CH	P134	25,7	14,4
P69	14,0	23,6	P141	3,7	CH
P74	20,7	18,2	P143	11,8	22,7
P84	111,7	107,1	P144	14,5	12,8

ND=nedetekováno, CH=chybějící vzorek (nepodařilo se izolovat RNA)

Tabulka 12: Exprese ABCC2 u pacientek s rakovinou prsu normalizovaná vůči kontrolnímu genu

PPIA

Vzorky	ABCC2/PPIA/ ng celk. RNA v nádoru	ABCC2/PPIA/ ng celk. RNA ve zdravé tkáni	Vzorky	ABCC2/PPIA/ ng celk. RNA v nádoru	ABCC2/PPIA/ ng celk. RNA ve zdravé tkáni
P17	45,2	34,9	P85	0,21	0,52
P31	11,8	126,5	P90	0,13	CH
P32	7,0	9,2	P95	1,5	0,43
P33	1,5	272,2	P96	0,49	0,54
P39	48,8	9,2	P97	0,13	0,18
P40	13,0	13,4	P102	0,43	0,60
P42	3,8	22,0	P107	0,69	0,31
P43	21,7	6,4	P109	0,24	0,42
P45	1,7	ND	P113	0,41	1,8
P47	3,4	CH	P117	0,26	0,68
P52	11,0	33,1	P118	0,62	0,51
P55	8,8	CH	P126	0,56	0,52
P57	4,7	5,7	P129	0,32	CH
P58	9,3	11,3	P131	0,39	0,33
P62	16,2	4,8	P132	0,11	CH
P67	7,8	8,7	P133	0,50	0,61
P68	ND	CH	P134	0,31	0,77
P69	7,6	14,5	P141	0,10	CH
P74	26,4	36,1	P143	0,20	0,43
P84	0,16	0,26	P144	0,34	0,40

ND=nedetekováno, CH=chybějící vzorek (nepodařilo se izolovat RNA)

5.6 Genotypizace ABCC1

Gen ABCC1 byl vzhledem ke své míře exprese u sledovaných pacientek s diagnózou karcinomu prsu vybrán pro sledování jeho genetické variability. Na základě literárních údajů a frekvencí výskytu SNP v bělošské populaci byly vybrány ke studiu polymorfismy uvedené v tabulce č. 13:

Tabulka č. 13: Studované polymorfismy

Úsek genu	SNP ID	Frekvence (bělošská populace)	Funkce	Alela (C,T,G,A)	Vliv na AMK sekvenci
exon 9	rs35587	31,9% (Wang a kol. [118]) 28,3% (HapMap)	syn*	1062T>C	Asn354Asn
exon 10	rs60782127	1,4% (Wang a kol. [118]) 1,7% (HapMap)	nesyn**	1299G>T	Arg433Ser
exon 16	rs45511401	2,8% (Wang a kol. [118]) 4,2% (HapMap)	nesyn	2012G>T	Gly671Val

*synonymní SNP – AMK se nezmění

**nesynonymní SNP – vede k záměně AMK

Pro stanovení polymorfismů byla použita metoda přímé sekvenace DNA. Pro stanovení SNP rs35587 s vysokou frekvencí výskytu ve sledovaném souboru byla navíc zavedena metoda rychlého skrininku tohoto polymorfismu a to pomocí real-time PCR s využitím fluorescenčních sond.

5.7 Stanovení SNP pomocí sekvenace

Nejprve byly pomocí PCR reakcí připraveny požadované úseky DNA o přibližně 600 bp, jak shrnuje tabulka č. 14 na následující straně. V této tabulce je i přehled použitých primerů, které byly převzaty z publikace Wang a kol. [118]. Podařilo se optimalizovat PCR reakci vedoucí k amplifikaci námi požadovaného úseku DNA, a to bez nespecifických PCR produktů, které by značně ztížily sekvenaci. Výsledné optimalizované podmínky jsou uvedeny v tabulce č. 15 na následující straně.

Tabulka č. 14: Přehled primerů potřebných pro amplifikaci a délka amplifikovaných úseků

ABCC1 SNP	Primery (f=forward, r=reverse)	Velikost amplif. úseku
rs35587 1062T>C exon 9	f: 5'CGTGTTCCCTATGCAATTC r: 5'CCTGCCACCTAAGGTCAC	602
rs60782127 1299G>T exon 10	f: 5'TCCTGGGCAGACAGATAG r: 5'TGAACCACAGCCGGAAC	439
rs45511401 2012G>T exon 16	f: 5'GTTTAGTACAGTCTTGCTT r: 5'CCAAAATCCTGCCTTCTAG	463

Tabulka č. 15: Optimalizované podmínky PCR reakcí amplifikujících produkty pro sekvenci.

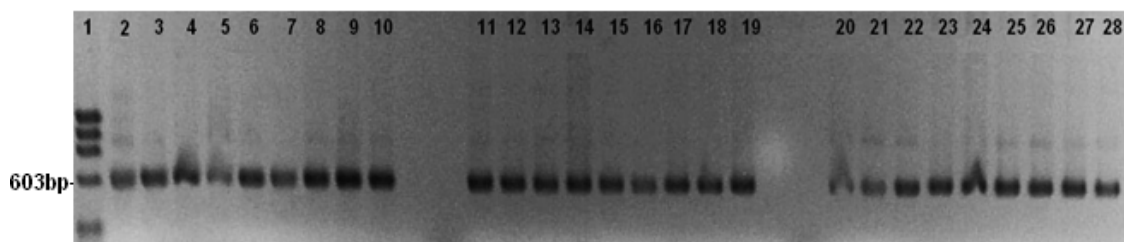
ABCC1 SNP	Složení reakční směsi (hodnoty udány v µl) v celkovém objemu 10 µl							PCR program
	PCR voda	Pufř	MgCl ₂	10x dNTP	10 uM Primery f + r	1U/µl Taq polymerasa	DNA templát	
rs35587 1062T>C exon 9	4,7	1*	1 (14 mM)	0,8	0,25 + 0,25	1	1	B
rs60782127 1299G>T exon 10	4,2	1**	1 (8 mM)	0,8	0,5 + 0,5	1	1	A
rs45511401 2012G>T exon 16	4,2	1**	1 (8 mM)	0,8	0,5 + 0,5	1	1	A

*použit 10x pufř Blue pufř bez Mg⁺² (750 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20)

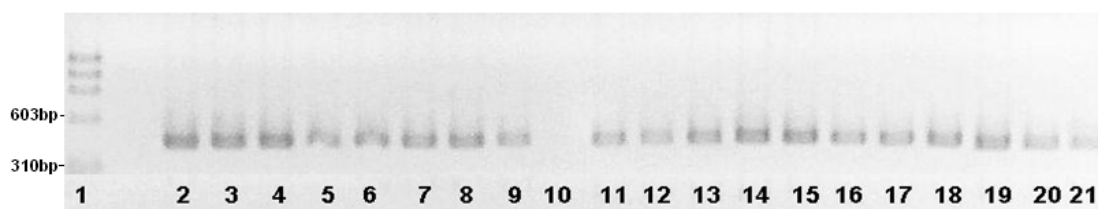
** použit 10x pufř TaqMan pufř bez Mg⁺² (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0 při 25°C), 1% Triton X-100)

U vzorku 43, narozdíl od ostatních vzorků, nebyl při daných podmínkách požadovaný úsek genu v exonech 10 a 16 amplifikován. S tímto vzorkem byly provedeny další PCR reakce za různých podmínek a amplifikace čistého PCR produktu byla zjištěna při koncentraci MgCl₂ 16 mM namísto obvykle používaných 8 mM. Ostatní podmínky reakce zůstaly stejné.

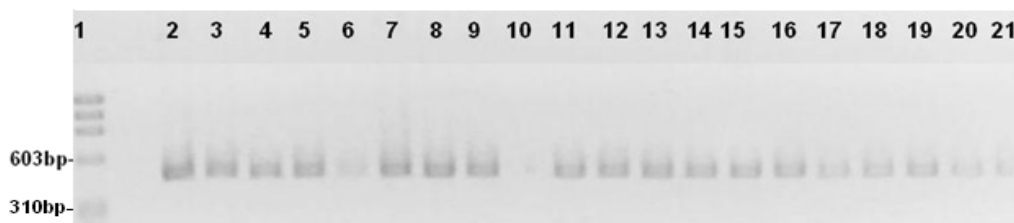
Byly použity PCR programy uvedené v kapitole 4.4.10.2 na straně 64, pouze u programu A byly upraveny teploty, a to z 62-52°C na 65-55°C. Pro ověření amplifikace specifického PCR produktu jsme pomocí elektroforézy v 2% agarosovém gelu vizualizovali vzniklý PCR produkt, jako marker byl použit θ X174. Výsledky jsou na obrázcích 15-18.



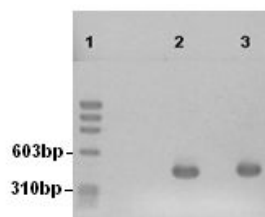
Obrázek č. 15: Poslední krok optimalizace amplifikace úseku exonu 9 genu ABCC1: komínek 1 - marker θ X174, komínky 2-10 - 11 mM MgCl₂ a 0,5 µl primer, komínky 11-19 - 14 mM MgCl₂ a 0,25 µl primer (optimální), komínky 20-28 - 16 mM MgCl₂ a 0,25 µl primery



Obrázek č. 16: Výsledná elektroforéza po optimalizované PCR reakci amplifikující úsek exonu 10 genu ABCC, komínek 1 - marker θ X174, komínky 2-21 - vzorky, komínek 10 - vzorek P43

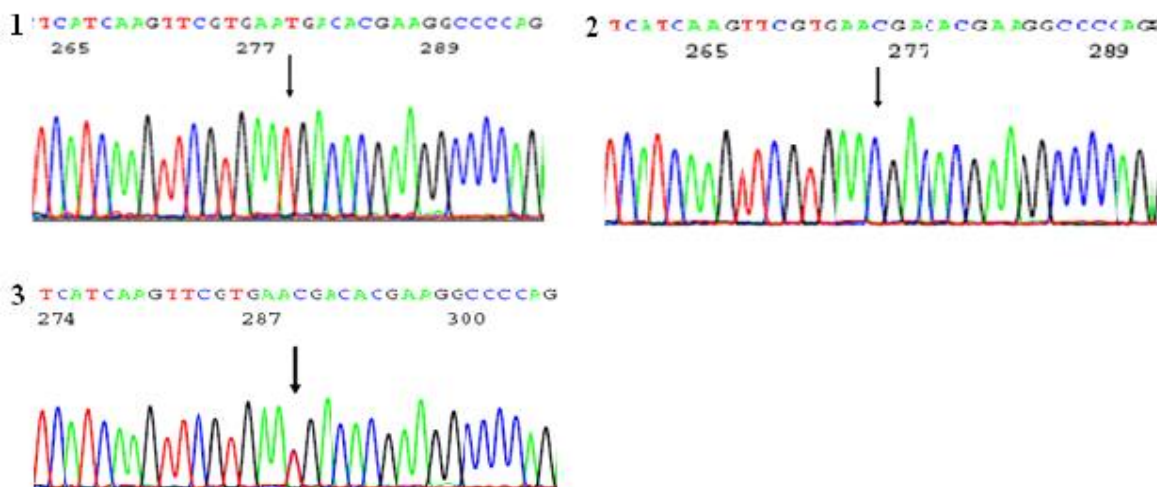


Obrázek č. 17: Výsledná elektroforéza po optimalizované PCR reakci amplifikující úsek exonu 16 genu ABCC1, komínek 1 - marker θ X174, komínky 2-21 - vzorky, 10-vzorek P43

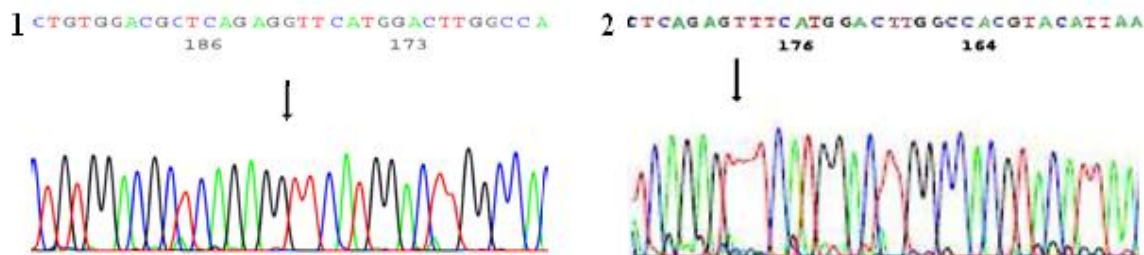


Obrázek č. 18: PCR amplifikace úseku exonu 10 a 16 genu ABCC1, komínek 1 - marker θ X174, komínek 2 - vzorek P43 exon 10, komínek 3 - vzorek P43 exon 16

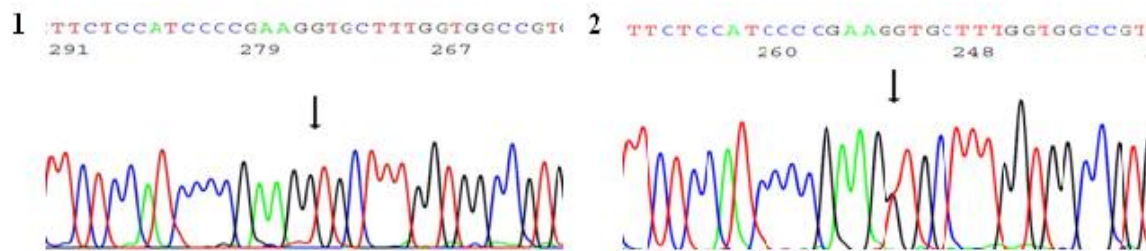
Specifické PCR produkty byly použity k sekvenační PCR reakci provedené pomocí kitu BigDye Terminator Sequencing Kit. PCR produkt této reakce jsme purifikovali ethanolovou precipitací a rozpustili v 10 µl deionizovaného formamidu. Poté jsme ho nechali zdenaturovat v thermocykleru (5 min, 94°C). Takto připravený čistý sekvenační produkt teprve mohl být chromatograficky rozdělen v kapilárním sekvenátoru ABI 310. Nejprve byly kontrolně osekvenovány 2 vzorky, do jedné reakce u obou vzorků byl použit forward primer a do druhé reverse primer. Dle výsledku této sekvenace byly zbylé vzorky sekvenovány buď s forward primerem či s reverse primerem, konkrétně úsek exonu 10 byl sekvenován s reverse primerem, úsek exonu 16 s reverse primerem a úsek exonu 9 též s reverse primerem. Výsledek sekvenace exonu 9 byl ověřen pomocí sekvenace s forward primerem. Ukázky chromatogramů ze sekvenátoru ukazují obrázky 19-21 na této a následující straně. Sekvenací byly získány výsledky uvedené v tabulce č. 16 na následující straně.



Obrázek č. 19: Sekvenace exonu 9 SNP rs35587: 1 - homozygot TT, vzorek P62; 2 - homozygot CC, vzorek P31; 3 - heterozygot CT, vzorek P57



Obrázek č. 20: Sekvenace exonu 10 SNP rs60782127: 1 - homozygot GG, vzorek P32; 2 - homozygot TT, vzorek P55; heterozygot GT nebyl v našem souboru detekován



Obrázek č. 21: Sekvence exonu 16 SNP rs45511401: 1 - homozygot GG, vzorek P74; 2 - heterozygot GT, vzorek P31; homozygot TT nebyl v našem souboru detekován

Tabulka č. 16: Výsledky stanovení SNP v exonech 9, 10 a 16

Vzorek č.	Exon 9, rs35587, 1062T>C	Exon 10, rs60782127, 1299G>T	Exon 16, rs45511401, 2012G>T
P17	CC	GG	GG
P31	CC	GG	GT
P32	TC	GG	GG
P33	TC	GG	GG
P39	TT	GG	GG
P40	TT	GG	GG
P42	TC	GG	GG
P43	TT	GG	GG
P45	TC	GG	ND*
P47	CC	GG	GG
P52	TT	GG	GG
P55	TT	TT	GG
P57	TC	GG	GG
P58	TT	GG	GG
P62	TT	GG	GG
P67	TC	GG	GG
P68	TT	GG	ND
P69	TC	GG	GT
P74	TT	GG	GG

*ND=nedetekováno

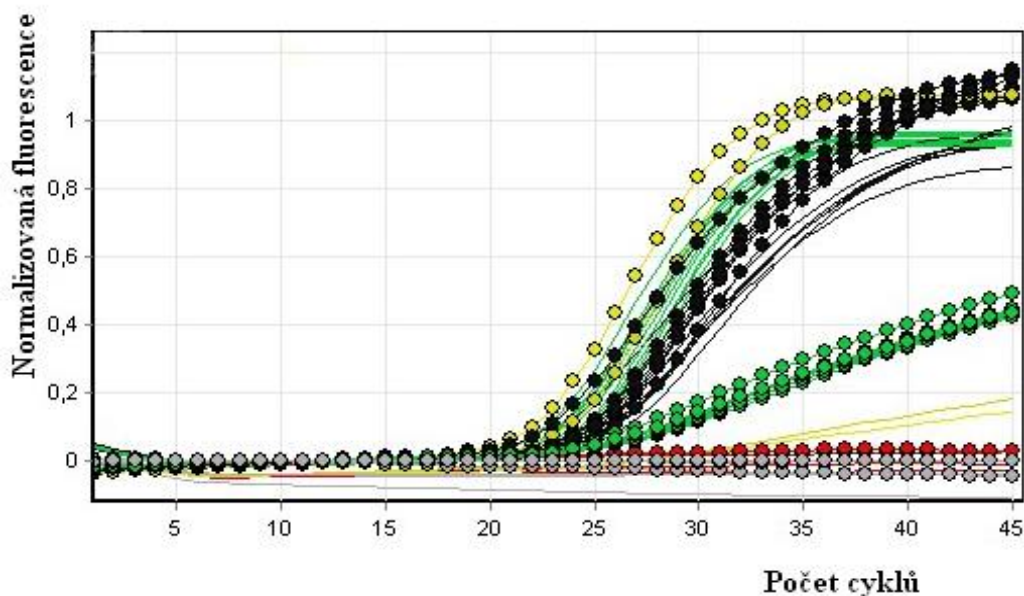
Získaná data byla zpracována a byly vyhodnoceny poměry genotypů a frekvence alel u ABCC1. Vyhodnocení je prezentováno v tabulce č. 17 na následující straně.

Tabulka č. 17: Rozložení genotypu ABCC1 a frekvence alel

SNP	Genotyp	Počet vzorků/%	Alela	Frekvence alely
Exon 9, rs35587,1062T>C	TT	9/47,4%	T	65,8%
	TC	7/36,8%	C	34,2%
	CC	3/15,8%		
Exon 10, rs60782127, 1299G>T	GG	18/94,7%	G	94,7%
	TT	1/5,3%	T	5,3%
Exon 16, rs45511401, 2012G>T	GG	15/88,2%	G	94,1%
	GT	2/11,8%	T	5,9%

5.8 Stanovení SNP pomocí real-time PCR

SNP v exonu 9 1062T>C genu ABCC1 byl stanoven rovněž s využitím pomocí TaqMan® Drug Genotyping Assay (C_1003676_1_). V reakci byly použity dvě



Obrázek č. 22: Záznam real-time PCR reakce stanovení SNP rs 35587 v exonu 9 1062T>C ; kolečka fluorescence označují záznam fluorochromu VIC, bez značek je značena fluorescence fluorochromu FAM. Záznamy genotypů: zeleně divoký typ, žlutě variantní typ, černě heterozygot

fluorescenčně značené sondy pomocí VIC® a FAM™ každá sekvenčně specifická pro jednu variantu sledovaného SNP. V průběhu real-time PCR byla detekována fluorescence, která nám určila jaký SNP je v amplifikovaném úseku (detekce fluorescence pouze fluorochromu FAM™ = divoký homozygot TT, detekce fluorescence pouze fluorochromu

VIC[®] = variantní genotyp CC, detekce obou fluorochromů = heterozygot TC). Reakce byla provedena dle doporučených pokynů výrobce a optimalizována dle citlivosti signálu jednotlivých fluorochromů. Pomocí programu RotorGene 6000 série verze 1.7 bylo nejprve manuálně vyhodnoceno, zda je či není ve vzorku přítomen SNP, poté pro ověření bylo provedeno i vyhodnocení pomocí programu. Záznam real-time PCR je znázorněn na obrázku č. 22 na předchozí straně a výsledky stanovení SNP genu ABCC1 v exonu 9 rs35587 jsou shrnuty v tabulce č. 18. Uvedené genotypy stanovené pomocí TaqMan značených sond se stoprocentně shodují s genotypy stanovenými sekvenací.

Tabulka č. 18: Výsledky stanovení SNP v exonu 9 (1062T>C) pomocí real-time PCR

Vzorek	Genotyp - exon 9, rs35587, 1062T>C
P17	CC
P31	CC
P32	TC
P33	TC
P39	TT
P40	TT
P42	TC
P43	TT
P45	TC
P47	CC
P52	TT
P55	TT
P57	TC
P58	TT
P62	TT
P67	TC
P68	TT
P69	TC
P74	TT

5.9 Statistické vyhodnocení výsledků

Při statistickém hodnocení získaných dat byly hodnoceny vztahy mezi expresí sledovaných genů v nádorové a nenádorové tkáni pacientek s klinicko-patologickými daty. Dále byl sledován vztah mezi genotypem genu ABCC1 a klinicko-patologickými informacemi a konečně byla hodnocena rovněž možná korelace mezi expresí a genotypem genu ABCC1 na základě stanovených genetických polymorfismů. Ke statistickému hodnocení byly použity testy uvedené v praktické části.

5.9.1 Vztahy mezi expresí v nádorové a nenádorové tkáni pacientek a klinicko-patologickými daty

U sledovaného souboru pacientek byla statisticky porovnána genová exprese v buňkách nádorových a v buňkách zdravé tkáně všech tří sledovaných ABC transportérů. Hladina významnosti ukazovala statisticky významný rozdíl u exprese ABCC1 a ABCC2. Zatímco průměrná exprese ABCC1 byla vyšší v nádorové tkáni, u ABCC2 tomu bylo právě naopak, jak můžeme vidět v tabulce č. 19 a 21.

Tabulka č. 19: Exprese ABCB1 v nádorové a nenádorové tkáni

Tumor	Počet vzorků	Průměr	SO	Minimum	Maximum	p*
ABCB1/PPIA/ng celk. RNA	33	8,22	8,34	0,41	39,10	0,732
Zdravá tkáň						
ABCB1/PPIA/ng celk. RNA	33	12,17	10,35	1,61	40,31	

*p=hladina významnosti pro rozdíl mezi průměrnou expresí v nádoru a zdravé tkáni (Friedmanův test).

Tabulka č. 20: Exprese ABCC1 v nádorové a nenádorové tkáni

Tumor	Počet vzorků	Průměr	SO	Minimum	Maximum	p*
ABCC1/PPIA/ng celk. RNA	33	42,82	34,39	6,45	128,67	0,040
Zdravá tkáň						
ABCC1/PPIA/ng celk. RNA	33	32,24	35,30	6,43	124,44	

*p=hladina významnosti pro rozdíl mezi průměrnou expresí v nádoru a zdravé tkáni (Friedmanův test).

Tabulka č. 21: Exprese ABCC2 v nádorové a nenádorové tkáni

Tumor	Počet vzorků	Průměr	SO	Minimum	Maximum	p*
ABCC2/PPIA/ng celk. RNA	32	7,90	12,28	0,13	48,84	0,024
Zdravá tkáň						
ABCC2/PPIA/ng celk. RNA	32	18,83	51,05	0,18	272,22	

*p=hladina významnosti pro rozdíl mezi průměrnou expresí v nádoru a zdravé tkáni (Friedmanův test)

Nalezli jsme významně vyšší expresi ABCB1 ve zdravé tkáni pacientek s histologickým stupněm nádoru 2 a 3 a rovněž významně vyšší expresi ABCC1 v nádorové tkáni pacientek s pokročilým onemocněním charakterizovaným vyšším stádiem SIII eventuálně větší velikosti nádoru oproti pacientkám v lokálně pokročilých stádiích SI nebo SII s menšími nádory (viz. tabulka č. 22). Dále jsme našli významné vztahy mezi expresí ABCC2 ve zdravé tkáni a přítomností receptorů pro estrogen, postižením lymfatických uzlin a souvislost exprese ABCC2 se stádiem nádoru po chemoterapii, tj. nepřímo s účinkem neoadjuvantní chemoterapie.

Tabulka č. 22: Významné korelace mezi klinicko-patologickými faktory a expresí ABCB1, ABCC1 a ABCC2

Gen a typ tkáně	Klinická charakteristika	Počet vzorků	Průměrná exprese±SO	p*
	G (histologický stupeň tumoru)			
ABCB1/PPIA/ng celk. RNA (zdravá tkáň)	G1	3	3,34±2,54	0,044
	G2	15	16,16±12,72	
	G3	10	12,20±7,80	
	T (velikost tumoru)			
ABCC1/PPIA/ng celk. RNA (tumor)	T1 nebo T2	24	29,07±5,93	0,036
	T3 nebo T4	11	35,73±10,77	
	S (stádium před chemoterapií)			
ABCC1/PPIA/ng celk. RNA (tumor)	SI nebo SII	21	29,90±31,11	0,022
	SIII nebo SIV	14	48,97±32,71	
	N (postižení uzlin)			
ABCC2/PPIA/ng celk. RNA (zdravá tkáň)	N0	11	35,93±79,24	0,039
	N1 až N3	19	11,84±29,29	
	Receptor pro estrogen			
ABCC2/PPIA/ng celk. RNA (zdravá tkáň)	negativní	7	53,27±97,71	0,030
	pozitivní	25	9,93±25,39	
	pS (stádium po chemoterapii)			
ABCC2/PPIA/ng celk. RNA (zdravá tkáň)	SI nebo SII	26	23,78±56,70	0,007
	SIII nebo SIV	5	0,42±0,21	

*p=hladina významnosti pro rozdíl mezi průměrnou expresí v nádoru a zdravé tkáni (Kruskal-Wallisův nebo Mann-Whitney test)

5.9.2 Významné vztahy mezi genotypem pacientek a klinicko-patologickými daty

Byl nalezen vztah mezi výskytem polymorfismu v exonu 9 ABCC1 a pokročilostí onemocnění vyjádřenou buď klinickým stádiem S nebo velikostí nádoru T. Oba vztahy byly na hranici významnosti (viz. tabulka č. 23).

Tabulka č. 23: Korelace mezi genotypem ABCC1 v exonu 9 a klinicko-patologickými daty pacientek

Genotyp ABCC1 exon 9, rs35587	T1 nebo T2 počet vzorků (%)	T3 nebo T4 počet vzorků (%)	p*
TT	7 (87,5%)	3 (33,3%)	0,050
TC	1 (12,5%)	6 (66,7%)	
	SI nebo SII počet vzorků (%)	SIII počet vzorků (%)	0,057
TT	6 (85,7%)	4 (30,8%)	
TC nebo CC	1 (14,3%)	9 (69,2%)	

*p=hladina významnosti pro rozdíl mezi průměrnou expresí v nádoru a zdravé tkáni (Pearsonův chi-kvadrát test)

5.9.3 Významné vztahy mezi genotypem pacientek a expresí

Pomocí statistického vyhodnocení byla nalezena významně nižší exprese ABCB1 i ABCC2 v nádoru heterozygotních nosiček sledovaného polymorfismu v exonu 9 ABCC1 oproti homozygotním nosičkám buď divokého či variantního genotypu (viz. tabulka č. 24).

Tabulka č. 24: Korelace genotypu ABCC1 s expresí ABCB1, ABCC1 a ABCC2 v nádorové tkáni

Exon 9, rs35587	Genotyp	Počet vzorků	Průměrná hodnota exprese \pm SO	p*
ABCB1/PPIA/ ng celk. RNA	TT	9	14,88 \pm 8,37	0,020
	TC	7	3,52 \pm 3,22	
	CC	3	16,06 \pm 20,24	
ABCC1/PPIA/ ng celk. RNA	TT	9	30,08 \pm 14,34	0,877
	TC	7	31,90 \pm 22,91	
	CC	3	25,90 \pm 7,13	
ABCC2/PPIA/ ng celk. RNA	TT	9	19,15 \pm 12,56	0,006
	TC	7	4,89 \pm 2,69	
	CC	3	20,16 \pm 22,13	

*p=hladina významnosti pro rozdíl mezi průměrnou expresí v nádoru a zdravé tkáni (Kruskal-Wallisův nebo Mann-Whitney test)

6 Diskuze

V předkládané diplomové práci jsme sledovali soubor 40 pacientek s histologicky potvrzenou diagnózou karcinomu prsu. U všech pacientek zařazených do studie byly sledovány následující údaje: věk v době diagnózy, velikost nádoru, stav menopauzy a dále klinicko-patologická data jako stadium nádoru před a po chemoterapii, histologický typ a stupeň nádoru, stav uzlin a exprese receptorů pro estrogen a progesteron. Klinicko-patologické charakteristiky sledovaného souboru pacientek jsou uvedeny v tabulce č. 8 na straně 67. V celém souboru pacientek byl též sledován typ aplikované chemoterapie. Pacientky podstoupily buď léčbu založenou na anthracyklinech, taxanech či jejich kombinaci.

Sledovaný soubor pacientek se od obvykle studovaných souborů lišil v tom, že všechny pacientky ze sledovaného souboru podstoupily neoadjuvantní chemoterapii (chemoterapii před provedením operace směřující ke zmenšení nádoru). Práce byla součástí širšího výzkumného záměru posoudit možnost volby této chemoterapie na základě expresního profilu ABC transportérů, které používaná cytostatika transportují mimo nádorové buňky.

6.1 Stanovení genové exprese ABC transportérů (ABCB1, ABCC1, ABCC2)

Jedním z hlavních cílů diplomové práce bylo studium exprese vybraných ABC transportérů na úrovni mRNA pomocí real-time PCR s absolutní kvantifikací. ABC transportéry hrají důležitou roli v rozvoji mnohočetné lékové resistance nádorových buněk vůči působení protinádorových léčiv [188, 50]. Fenotyp resistance často koreluje s vysokými hladinami ABC transportního proteinu ABCB1 [189, 190], který je také nejvíce studován. Gen pro ABCB1 již byl v karcinomech prsu detekován [123, 189], nicméně vztah jeho exprese s klinicko-patologickými charakteristikami pacientek je značně rozdílný, jak shrnuje Leonessa a Clarke [190], a proto byl v našem souboru detailně sledován. Dalším ABC transportérem souvisejícím se vznikem resistance nádorových buněk vůči léčivům je protein ABCC1. Jeho zvýšená hladina byla detekována u řady hematologických i solidních nádorů včetně karcinomu prsu [153, 152] ovšem jeho role ve farmakogenetice karcinomu prsu dosud není objasněna [138]. Podobně protein ABCC2 byl

v rakovinných buňkách detekován, nicméně jeho potenciální role v rozvoji nádorového procesu a odpovědi na terapii není známa [184]. V rámci diplomové práce jsme úspěšně izolovali RNA ze 17 vzorků nádorové a nenádorové tkáně prsu, které jsme měli k dispozici. U 4 dalších vzorků se nám pak nepodařilo izolovat RNA z nádorové tkáně. Z izolované RNA jsme úspěšně syntetizovali cDNA, čímž jsme splnili první vytyčené cíle naší práce. Ze vzorků tkáně se nám též podařilo izolovat DNA, která bude v budoucnu použita v rámci studie methylačního stavu vybraných genů. Do studie bylo dále zařazeno 19 vzorků, ze kterých, v rámci pilotní studie, RNA a DNA izolovala a cDNA syntetizovala RNDr. Radka Václavíková, PhD.. U všech výše uvedených vzorků byly stanoveny exprese genů tří ABC transportérů – ABCB1, ABCC1 a ABCC2, jejichž normalizace byla provedena na počet kopií genu PPIA (viz. tabulky 10-12 na stranách 75-76). Expese všech těchto genů byla detekována pomocí real-time PCR jak u nádorové tkáně, tak u nenádorové tkáně. Expese byla detekována ve všech vzorcích, až na expresi ABCC2 ve vzorku P45 u zdravé tkáně, což bylo pravděpodobně způsobeno chybou pipetování, a expese všech tří transportérů u vzorku P68, u něhož byla nemožnost detekce způsobena malým množstvím syntetizované cDNA zapříčiněným degradací RNA. Byly nalezeny významné rozdíly mezi hladinami expresí v nádorové a nenádorové tkáni u transportérů ABCC1 a ABCC2. Expese ABCC1 byla vyšší v nádorové tkáni. Expese ABCC2 byla naopak vyšší u vzorků nenádorové tkáně. Expese všech tří transportérů je současně doprovázena značnou interindividuální variabilitou (viz. tabulky 19-21 na straně 84), což ve své práci u ABCB1 zjistila i Václavíková a kol. [189], která studovala mRNA expresi ABCB1 u pacientů léčených neadjuvantně i neléčených před chirurgickým zákrokem. Velké interindividuální rozdíly hladin exprese pozoroval i Burger a kol. [191], kteří stanovovali expese ABCB1, ABCC1 a ABCC2 u 59 pacientů s primárně operabilními nádory pomocí real-time PCR, ovšem pouze metodou relativní kvantifikace genové exprese.

Jedním z cílů práce bylo vysledovat, zda expese ABC genů souvisí s klinickými daty pacientek, které se používají pro stanovení prognózy pacientek a některé faktory rovněž i k predikci nejúčinnější chemoterapie. Naměřená data byla vyhodnocena Kruskal-Wallisovým testem a byly zjištěny významné korelace expresí sledovaných genů s některými klinicko-patologickými daty (viz. tabulka č. 22 na straně 85). Byl zaznamenán významný vztah mezi expresí ABCB1 ve zdravé tkáni a histologickým stupněm nádoru pacientek. V některých studiích nebyl zjištěn významný vztah expese ABCB1 a histologickým stupněm nádoru, např. Dexter a kol. [53] studoval primární nádory prsu

pomocí real-time PCR. Ferrero a kol. [192] zjistil mírnou spojitost mezi expresí ABCB1 a histologickým stupněm, podobně jako Beck a kol. [193], a to zvýšení exprese u nádorů prvního stupně. Oproti tomu v další studii [194] byla pozorována negativní korelace mezi expresí proteinu ABCB1 stanovované pomocí imunohistochemických metod a stupněm nádoru u slovenských pacientek (n=87) s rakovinou prsu. Autoři navrhli, že negativní korelace mezi histologickým stupněm malignity nádorů a expresí ABCB1 naznačuje možný vliv progresivní dediferenciace nádorových buněk. Naše výsledky naznačují nižší expresi ABCB1 v nenádorové tkáni, která obvykle není autory důkladně sledována, u pacientek s G1 oproti pacientkám s G2 nebo G3 (tedy jinými slovy méně diferencovaným nádorům). Je třeba však zdůraznit, že v naší studii byly jen 3 pacientky s dobře diferencovaným nádorem (G1), což je poměrně málo a je třeba výsledek validovat na větším souboru. V literatuře je toto zjištění v souvislosti s nenádorovou tkání unikátní.

U exprese ABCC1 jsme zaznamenali korelaci mezi velikostí tumoru (T) a hladinou exprese ABCC1 v nádorových buňkách. Zaznamenali jsme rovněž významně nižší expresi ABCC1 v nádorové tkáni pacientek s lokálním postižením (stádium I nebo II) oproti pacientkám s pokročilejšími nádory (stádium III). Hodnota velikosti nádoru T je jednou z komponent určujících stádium (spolu s N a M) a proto je tato korelace analogická nalezené korelaci exprese ABCC1 s T. Významnou souvislost mezi T a imunochemicky stanovenou expresí proteinu ABCC1 pozoroval i Filipits a kol. [41] v primárních nádorech prsu. U 67% pacientek s T3 nebo T4 byla hladina proteinu ABCC1 vysoká, zatímco u pacientek s T1 a T2 to bylo jen v 19%. Ve většině případů nebyla pozorována korelace mezi expresí ABCC1 (ať už proteinu či mRNA) a histologickým stupněm [41, 50, 195, 192]. Ani v naší studii jsme významný vztah mezi těmito daty nezaznamenali. Stejně jako v naší studii nebyl dosud nalezen vztah mezi expresí ABCC1 a klinickými faktory jako věk [50, 153, 195, 196, 197]), stav menopauzy [41, 153] či exprese receptorů pro estrogen a progesteron [197].

V případě ABCC2 byla zjištěna významná korelace mezi expresí ABCC2 v nenádorové tkáni a postižením lymfatických uzlin. Hladina exprese ABCC2 v nenádorové tkáni také významně korelovala s přítomností receptoru pro estrogen. U pacientek s pozitivním receptorem pro estrogen byla nalezena snížená exprese ABCC2. Bylo prokázáno, že expresní hladiny ABCC2 jsou regulovány pomocí hormonů (jak zmiňuji v teoretickém úvodu své práce, viz. strana 46), které jsou vázány právě těmito receptory. Tento vztah by tedy mohl mít vliv na léčbu pacientek. S tím souvisí i fakt, že u ostatních genů tato korelace s přítomností receptoru pro estrogen či progesteron nalezena

nebyla. Nakonec byla nalezena i korelace exprese ABCC2 se stádiem tumoru po chemoterapii v nenádorové tkáni. Významně vyšší expresi ABCC2 měly pacientky se stádiu tumoru po chemoterapii SI nebo SII čili jinými slovy pacientky, u nichž neoadjuvantní chemoterapie fungovala dobře (zmenšením nádoru). Tento důležitý vztah bude třeba ověřit na větším počtu pacientek.

V některých studiích, které sledovaly exprese více ABC transportérů, jsou popisovány koexprese některých z nich, což znamená že v případě zvýšené exprese některého z genů je zvýšena exprese i dalšího genu. Burger a kol. [191] dokonce pozorovali pozitivní korelaci mezi mRNA expresí ABCC1, ABCC2 i ABCB1. Korelace mezi ABCC1 a ABCB1 mRNA expresí byla zjištěna ve dvou studiích [198, 197], avšak v jiné studii [195], stejně jako v naší studii, korelace zjištěna nebyla.

6.2 Genetická variabilita ABCC1

Ve studii genetické variability ABCC1 byly stanoveny tři polymorfismy v kódujících oblastech genu; v exonu 9 - 1062T>C Asn354Asn (rs35587), v exonu 10 - 1299G>T Arg433Ser (rs60782127) a exonu 16 - 2012G>T Gly671Val (rs45511401). Jak zmiňuji v teoretickém úvodu, jako nejčastější záměna byla obecně popsána záměna cytosinu (C) za thymin (T), což lze vysvětlit velmi vysokou incidencí deaminace 5-methylcytosinu na thymin v dinukleotidech CpG, což jsou úseky DNA, ve kterých cytosin sousedí s guaninem a v nichž je cytosin v přibližně 80% methylován [199]. Nosičství divokého genotypu TT v exonu 9 (rs35587) jsme u našich vzorků detekovali v 10 případech z 19. V sedmi případech jsme detekovali heterozygota s alelami TC a ve třech případech homozygota s alelami CC. Zaznamenali jsme tedy 34,2% výskyt variantní alely C. V práci Wanga a kol. [118] je uvedeno, že alela C byla detekována v 31,9% (n=36) a v projektu HapMap CEU (www.hapmap.org) byla u bílé rasy alela C detekována u 28,3% pacientek z 60, což jsou srovnatelná data s našimi. Takto frekventní polymorfismus by mohl být ve vztahu k expresi genu ABCC1 či klinicko-patologickým charakteristikám pacientek.

V naší studii byl nalezen vztah mezi výskytem polymorfismu v exonu 9 ABCC1 a pokročilostí onemocnění vyjádřenou buď klinickým stádiem S nebo velikostí nádoru T. Oba vztahy byly na hranici významnosti (viz. tabulka č. 23 na straně 86) a navíc nebyla zachována dávková závislost (nebyl nalezen vztah k variantnímu genotypu). Z těchto důvodů nelze považovat výsledek za směrodatný a bude jej třeba ověřit na větším souboru.

Dále jsme zkoumali výskyt dvou SNP, které mohou potenciálně poškozovat funkci ABCC1, jelikož způsobují záměny aminokyselin a mají tak potenciální vliv na sekundární či terciální strukturu. Wang a kol. [118] ve své práci naznačuje, že tyto nesynonymní SNP mají v různých populacích četnost nižší než 3%, jelikož jsou v organismu negativně selektovány. První z nich - SNP v exonu 10 (rs60782127, 1299G>T, R433S) substituuje serin za arginin v blízkosti transmembránové domény. Conrad a kol. [112] ho detekoval pouze u 1% bělošské populace. V jiné studii popsal Conrad a kol. [116] vliv tohoto SNP na MDR i na transport organických aniontů (snížení transportu LTC₄ a zvýšení resistance k doxorubicinu). V naší studii jsme zaznamenali výskyt variantní alely pouze u jednoho vzorku, tudíž by bylo potřeba do budoucna stanovit tento SNP u většího počtu vzorků pomocí námi optimalizovaného postupu. Dalším nesynonymním SNP je SNP v exonu 16 (rs45511401, 2012G>T, G671V), který způsobuje záměnu valinu za glycin. Jedná se vysoce konzervovaný glycinový zbytek u ABC transportérů podrodiny C lokalizovaný blízko motivu Walkeru A v nukleotid-vazebné doméně. Tento SNP Conrad a kol. [112] ve studii, kdy byly použity transfekované buňky, detekoval u 2,8% vzorků a ačkoliv nezjistili významný vliv na transport organických aniontů, je podle nich díky poloze tohoto SNP stále možný vliv na MDR. Variantní alely jsme detekovali u dvou vzorků, ty však nijak významné charakteristiky navykazovaly a v budoucnu bude nutné zahrnout do studie většího počtu pacientek. Všechny zmíněné genetické polymorfismy budou dále sledovány v rámci stanovení haplotypu genu ABCC1.

Vybrané genetické polymorfismy ABCC1 jsme stanovovali dvěma metodami, a to pomocí real-time PCR a sekvenace. Dle literatury [80] jsou výhodami sekvenace analýza všech změn primární struktury DNA do velikosti 1000bp v daném úseku. V úseku genu se kromě našich cílových SNP vyskytují i další SNP s nízkými četnostmi výskytu v populaci (konkrétně rs8187863 a rs2301666). Pomocí sekvenační metody bylo možné vyhodnotit, že žádná z pacientek v této studii nebyla jejich nositelkou. Metoda sekvenace je ovšem velmi citlivá na kontaminující DNA. Citlivost na kontaminaci byla důležitým faktorem, a jelikož se zpočátku nedařilo optimalizovat PCR reakci tak, aby vznikal pouze jeden specifický produkt. Pro potvrzení výsledků byla využita metoda real-time PCR. V tomto případě se metoda real-time PCR jevila jako mnohem výhodnější pro práci, díky své v podstatě jednokrokové amplifikaci a detekci SNP. Stanovení SNP pomocí real-time PCR je především velmi rychlé a méně citlivé na kvalitu DNA než sekvenace, nevýhodou real-time PCR metody je pak zejména finanční náročnost. Jelikož vyhodnocení SNP vyšlo oběma metodami shodně, obě metody se zdají být spolehlivé a pro potřeby dalšího

výzkumu vhodné. Během statistických analýz byl zaznamenán významný vztah mezi expresí ABCB1 a ABCC2 v nádorové tkáni a genotypem v exonu 9 genu ABCC1 (viz. tabulka č. 24 na straně 86). Vztah mezi SNP ABCC1 a expresí tohoto genu zaznamenán k našemu překvapení nebyl, stejně tak jako jakýkoliv vztah genotyp-fenotyp v nenádorové tkáni pacientek. Nalezené vztahy byly významné jak pro nosiče heterozygotních genotypů, tak pro nosiče variantních alel, nikoliv však pro nosiče variantního genotypu, resp. nebyla dodržena tzv. dávková závislost, tj. např.: exprese $TT > TC > CC$ nebo naopak. V našem případě to bylo u obou genů $TT > TC < CC$ (viz. tabulka č. 24 na straně 86). Tento fakt si dosud neumíme vysvětlit a může znamenat jak náhodný výsledek (avšak u 2 genů ze 3 sledovaných je to málo pravděpodobné) nebo nějaký další efekt související se stabilitou RNA nebo methylací regulačních úseků DNA v nádorových buňkách. Expresi mohla ovlivnit i přítomnost jiných SNP v přiléhajících oblastech ABCC1 nebo v neanalyzovaných genech. Pouze analýza většího souboru a verifikace na souboru nezávisle získaném (jiná populace) v budoucnu naznačí biologickou relevanci a klinickou využitelnost vztahů zjištěných v této práci. Významné vztahy mezi genotypy v exonech 10 a 16 a expresí ABC genů v nádorové tkáni zaznamenány nebyly.

7 Závěr

V rámci diplomové práce byly úspěšně připraveny standardy pro absolutní kvantifikaci exprese ABC transportérů (ABCB1, ABCC1 a ABCC2) na úrovni mRNA pomocí real-time PCR. Dále byly zavedeny a optimalizovány různé metody studia genetických polymorfismů genu ABCC1 - sekvenace DNA a využití fluorescenčně značených sond identifikujících genotyp pomocí real-time PCR reakce. Zároveň byla úspěšně zavedena metoda izolace DNA z nádorových tkání při současné izolaci RNA, která nám v budoucnu umožní studie přímo s využitím nádorové DNA, např. methylační status ABCC1 či dalších kandidátních genů.

Při studiu genové exprese byla nalezena detekovatelná exprese všech sledovaných ABC transportérů a to v následujícím pořadí; $ABCC1 > ABCB1 = ABCC2$. Tato exprese byla doprovázena značnou interindividuální variabilitou. Exprese ABCB1 se nelišila, avšak exprese ABCC1 byla významně vyšší a ABCC2 nižší v nádorové tkáni oproti kontrolní nenádorové tkáni.

Byla úspěšně sledována genetická variabilita ABCC1 a nalezena 34,2% frekvence výskytu variantní alely polymorfismu v exonu 9 (rs35587). Takto vysoce frekventní polymorfismus v kódujícím úseku genu bude v budoucnu sledován v rozšířeném souboru v rámci stanovení haplotypu ABCC1 a jeho vztahu ke klinicko-patologickým údajům pacientek.

Při sledování vztahů mezi expresí, genotypem a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek byly zjištěny některé významné souvislosti – konkrétně byl zaznamenán významný vztah mezi expresí ABCB1 ve zdravé tkáni a histologickým stupněm nádoru pacientek. U exprese ABCC1 jsme zaznamenali korelaci mezi velikostí tumoru T a hladinou exprese ABCC1 v nádorových buňkách. Zaznamenali jsme rovněž významně nižší expresi ABCC1 v nádorové tkáni pacientek s lokálním postižením (stádium I nebo II) oproti pacientkám s pokročilejšími nádory (stádium III). V případě ABCC2 byla zjištěna významná korelace mezi expresí ABCC2 v nenádorové tkáni a stavem postižení uzlin. Hladina exprese ABCC2 v nenádorové tkáni také významně korelovala s přítomností receptoru pro estrogen. Nakonec byla nalezena korelace exprese ABCC2 se stádiem tumoru po chemoterapii v nenádorové tkáni. Dále byl nalezen vztah na hranici významnosti mezi výskytem polymorfismu v exonu 9 ABCC1 a pokročilostí onemocnění vyjádřenou buď klinickým stádiem S nebo velikostí nádoru T. Během

statistických analýz byl zaznamenán významný vztah mezi expresí ABCB1 a ABCC2 v nádorové tkáni a genotypem v exonu 9 genu ABCC1.

Poznatky získané v rámci předkládané diplomové práce přispívají k rozšíření znalostí o významu genové exprese a genetické variability ABC transportérů jako potenciálních markerů resistance nádorů prsu a jejich souvislosti s klinicko-patologickým průběhem onemocnění. Sledování exprese a variability genu ABCC1 se na základě hodnocení výsledků pilotního souboru pacientek zařazených v rámci předkládané práce jeví jako vhodné pro budoucí detailní studium v rozšířeném souboru a zejména ve vztahu k úspěšnosti klinické léčby karcinomu prsu. Vybrané genetické polymorfismy ABCC1 a v této práci zavedené metody jejich stanovení budou dále použity v rámci studie haplotypu, který by mohl být významným prediktorem rozvoje resistance nádorových buněk.

Na závěr mohu konstatovat, že všechny vytyčené cíle předkládané diplomové práce byly splněny.

Použitá literatura

1. Palácová, M., Petráková, K.: Postgraduální medicína. 3, 62 (2008)
2. Klener, P.: Klinická onkologie. Galén-Karolinum, Praha (2002)
3. Klener, P.: Protinádorová chemoterapie. Galén, Praha (1996)
4. Stiborová, M., Mikšanová, M.: Živa. 4, 146-148 (1999)
5. Stiborová, M.: 1. Multioborový seminář „Otevřená věda“, Praha, Česká Republika (2005)
6. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. a kol.: Úvod do molekulární biologie buňky. Espero publishing, Ústí nad Labem(1998)
7. Rejthar, A., Vojtěšek, B.: Obecná patologie nádorového růstu. Grada Publishing, Praha (2002)
8. Boyle, P., Bernard, L.: World cancer report 2008, IARC press, Lyon (2008)
9. http://www.linkos.cz/pacienti/co_vedet.php?a=1, 23.11.2009
10. Gatěk, J.: Postgraduální medicína. 3, 278 (2010)
11. Čihák, R.: Anatomie III. Grada Avicenum, Praha (1997)
12. Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J. a kol.: Science, 314, 268-274 (2006)
13. Vogel, V.G., Taioli, E., J. Clin. Oncol., 24, 1791-1794 (2006)
14. Foretová, L.: Dědičnost jako rizikový faktor pro vznik nádorů. GAD STUDIO s.r.o., Brno (2001)
15. Ondráčková, A.: Přístrojové vybavení zdravotnických zařízení v roce 2005. ÚZIS ČR, Praha (2006)
16. Chudobová, M.: Demografická situace v České republice v roce 2006. ÚZIS ČR, Praha (2007)
17. Ajmová, J.: Zhoubný novotvar prsu. ÚZIS ČR, Praha (2003)
18. Colditz, G.A., Frazier, A.L.: Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 14, 768-772 (2005)
19. Henderson, B.E., Ross, R.K., Pike, M.C., Casagrande, J.T.: Cancer Res., 42, 3232-3239 (1982)
20. Henderson, B. E., Ross, R. K., Bernstein, L.: Cancer Res., 48, 246-253 (1988)
21. Henderson, B.E., Feigelson, H.S.: Carcinogenesis, 21, 427-433 (2000)
22. Jordan, V.C., Ponder, B.A.J: Breast Cancer Res., 5, 281-283 (2003)
23. Hankinson, S.E., Colditz, G.A., Willett, W.C.: Breast Cancer Res., 6, 213-218 (2004)

24. Petruželka, L., Novotný, J.: Karcinom prsu. Doporučené postupy. ČLS JEP, Praha (2002)
25. Althuis, M.D., Dozier, J. M., Anderson, W. F., Devesa, S. S., Brinton, L. A.: *Int. J. Epidemiology*, 34, 405-412 (2005)
26. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J. a kol.: *CA Cancer J. Clin.*, 59, 225-249 (2009)
27. Abrahámová, J.: Co byste měli vědět o rakovině prsu. Tiskárny Havlíčkův Brod a.s., Havlíčkův Brod (2009)
28. http://www.linkos.cz/pacienti/lecba/f_chemo.php , 13.1.2010
29. http://www.linkos.cz/pacienti/prso_clanek.php?t3=1, 21.3.2010
30. Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál V., Cwiertka, K.: Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I.: Typická MDR. *Klinická onkologie*, 13, 4-9 (2000)
31. Mitscher, L.A., Pillai, S.P., Gentry, E.J., Shankel, D.M.: *Med. Res. Rev.*, 19, 477-496 (1999)
32. Broxterman, H.J., Giaccone, G., Lankelma, J.: *Curr. Opin. Oncol.*, 7, 532-540 (1995)
33. Higgins, C.F., Gottesman, M.M.: *Trends Biochem. Sci.*, 17, 18-21 (1992)
34. Biedler, J.L., Riehm, H.: *Cancer Res.*, 30, 1174-1184 (1970)
35. Ferguson, L.R., De Flora, S.: *Mutat. Res.*, 591, 24-33 (2005)
36. <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>, 5.3.2010
37. Higgins, C.F.: *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8, 67-113 (1992)
38. Klein, I., Sarkadib, B., Váradi, A.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* , 1461, 237-262 (1999)
39. Mao, Q., Unadkat, J.D.: *AAPS J.*, 7, 118-33 (2005)
40. Zhou, S.F., Wang, L.L., Di, Y.M., Xue, C.C., Duan, W. a kol.: *Curr. Med. Chem.*, 15, 1981-2039 (2008)
41. Filipits, M., Suchomel, R. W., Dekan, G., Haider, K., Valdimarsson, G. a kol.: *Clin. Cancer Res.*, 2, 1231-1237 (1996)
42. Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 204, 216-237 (2005)
43. Jones, P.M., George A.M.: *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 682-699 (2004)
44. Vasiliou, V., Vasiliou, K., Nebert, D., W.: *Hum. Genomics*, 3, 281-290 (2009)
45. Štefková, J., Poledne, R., Hubáček, J., A.: *Physiol. Res.*, 53, 235-243 (2004)

46. Juliano, R., L., Ling, V.: *Biophys. Acta*, 455, 152-162 (1976)
47. Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A.: *Physiol. Rev.*, 86, 1179-1236 (2006)
48. Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., Gottesman, M.M.: *Oncogene*, 22, 7468-7485 (2003)
49. Pechandová, K., Buzková, H., Slanař, O., Perlík, F.: *Klin. Biochem. Metab.*, 14, 196–201 (2006)
50. Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E. a kol.: *Science*, 258, 1650-1654 (1992)
51. Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál V., Cwiertka, K.: *Klinická onkologie*, 13, 10-17 (2000)
52. Toshikazu, K., Takuya, E., Keiji, H., Takeshi, U., Takanori, N. a kol.: *J. Biol. Chem.*, 278, 22908-22917 (2003).
53. Dexter, D.W., Reddy, R.K., Geles, K.G., Bansal, S., Myint, M.A. a kol.: *Clin. Cancer Res.*, 4, 1533–1542 (1998)
54. Loe, D.W., Deeley, R.G., Cole, S.P.C.: *Eur. J. Cancer.*, 32, 945-957 (1996)
55. Tusnády, G.E., Bakos, E., Vradi, A., Sarkadi, B.: *FEBS Lett.*, 402, 1-3 (1997)
56. Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Leslie, E.M., Gerlach, J.H., Grant, C.E. a kol.: *J. Biol. Chem.*, 272, 23623-23630 (1997)
57. Hare, J.F.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1031, 71-90 (1990)
58. Ma, L., Krishnamachary, N., Center, M.S.: *Biochemistry*, 34, 3338-3343 (1995)
59. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center/pathway-slides-and/mrp1.html>, 4.3.2010
60. Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, Z., Cole, S.P.C., Deeley, R.G. a kol.: *J. Biol. Chem.*, 269, 27807-27810 (1994)
61. Wijnholds, J., Evers, R., van Leusden, M.R., Mol, C.A., Zaman, G.J. kol.: *Nat. Med.*, 3, 1275-1279 (1997)
62. Loe, D.W., Stewart, R.K., Massey, T.E., Deeley, R.G., Cole, S.P.C.: *Mol. Pharmacol.*, 51, 1034-1041 (1997)
63. de Jong, M.C., Slootstra, J.W., Scheffer, G.L., Schroeijers, A.B., Puijk, W.C. a kol.: *Cancer Res.*, 61, 2552-2557 (2001)
64. Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Fritz, J.M., Meijer, C.J. a kol.: *Cancer Res.*, 54, 4557-4563 (1994)

65. Van Luyn, M.J., Müller, M., Renes, J., Meijer, C., Scheper, R.J. a kol.:
Int. J. Cancer, 76, 55-62 (1998)
66. Loe, D.W., Almquist, K.C., Deeley, R.G., Cole, S.P.C.: J. Biol. Chem., 275,
34165-34172 (1996)
67. Renes, J., de Vries, E.G.E., Nienhuis, E.F., Jansen, P.L.M., Müller, M.:
J. Pharmacol., 126, 681-688 (1999)
68. Renes, J., de Vries, E.G., Jansen, P.L., Müller, M.: Drug Resist. Updat., 3, 289-302
(2000)
69. Buchler, M., König, J., Brom, M., Kartenbeck, J., Spring, H.: J. Biol. Chem., 271,
15091-15098 (1996)
70. Yanase, K., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y.: Cancer Lett., 234, 73–80
(2006)
71. Schinkel, A.H., Jonker, J.W.: Adv. Drug Delivery Rev., 55, 2-29 (2003)
72. König, J., Nies, A.T., Cui, Y., Keppler, D.: ABC Proteins: From Bacteria to Man.
Academic Press, London (2003)
73. Suzuki, H., Sugiyama, Y.: Adv. Drug Delivery Rev., 54, 1311-1331 (2002)
74. Vaidyanathan, J.B., Walle, T.: Pharm. Res., 18, 1420-1425 (2001)
75. Gerck, P.M., Vore, M.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 302, 407-415 (2002)
76. Potschka, H., Fedrowitz, M., Loscher, W.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 306, 124-131
(2003)
77. Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van Eijk, M.J. a kol.: Cancer
Res., 57, 3537–3547 (1997)
78. Sandusky, G.E., Mintze, K.S., Pratt, S.E., Dantzig, A.H.: Histopathology, 41, 65-74
(2002)
79. Cui, Y., König, J., Buchholz, J.K., Spring, H., Leier, I.: Mol. Pharmacol., 55,
929–937 (1999)
80. Slaný, M., Šváchová, H., Hájek, R.: Klinická onkologie, 21, 237-240 (2008)
81. Řehout, V. a kol.: Základy genetiky a poradenství. ZF JU, České Budějovice (2003)
82. <http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/bc-skripta/kapitola09.pdf>,
5.3.2010
83. Huang, Y.: Cancer Metastasis Rev, 26, 183–201 (2007)
84. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E. W., Li, P.W., Mural, R. J. a kol.: Science,
291, 1304-1351 (2001)
85. <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/farmakogenetika.htm>, 16.3.2010

86. <http://www.pharmgkb.org/do/serve?objId=PA267&objCls=Gene>, 16.3.2010
87. Pechandová, K., Buzková, H., Slanař, O., Perlík, F.: *Klin. Biochem. Metab.*, 14, 196-201 (2006)
88. Kafka, A., Sauer, G., Jaeger, C., Grundmann, R., Kreienberg, R. a kol.: *Int. J. Oncol.*, 22, 1117–1121 (2003)
89. Chang, H., Rha, S.Y., Jeung, H.C., Im, C.K., Ahn, J.B. a kol.: *Ann. Oncol.*, 20, 272-277 (2008)
90. Cizmarikova, M., Wagnerova, M., Schonova, L., Habalova, V., Kohut, A. a kol.: *Pharmacogenomics J.*, 10, 62-69 (2009)
91. Stein, U., Walther, W., Shoemaker, R. H.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 122, 275-282 (1996)
92. Rund, D., Azar, I., Shperling, O.: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 475, 71–75 (1999)
93. Illmer, T., Schuler, U. S., Thiede, C., Schwarz, U. I., Kim, R. B. a kol.: *Cancer Res.*, 62, 4955–4962 (2002)
94. Tanabe, M., Ieiri, I., Nagata, N., Inoue, K., Ito, S. a kol.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 297, 1137–1143 (2001)
95. Hitzl, M., Schaeffeler, E., Hocher, B., Slowinski, T., Halle, H. a kol.: *Pharmacogenetics*, 14, 309-318 (2004)
96. Mickley, L.A., Lee, J. S., Weng, Z., Zhan, Z., Alvarez, M. a kol.: *Blood*, 91, 1749-1756 (1998)
97. van den Heuvel-Eibrink, M.M., Wiemer, E. A., de Boevere, M. J., van der Holt, B., Vossebeld, P. J. a kol.: *Blood*, 97, 3605–3611 (2001)
98. Kim, D.H., Park, J. Y., Sohn, S. K., Lee, N. Y., Baek, J. H. a kol.: *Int. J. Cancer*, 118, 2195–2201 (2006)
99. Green, H., Soderkvist, P., Rosenberg, P., Horvath, G., & Peterson, C.: *Clin. Cancer Res.*, 12, 854–859 (2006)
100. Nakamura, T., Sakaeda, T., Horinouchi, M., Tamura, T., Aoyama, N. a kol.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 71, 297–303 (2002)
101. Sai, K., Kaniwa, N., Itoda, M., Saito, Y., Hasegawa, R. a kol.: *Pharmacogenetics*, 13, 741–757 (2003)
102. Hitzl, M., Drescher, S., van der Kuip, H., Schaeffeler, E., Fischer, J. a kol.: *Pharmacogenetics*, 11, 293–298 (2001)
103. Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmoller, J. a kol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 3473–3478 (2000)

104. Stanulla, M., Schaffeler, E., Arens, S., Rathmann, A., Schrauder, A. a kol.: *Int. J. Hematol.*, 81, 39–44 (2005)
105. Bonhomme-Faivre, L., Devocelle, A., Saliba, F., Chatled, S., Maccario, J. a kol.: *Transplantation*, 78, 21–25 (2004)
106. Wu, X., Gu, J., Wu, T.T., Swisher, S.G., Liao, Z. a kol.: *J. Clin. Oncol.*, 24, 3789-3798 (2006)
107. Puisset, F., Chatelut, E., Dalenc, F., Busi, F., Cresteil, T. a kol.: *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 54, 265–272 (2004)
108. Mathijssen, R.H., de Jong, F. A., van Schaik, R. H., Lepper, E. R., Friberg, L. E. a kol.: *J. Nat. Cancer Inst.*, 96, 1585–1592 (2004)
109. Plasschaert, S.L., Groninger, E., Boezen, M., Kema, I., de Vries, E. G. a kol.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 76, 220–229 (2004)
110. Taniguchi, S., Mochida, Y., Uchiumi, T., Tahira, T., Hayashi, K. a kol.: *Mol. Cancer Ther.*, 2, 1351–1359 (2003)
111. Conseil, G., Deeley, R., G., Cole, S., P.: *Pharmacogenet. Genomics*, 15, 523–533 (2005)
112. Conrad, S., Kauffmann, H.M., Ito, K., Deeley, R.G., Cole, S.P. a kol.: *Am. J. Hum. Genet.*, 46, 656–663 (2001)
113. Leslie, E.M., Letourneau, I.J., Deeley, R.G., Cole, S.P.: *Biochemistry*, 42, 5214-5224 (2003)
114. Letourneau, I.J., Deeley, R.G., Cole, S.P.: *Pharmacogenet. Genomics*, 15, 647-657 (2005)
115. Wang, Z., Wang, B., Tang, K., Lee, E.J., Chong, S.S. a kol.: *Hum. Mol. Genet.*, 14, 2075–2087 (2005)
116. Conrad, S., Kauffmann, H.M., Ito, K., Leslie, E.M., Deeley, R.G. a kol.: *Pharmacogenetics*, 12, 321–330 (2002)
117. Wojnowski, L., Kulle, B., Schirmer, M., Schluter, G., Schmidt, A. a kol.: *Circulation*, 112, 3754–3762 (2005)
118. Wang, Z., Sew, P., Ambrose, H., Ryan, S., Chong, S.S. a kol.: *BMC Genomics*, 7, 111-119 (2006)
119. Kartenbeck, J., Leuschner, U., Mayer, R., Keppler, D.: *Hepatology*, 23, 1061–1066 (1996)
120. Tsujii, H., Konig, J., Rost, D., Stockel, B., Leuschner, U. a kol.: *Gastroenterology*, 117, 653–660 (1999)

121. Suzuki, H., Sugiyama, Y.: *Adv. Drug Delivery Rev.*, 54, 1311–1331 (2002)
122. Machida, I., Wakusawa, S., Sanae, F., Hayashi, H., Kusakabe, A. a kol.: *J. Gastroenterol.*, 40, 366–370 (2005)
123. Charpin, C., Vielh, P., Duffaud, F., Devictor, B., Andrac, L. a kol.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 19, 1539-1545 (1994)
124. Itoda, M., Saito, Y., Soyama, A., Saeki, M., Murayama, N. a kol.: *Drug Metab. Dispos.*, 30, 363-364 (2002)
125. Hulot, J.S., Villard, E., Maguy, A., Morel, V., Mir, L. a kol.: *Pharmacogenet. Genomics*, 15, 277–285 (2005)
126. Innocenti, F., Undevia, S.D., Chen, P.X., Das, S., Ramirez, J. a kol.: *Proceedings of ASCO*, 22, 2010 (2004)
127. de Jong, F.A., de Jonge, M.J., Verweij, J., Mathijssen, R.H.: *Cancer Lett.*, 234, 90-106 (2006)
128. Fromm, M.F., Kauffmann, H.M., Fritz, P., Burk, O., Kroemer, H.K. a kol.: *Am. J. Pathol.*, 157, 1575–1580 (2000)
129. Boumendjel, A., Boutonnat, J., Robert, J.: *ABC transporters and multidrug resistance*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey (2009)
130. Park, S., Shimizu, C., Shimoyama, T., Takeda, M., Ando, M. a kol.: *Breast Cancer Res. Treat.*, 99, 9-17 (2006)
131. Juliano, R.L., Ling, V.: *Biochim. Biophys. Acta*, 455, 152–162 (1976)
132. Haimeur, A., Deeley, R.G., Cole, S.P.: *J. Biol. Chem.*, 277, 41326–41333 (2002)
133. Mayer, R., Kartenbeck, J., Büchler, M., Jedlitschky, G., Leier, I. A kol.: *J. Cell Biol.*, 131, 137-150 (1995)
134. Peng, K.C., Cluzeaud, F., Bens, M., Van Huyen, J.P., Wioland, M.A. a kol.: *J. Histochem. Cytochem.*, 47, 757-768 (1999)
135. Pei, Q.L., Kobayashi, Y., Tanaka, Y., Taguchi, Y., Higuchi, K. a kol.: *Hepatol. Res.*, 22, 58-64 (2002)
136. Scheffer, G.L., Kool, M., de Haas, M., de Vree, J.M., Pijnenborg, A.C. a kol.: *Lab. Invest.*, 82, 193-201 (2002)
137. Nies, A.T., Jedlitschky, G., König, J., Herold - Mende, C., Steiner, H.H. a kol.: *Neuroscience*, 129, 349 – 360 (2004)
138. Bakos, E., Homolya, L.: *Pflügers Arch.*, 453, 621-641 (2006)
139. Hirohashi, T., Suzuki, H., Sugiyama, Y.: *J. Biol. Chem.*, 274, 15181 – 15185 (1999)

140. Legrand, O., Simonin, G., Beauchamp-Nicoud, A., Zittoun, R., Marie, J.P.: *Blood*, 94, 1046–1056 (1999)
141. Legrand, O., Zompi, S., Perrot, J.Y., Faussat, A.M., Benderra, Z. a kol.: *Haematologica*, 89, 34–41 (2004)
142. Poulain, S., Lepelley, P., Preudhomme, C., Cambier, N., Cornillon, J. a kol.: *Br. J. Haematol.*, 110, 591–598 (2000)
143. van der Kolk, D.M., de Vries, E.G.E., Noordhoek, L., van den Berg, E., van der Pol, M.A.: *Leukemia*, 15, 1544–1553 (2001)
144. Beck, J.F., Brügger, D., Brischwein, K., Liu, C., Bader, P. a kol.: *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 896–903 (2001)
145. Juszczynski, P., Niewiarowski, W., Krykowski, E., Robak, T., Warzocha, K.: *Leuk. Lymphoma*, 43, 153–158 (2002)
146. Nooter, K., Burger, H., Stoter, G.: *Leuk Lymphoma*, 20, 381–387 (1996)
147. Berger, W., Setinek, U., Hollaus, P., Zidek, T., Steiner, E. a kol.: *Cancer Res. Clin. Oncol.*, 131, 355–363 (2005)
148. Kreisholt, J., Sorensen, M., Jensen, P.B., Nielsen, B.S., Andersen, C.B. a kol.: *Br. J. Cancer.*, 77, 1469–1473 (1998)
149. Nooter, K., Bosman, F.T., Burger, H., van Wingerden, K.E., Flens, M.J. a kol.: *Ann. Oncol.*, 7, 75–81 (1996)
150. Sugawara, I., Yamada, H., Nakamura, H., Sumizawa, T., Akiyama, S. a kol.: *Int. J. Cancer*, 64, 322–325 (1995)
151. Wright, S.R., Boag, A.H., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R., Campling, B.G. a kol.: *Clin. Cancer Res.*, 4, 2279–2289 (1998)
152. Filipits, M., Pohl, G., Rudas, M., Dietze, O., Lax, S. a kol.: *J. Clin. Oncol*, 23, 1161–1168 (2005)
153. Nooter, K., Brutel de la Riviera, G., Look, M.P., van Wingerden, K.E., Henzen-Logmans, S.C. a kol.: *Br. J. Cancer*, 76, 486–493 (1997)
154. Rudas, M., Filipits, M., Taucher, S., Stranzl, T., Steger, G.G. a kol.: *Breast Cancer Res. Treat.*, 81, 149–157 (2003)
155. Sullivan, G.F., Amenta, P.S., Villanueva, J.D., Alvarez, C.J., Yang, J.M. a kol.: *Clin. Cancer Res.*, 4, 1393–1403 (1998)
156. van Brussel, J.P., Mickish, G.H.: *Onkologie*, 26, 175–181 (2003)
157. Alexander, D., Yamamoto, T., Kato, S., Kasai, S.: *Surg Today*, 29, 401–406 (1999)

158. Endo, K., Maehara, Y., Ichiyoshi, Y., Kusumoto, T., Sakaguchi, Y. a kol.: *Cancer*, 77, 1681–1687 (1996)
159. Fillpits, M., Suchomel, R.W., Dekan, G., Stiglbauer, W., Haider, K. a kol.: *Br. J. Cancer*, 75, 208–212 (1997)
160. Takebayashi, Y., Akiyama, S., Natsugoe, S., Hokita, S., Niwa, K. a kol.: *Cancer*, 82, 661–666 (1998)
161. Koshiyama, M., Yoshida, M., Fujii, H., Konishi, M., Nanno, H. a kol.: *Ann. Diagn. Pathol.*, 3, 81–87 (1999)
162. Abe, T., Mori, T., Wakabayashi, Y., Nakagawa, M., Cole, S.P. a kol.: *J. Neurooncol*, 40, 11–18 (1998)
163. Norris, M.D., Bordow, S.B., Haber, P.S., Marshall, G.M., Kavallaris, M. a kol.: *Eur. J. Cancer*, 33, 1911–1916 (1997)
164. Norris, M.D., Bordow, S.B., Marshall, G.M., Haber, P.S., Cohn, S.L. a kol.: *N. Engl. J. Med.*, 334, 231–238 (1996)
165. Chan, H.S., Lu, Y., Grogan, T.M., Haddad, G., Hipfner, D.R. a kol.: *Cancer Res.*, 57, 2325–2330 (1997)
166. Buchler, M., Konig, J., Brom, M., Kartenbeck, J., Spring, H. a kol.: *J. Biol. Chem.*, 271, 15091 – 15098 (1996)
167. Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T., Kawabe, T. a kol.: *Cancer Res.*, 56, 4124 – 4129 (1996)
168. van Kuijck, M.A., van Aubel, R.A., Busch, A.E., Lang, F., Russel, F.G. a kol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 5401 – 5406 (1996)
169. Fritz, F., Chen, J., Hayes, P., Sirotnak, F.M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1492, 531-536 (2000)
170. Conrad, S., Viertelhaus, A., Orzechowski, A., Hoogstraate, J., Gjellan, K. a kol.: *Toxicology*, 156, 81-91 (2001)
171. Keppler, D., Konig, J.: *FASEB J.*, 11, 509 – 516 (1997)
172. Schaub, T.P., Kartenbeck, J., Konig, J., Vogel, O., Witzgall, R. a kol.: *J. Am. Soc. Nephrol.*, 8, 1213-1221 (1997)
173. Schaub, T.P., Kartenbeck, J., Konig, J., Spring, H., Dorsam, J. a kol.: *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10, 1159-1169 (1999)
174. Mottino, A.D., Hoffman, T., Jennes, L., Vore, M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293, 717 – 723 (2000)

175. Rost, D., Mahner, S., Sugiyama, Y., Stremmel, W.: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282, 1203 – 1208 (2002)
176. Rost, D., Konig, J., Weiss, G., Klar, E., Stremmel, W. a kol.: *Gastroenterology*, 121, 1203 – 1208 (2001)
177. Hoffmann, K., Gastens, A.M., Volk, H.A., Loscher, W.: *Epilepsy Res.*, 69, 1 – 14 (2006)
178. Taipalensuu, J., Tornblom, H., Lindberg, G., Einarsson, C., Sjoqvist, F. a kol.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299, 164 – 170 (2001)
179. Oselin, K., Mrozikiewicz, P.M., Pakkla, R., Roots, I.: *Eur. J. Haematol.*, 71, 119-123 (2003)
180. Surowiak, P., Materna, V., Kaplenko, I., Spaczynski, M., Dolinska - Krajewska, B. a kol.: *Clin. Cancer. Res.*, 12, 7149 – 7158 (2006)
181. St - Pierre, M.V., Serrano, M.A., Macias, R.I., Dubs, U. , Hoechli, M. a kol.: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279, 1495-1503 (2000)
182. Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Luquita, M.G., Vore, M., Mottino, A.D. a kol.: *Drug Metab. Dispos.*, 34, 1030-1034 (2006)
183. Cao, J., Huang, L., Liu, Y., Hoffman, T., Stieger, B. a kol.: *Hepatology*, 33, 140-147 (2001)
184. Lage, H.: *Cell Mol. Life Sci.*, 65, 3145-3167 (2008)
185. Hartmannová, H., Chudoba, D., Mrázová, L., Nosková, L., Novotná, D. a kol.: *Sborník textů: Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Praha* (2008)
186. <http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf>, 5.3.2010
187. <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>, 5.3.2010
188. Germann, U.A.: *Eur. J. Cancer*, 32, 927-944 (1996)
189. Gottesman, M.M., Pastan, I.: *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 385-427 (1993)
190. Leonessa, F., Clarke, R.: *Endocr. Relat. Cancer*, 10, 43-73 (2003)
191. Vaclavikova R., Nordgard, S.H., Alnaes, G.I., Hubackova M., Kubala, E. a kol.: *Pharmacogenet. Genomics*, 18, 263-273 (2008)
192. Ferrero, J.M., Etienne, M.C., Formento, J.L., Francoual, M., Rostagno, P. a kol.: *Br. J. Cancer*, 82, 171–177 (2000)
193. Beck, W.T., Grogan T.M., Willman, C.L., Cordon-Cardo, C., Parham, M.D. a kol.: *Cancer Res.*, 56, 3010–3020 (1996)

194. Rybárová, S., Hajduková, M., Hodorová, I., Kočišová, M., Boor, A. a kol.:
Neoplasma, 53, 128-135 (2006)
195. Lacave, R., Coulet, F., Ricci, S., Touboul, E., Flahault, A. a kol.: Br. J. Cancer, 77,
694-702 (1998)
196. Filipits, M., Malayeri, R., Suchomel, R.W., Pohl, G., Stranzl, T. a kol.:
Anticancer Res., 19, 5043–5049 (1999)
197. Kanzaki, A., Toi, M., Nakayama, K., Bando, H., Mutoh, M. a kol.:
Jpn. J. Cancer Res., 92, 452–458 (2001)
198. Beck, J., Bohnet, B., Brügger, D., Bader, P., Dietl, J. a kol.: Br. J. Cancer, 77, 87-91
(1998)
199. Jabbari, K., Bernardi, G.: Gene, 333, 143-149 (2004)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka