

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Antropologie a genetiky člověka



**GENETICKÉ FAKTORY REZISTENCE
VŮČI CHEMOTERAPII A KLINICKÉ CHARAKTERISTIKY
NÁDORŮ PRSU**

GENETIC FACTORS OF RESISTANCE TO CHEMOTHERAPY
AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF BREAST TUMORS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Tereza Kunická

Školitel: RNDr. Pavel Souček, CSc.

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem použila jen prameny uvedené v seznamu literatury. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 26. 8. 2011

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli RNDr. Pavlu Součkovi, Csc. za odborné vedení mé diplomové práce, přátelský přístup, podnětné připomínky a rady. Můj velký dík patří MUDr. Beatrici Mohelníkové-Duchoňové, RNDr. Radce Václavíkové, PhD. a Ing. Ivoně Hlavaté za vedení při laboratorní činnosti, velmi vstřícný přístup a za velké množství cenných rad poskytnutých při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat také všem ostatním členům laboratoře Toxikogenomiky Státního zdravotního ústavu za ochotu a pomoc při řešení problémů.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu lékařů a sester vedenému prim. MUDr. Václavem Pechou z Medicon, a.s. za sběr vzorků a klinicko-patologických dat pacientek. Děkuji také všem pacientkám za udělení jejich informovaného souhlasu se zařazením do studie a tím umožnění samotné studie.

Osobně bych pak ráda poděkovala všem, mé rodině a mým přátelům za psychickou podporu i gramatickou pomoc při sepisování této práce a celkově za podporu při studiu.

Tato práce byla podpořena granty IGA 9799-4, IGA 9803-4, GAČR 301/09/0362.

Obsah

Obsah	3
Seznam použitých zkratek	5
Abstrakt.....	8
1 Úvod.....	10
2 Cíle práce	11
3 Literární přehled	12
3.1 Karcinom prsu.....	12
3.1.1 Výskyt karcinomu prsu	12
3.1.2 Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu.....	14
3.1.3 Klinické příznaky.....	17
3.1.4 Léčba karcinomu prsu.....	21
3.1.4.1 Chemoterapie	22
3.1.4.2 Hormonální léčba.....	23
3.1.4.3 Cílená molekulární léčba	26
3.2 Léková rezistence	27
3.3 ABC transportéry	29
3.3.2 ABCC1 transportér	30
3.2.2.1 Struktura ABCC1.....	32
3.2.2.2 Funkce ABCC1.....	33
3.2.2.3 Genetická variabilita <i>ABCC1</i>	34
3.2.2.4 Exprese <i>ABCC1</i>	37
4 Materiál a metody	39
4.1 Přístroje.....	39
4.2 Chemikálie	40
4.3 Soubor pacientů	41
4.3.1 Klinicko-patologické údaje pacientek	41
4.3.2 Informovaný souhlas pacienta	43
4.4 Izolace RNA z tkáně	43
4.5 Izolace DNA z mezifáze	44
4.6 Izolace DNA z krve	44

4.7	Horizontální elektroforéza na agarózovém gelu.....	45
4.8	Spektrofotometrické stanovení koncentrace.....	45
4.9	Syntéza cDNA	47
4.10	Ověření kvality cDNA pomocí PCR	47
4.11	Relativní kvantifikace genové exprese pomocí rtPCR	48
4.12	Genotypizace <i>ABCC1</i> - stanovení SNPs	52
4.12.1	HRM analýza	52
4.12.2	Sekvenování.....	53
4.13	Statistická analýza.....	57
5	Výsledky	58
5.1	Charakteristika sledovaného souboru pacientek.....	58
5.2	Preamplifikace vzorků cDNA nádorové a nenádorové tkáně a test účinnosti preamplifikace	58
5.3	Výběr referenčních genů.....	60
5.4	Stanovení exprese	62
5.4.1	Hodnocení rozdílů exprese mezi nádorovou a zdravou tkání.....	63
5.5	Genotypizace <i>ABCC1</i>	65
5.5.1	Stanovení SNPs pomocí sekvenace	65
5.5.2	Stanovení SNP rs2889517 pomocí HRM analýzy.....	69
5.5.3	Celkové výsledky genotypizace <i>ABCC1</i>	70
5.6	Výsledky statistických analýz.....	71
5.6.1	Hodnocení rozdílů exprese mezi nádorovou a zdravou tkání.....	72
5.6.2	Korelace exprese <i>ABCC1</i> s klinicko-patologickými daty.....	72
5.6.3	Korelace genotypu <i>ABCC1</i> a klinicko-patologických dat	73
5.6.4	Vztahy mezi genotypem pacientek a expresí <i>ABCC1</i>	73
6	Diskuze	75
6.1	Sledování exprese genu <i>ABCC1</i>	76
6.2	Genetická variabilita <i>ABCC1</i>	77
6.3	Analýzy vztahů mezi genotypem a fenotypem <i>ABCC1</i> a klinicko-patologickými daty.....	78
7	Závěr	81
8	Seznam použité literatury	82
9	Přílohy.....	94

Seznam použitých zkratek

A	adenin (adenine)
ABC	ATP-vázající kazeta (ATP-binding cassette)
ALDP	protein adrenoleukodystrofie (adrenoleukodystrophy protein)
AMK	aminokyselina
ATP	adenozintrifosfát (adenosintriphosphat)
BRCA	rakovina prsu (breast cancer)
C	cytozin (cytosine)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
CD4+	glykoprotein povrchu imunitních buněk (cluster of differentiation 4)
cDNA	komplementární DNA (deoxyribonukleová kyselina)
CEPH	The Centre d'Etude du Polymorphisme Humain
CFTR	gen/protein cystické fibrózy (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
CI	interval spolehlivosti (confidence interval)
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát (deoxyribonucleotide triphosphate)
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGFR	receptor pro růstový faktor (epidermal growth factor receptor)
EPHX1	epoxid hydroláza (epoxide hydrolase 1)
ER	estrogenový receptor
FAC	fluorouracil, doxorubicin, cyklofosfamid
FAM	fosforamidit
FSH	folikuly stimulující hormon (follicle-stimulating hormone)
G	guanin (guanine)
GSH	glutathion (redukovaná forma)
GSSG	glutathion disulfid (oxidovaná forma)
GST	glutathion-S-transferáza (glutathione S-transferase)
HapMap-CEU	Haplotype Mapping Project - Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection
HER	receptor pro lidský epidermální růstový faktor (human epidermal growth factor receptor)

HRM	vysoce účinné tání (high resolution melting)
ICD	mezinárodní klasifikace nemocí a souvisejících zdravotních problémů (International Classification of Diseases and Related Health Problems)
K ₃ EDTA	tri-draselná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové
LH	luteinizační hormon (luteinizing hormone)
LT ₄	levotyroxin
LTC ₄	leukotrien C ₄
MDR	mnohočetná léková rezistence (multidrug resistance)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
MRP	protein mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance protein)
NAD(P)H	redukováný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NBD	doména vázající nukleotid (nucleotide binding domain)
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NF voda	voda bez nukleáz
NSCLC	nemalobuněčný typ karcinomu plic (non-small-cell lung carcinoma)
NQO1	NAD(P)H-chinon-oxidoreduktáza 1 (NAD(P)H quinon oxidoreductase 1)
OR	odhad relativního rizika (odds ratio)
P	pravděpodobnost (probability)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PgP	P-glykoprotein
PgR (PR)	progesteronový receptor
rtPCR	PCR v reálném čase (real-time PCR)
SCLC	malobuněčný typ karcinomu plic (small-cell lung cancer)
SG	konjugát glutathionu
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
SUR	receptor sulfonylmočoviny (sulfonil urea receptor)
T	tymin (thymine)
TAMRA	tetrametylkarboxyrhodamin
TBE pufr	Tris/Borát/EDTA pufr
TE pufr	Tris/EDTA pufr
TMD	transmembránová doména (transmembrane domain)

TMH	transmembránová šroubovice (transmembrane helix)
TNM	TNM klasifikace maligních tumorů (T=tumor, N=node M=metastasis)
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
UICC	Union of International Cancer Control
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

Abstrakt

Nádory prsu jsou nejčastějšími malignitami postihujícími ženskou populaci jak u nás, tak i ve světě. Léčba tohoto onemocnění zahrnuje chirurgické odstranění nádoru, radioterapii, chemoterapii a léčbu systémovou (hormonoterapii). V poslední době se přistupuje i k cílené biologické léčbě. Každá pacientka však na léčbu reaguje jinak - interindividuální variabilita v odpovědi na léčbu je tudíž vysoká.

Jednou z nejvýznamnějších překážek úspěšné chemoterapie je mnohočetná léková rezistence (*multidrug resistance*, dále jen MDR). MDR často souvisí se sníženou intracelulární akumulací protinádorových léčiv a zvýšenou expresí ABC transportérů, jako je např. námi studovaný ABCC1. Tato rodina membránových transportních proteinů zahrnuje nejznámější prostředníky MDR, především ABCB1, ABCC1 a ABCG2, které pumpují různé typy léčiv ven z nádorových buněk, čímž vůči nim způsobují rezistenci.

Hlavním cílem této práce bylo stanovení genetické variability genu *ABCC1* u 191 pacientek s karcinomem prsu a stanovení expresních profilů 30 pacientek (ze souboru 191 pacientek, viz výše) léčených předoperačně. Dále jsme se zabývali vztahy mezi genotypem, resp. fenotypem *ABCC1* a prognostickými faktory, resp. výsledkem chemoterapie pacientek.

Genová exprese byla měřena u preamplifikovaných vzorků cDNA pomocí real-time PCR s relativní kvantifikací a genetická variabilita (jednotlivé polymorfizmy) byla stanovena prostřednictvím přímé sekvenace či HRM analýzy.

Tato studie poskytla náhled na expresní profily pacientek s karcinomem prsu. Podařilo se identifikovat všechny vybrané SNPs v rámci nejvýznamnější funkční domény (NBD1) genu *ABCC1*. Ze statistických analýz navíc vyplývá, že díky vztahu mezi polymorfismy a fenotypem *ABCC1* mohou mít pacientky rozdílné aktivity enzymu a tím i odlišné riziko vzniku nádoru při expozici substrátům enzymu během života. Ochranná alela tak může způsobit pozdější nástup onemocnění.

Závěrem lze konstatovat, že se nám nepodařilo prokázat vztah mezi fenotypem a/nebo genotypem *ABCC1* a účinností chemoterapie, avšak identifikovali jsme zajímavé vztahy k prognóze pacientek. Tyto vztahy bude třeba ověřit v následné cílené studii.

Klíčová slova: karcinom prsu, chemoterapie, mnohočetná léková rezistence, jednonukleotidový polymorfizmus, exprese, ATP-vázající kazetový transportér C1 (*ABCC1*), doména vázající nukleotid 1 (NBD1)

Abstract

Breast cancer is the most frequent malignancy in women population both in the Czech Republic and worldwide. Treatment of this disease involves surgical removal of the tumor, radiotherapy, chemotherapy and hormonal therapy. Recently, targeted biological treatment is also approached. Each patient reacts to the treatment individually and thus high variability in response is common.

Multidrug resistance (MDR) presents one of the most important obstacles to successful chemotherapy. MDR is often associated with a decreased intracellular accumulation of anticancer drugs and an increased expression of ABC transporters such as *ABCC1* of our interest.

The ABC family of membrane transport proteins includes the well-known mediators of resistance to anticancer drugs. In particular, *ABCB1*, *ABCC1* and *ABCG2* actively perform efflux of various types of drugs from cancer cells, thereby conferring resistance to those agents.

The main aim of this study was to assess the genetic variability of the *ABCC1* gene in 191 patients with breast cancer and to determine the expression profile of *ABCC1* in 30 patients from this cohort who were treated preoperatively. We evaluated relations between *ABCC1* genotype, or phenotype and prognostic factors including the result of chemotherapy.

Gene expression was measured in preamplified cDNA samples using real-time PCR with relative quantification and genetic variability (individual polymorphisms) was determined by direct sequencing and HRM analysis.

The study provided the insight into the *ABCC1* expression in patients with breast cancer. We managed to identify all selected SNPs in the NBD1 (nucleotide binding domain 1) of the *ABCC1* gene. Our statistical analysis also shows that due to the relation between SNPs and phenotype of *ABCC1* a different enzyme activity and thus a different risk of developing cancer when exposed to *ABCC1* substrates during the life may be encountered. A protective allele can cause later onset of the disease. In conclusion, we did not find causal relation between *ABCC1* and chemotherapy outcome but other interesting associations of *ABCC1* phenotype and genotype with prognostic factors were observed. These associations have to be confirmed by additional study.

Keywords: breast cancer, chemotherapy, multidrug resistance, single nucleotide polymorphism, expression, ATP-binding cassette transporter C1 (*ABCC1*), nucleotide binding domain 1(NBD1)

1 Úvod

Karcinomem prsu, nejčastějším zhoubným nádorem žen, onemocní každý rok v České republice přibližně 6000 žen. Incidence tohoto onemocnění rok od roku stoupá, což je zapříčiněno lepší osvětou v oblasti samovyšetření prsu, pravidelnými lékařskými vyšetřeními a tím tedy i diagnózou časných stádií tohoto onemocnění. Díky tomu klesá mortalita, jelikož rané fáze vzniku rakoviny jsou snadněji léčitelné.

Léčba karcinomu prsu je multimodální. Spočívá v chirurgickém odstranění nádoru, jemuž předchází (či po němž následuje) podávání chemoterapeutik, neboli chemoterapie. Nejčastěji užívanými cytostatiky jsou antracykliny (epirubicin, doxorubicin) a taxany (docetaxel, paklitaxel).

Jedním z důvodů selhání chemoterapie je léková rezistence způsobená zvýšenou expresí ABC proteinů, jež transportují z buněk široké spektrum látek různé chemické povahy, včetně cytostatik.

Jakým mechanismem lze expresi ABC transportérů ovlivnit, či jaké faktory zvýšenou expresi způsobují zatím není známo. Studium genetických polymorfizmů v genech způsobujících MDR je jednou z možností, jak poznat vztahy mezi individuální genetickou variabilitou a účinkem ABC transportérů. Tato práce se zabývá specificky studiem jednoho ze 49 známých lidských ABC transportérů, *ABCC1*. Genetické polymorfizmy mohou ovlivnit, jak expresi *ABCC1*, tak jeho proteinovou strukturu či funkci. Mají za následek také oxidativní stres a odlišnosti v odpovědi na protinádorovou léčbu (Wang *et al.*, 2005).

V předchozí práci (Perglerová, 2010) se nám podařilo identifikovat zvýšenou expresi *ABCC1* v nádorové tkáni patientek s karcinomem prsu. Tato práce byla zaměřená na ověření a rozpracování tohoto poznatku. V předkládané práci nás především zajímalo, zda souvisí genotyp *ABCC1* s fenotypem a zda genotyp a/nebo fenotyp koreluje s prognostickými faktory a výsledkem chemoterapie patientek.

2 Cíle práce

- **Ověřit, zda dochází ke zvýšené expresi *ABCC1* genu v nádorové tkáni i u pacientek s karcinomem prsu léčených předoperační chemoterapií.**
 - Stanovit expresní profil *ABCC1* v RNA z nádorové a okolní nenádorové tkáně pacientek léčených předoperačně.
 - Porovnat expresi *ABCC1* v nádorové a okolní nenádorové tkáni pacientek a kvantifikovat eventuální rozdíl.
 - Zjistit, zda exprese *ABCC1* koreluje s klinickými prognostickými faktory (stádium, agresivita a typ nádoru, exprese hormonálních receptorů) nebo s výsledkem chemoterapie (pokles či stagnace nádorové masy po léčbě).
- **Zjistit, zda a jak je exprese *ABCC1* ovlivněna přítomností polymorfizmů ve funkční doméně genu**
 - Stanovit vytipované polymorfismy genu *ABCC1* v DNA z krve všech dostupných pacientek.
 - Provést korelaci genotypu s fenotypem (hladinou transkriptu) *ABCC1*.
 - Provést korelaci genotypu s klinicko-patologickými údaji pacientek.
- **Doporučit další postup pro validaci a publikaci významných výsledků studie.**

3 Literární přehled

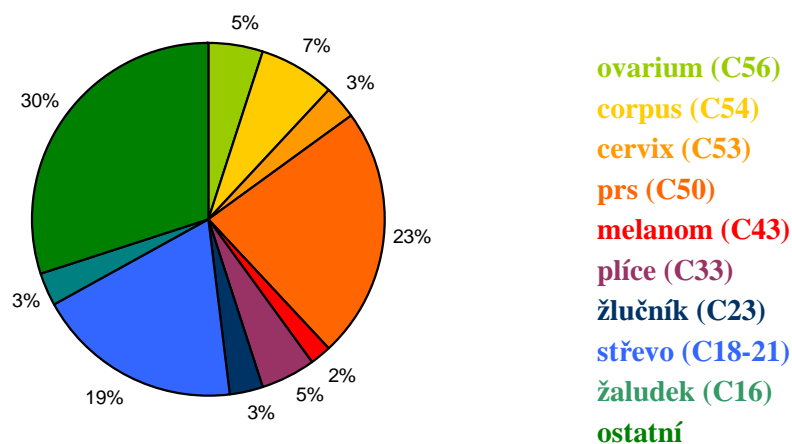
3.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu neboli mammy (ICD-10; dg. C50) je nejčastější zhoubný nádor žen se stále rostoucí incidencí, výraznou heterogenitou a multifaktoriální etiologií, což vede k nevyzpytatelnému biologickému chování. Patří do skupiny hormonálně dependentních nádorů s významnou rolí estrogenů. Zhruba 5-10 % zhoubných nádorů prsu se vyskytuje familiárně a na jejich vzniku se podílí genetická predispozice. Nejčastěji jsou způsobeny delecí v *BRCA1* a *BRCA2* (Dunning *et al.*, 2001; Nathanson *et al.*, 2001).

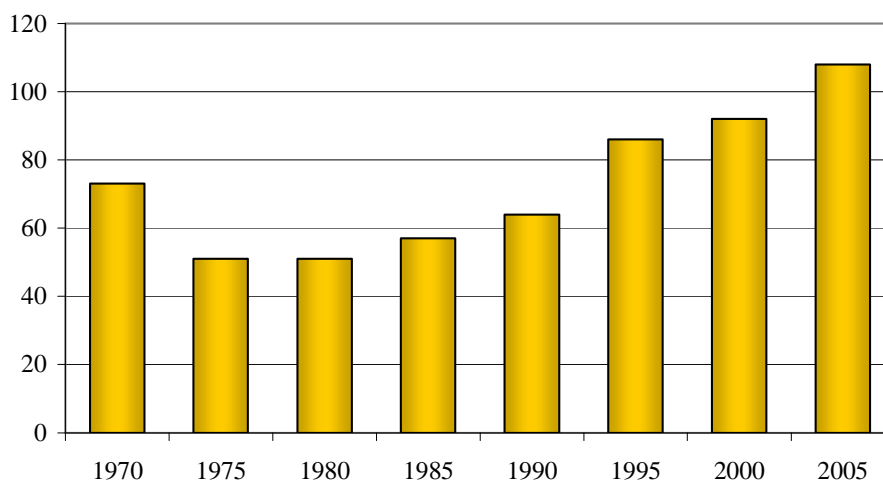
Vznik tohoto nádoru může být ovlivněn výživou a životním stylem ženy. V současné době nejefektivnější metodou včasné detekce nádorů prsu je mamografie. Další spíše doplňkovou metodou je ultrasonografie. Při podezření na maligní lézi je nutné histopatologické vyšetření vzorku tkáně (*core-cut, tru-cut biopsy*). Léčebná strategie je určována dle klinického stádia nemoci a dle prognostických faktorů. V léčbě karcinomu prsu se používá jak léčba lokoregionální, tj. chirurgický výkon, radioterapie, tak i léčba systémová, tj. chemoterapie a hormonoterapie.

3.1.1 Výskyt karcinomu prsu

Pravděpodobnost, že žena během svého života (od narození po smrt) onemocní karcinomem prsu je 1 ku 8, tedy 12,08 % (Jemal *et al.*, 2010). V současné době průměrně u jedné z devíti žen bude v průběhu jejího života diagnostikován karcinom prsu a jedna žena ze třiceti na tuto chorobu zemře. Proto karcinom prsu zařazujeme mezi tzv. civilizační choroby (Chovanec *et al.*, 2009). Vysoká incidence nádorů prsu je pozorována ve všech vyspělých zemích světa, především v zemích severní a západní Evropy a severní Ameriky. Česká republika zaujímá ve srovnání s ostatními zeměmi světa 23. místo v počtu nově diagnostikovaných nádorů na 100 000 žen, ve srovnání s evropskými zeměmi pak 17. místo (Mužík *et al.*, 2009).



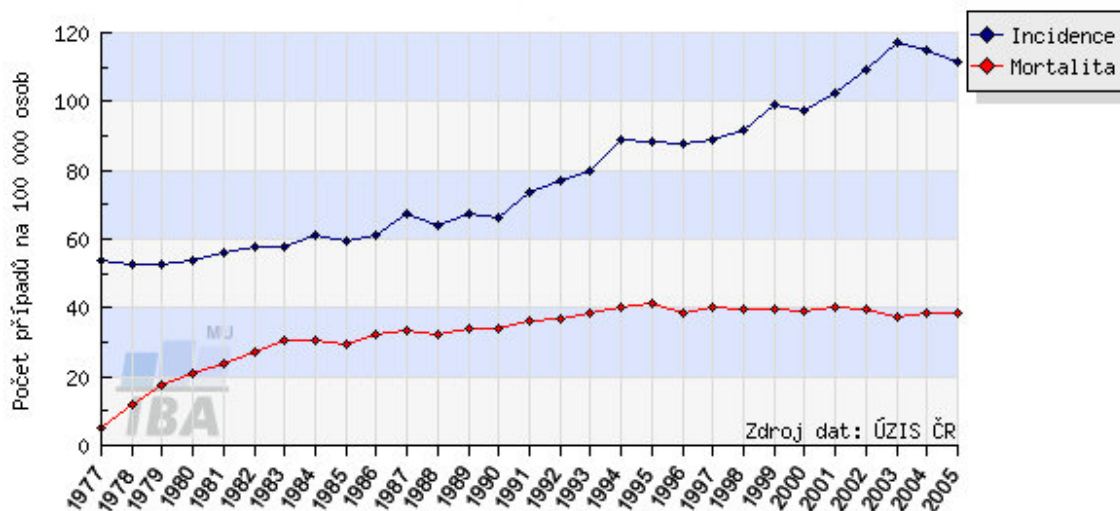
Graf č. 1: Struktura hlášených zhoubných novotvarů u žen v České republice v roce 2004.
(upraveno dle Chovanec *et Dostálová*, 2009).



Graf č. 2: Incidence karcinomu prsu v ČR v posledních třech desetiletích. Incidence je zde počítána na 100 000 žen (zdroj: Chovanec *et Dostálová*, 2009).

Nádory prsu představují nejen hlavní incidenční nádorovou zátěž ženské populace, ale jsou také stále častější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění. Ročně na ně umírá přibližně 1950 žen, tedy 37 ze 100 000 žen (Mužík *et al.*, 2009). Celkově jsou pak nádory prsu příčinou úmrtí 3,6 % žen v populaci. Trend incidence byl v celém sledovaném období setrvale rostoucí, pouze v posledních letech byla zaznamenána jeho stagnace a mírný pokles (viz Graf č. 3), což jednoznačně ukazuje na zlepšování úspěšnosti léčby, především díky vyššímu zachytu nádorů v časných klinických stádiích. V roce 2005 dosáhl počet nově diagnostikovaných nádorů prsu u žen 5 533, což představuje 105,4 nádorů na 100 000

žen (ÚZIS). Počet žijících žen s nádorem prsu nebo jeho historií (tedy tzv. prevalence) pak byl v roce 2005 celkem 49 539, což je 944 na 100 000 žen (Mužik *et al.*, 2009).



Graf č. 3: Trend vývoje incidence a mortality na zhoubné nádory prsu u žen (zdroj: incidence - Národní onkologický registr, ÚZIS ČR, mortalita - Český statistický úřad).

3.1.2 Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu

Příčinou vzniku karcinomu prsu jsou mutace v genomové DNA. V 90-95 % případů vznikají náhodně v průběhu života následkem životního stylu (kouření, výživa, atd.). V dalších 5-10 % vznikají tyto nádory dědičně, na podkladech dědičných mutací ve známých kandidátních genech (Pohlreich *et al.*, 2005). Navzdory provedení rozsáhlé epidemiologické studie jsou všechny odhady osobního rizika vzniku karcinomu ryze pravděpodobnostní a zatížené významnou nejistotou.

Tab. č. 1: Hodnoty relativního rizika vzniku C50 v závislosti na věku ženy v době menarche a menopauzy, na věku prvorodičky.

rizikový faktor	index relativního rizika
menarche > 18 let	0,3
menarche 12 – 17 let	1,0
menarche < 12 let	2,0
menopauza < 35 let	0,33
menopauza 35 – 44 let	0,6
menopauza 45 – 54 let	1,0
menopauza > 54 let	1,3
první porod ve věku < 18 let	0,33
první porod ve věku < 20 let	1,0
první porod ve věku 20 - 25 let	1,3
první porod ve věku 25 - 29 let	1,8
první porod ve věku 30 - 35 let	2,2
první porod ve věku > 35 let	3,0
nuliparita	2,0

Obecně řečeno čím dřívější nástup menarche a pozdnější nástup menopauzy, tím větší riziko výskytu rakoviny prsu (zdroj: Chovanec *et Dostálová*, 2009).

K pochopení příčiny vzniku karcinomu prsu je velmi důležité studium rizikových faktorů. Rizikové faktory karcinomu prsu jsou heterogenním souborem vlivu vnitřního i zevního prostředí, které různými mechanismy zvyšují riziko karcinomu prsu. Abrahámová *et al.* (2003) je dělí na faktory životního stylu, faktory osobní anamnézy, hormonální a gynekologické faktory, genetické faktory a ty ostatní.

Do první skupiny, mezi tzv. faktory životního stylu, patří kouření, alkohol, stravovací návyky, obezita a fyzická aktivita. Významnou roli na incidenci karcinomu prsu má přitom výživa a životní styl ženy. Vysoký energetický příjem s nízkou pohybovou aktivitou vedoucí k obezitě (především v postmenopauze), nízký příjem zeleniny a nadužívání alkoholu zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu.

Geneticky variabilní biotransformační enzymy - epoxid-hydroláza (EPHX1, EC 3.3.2.3), NAD(P)H-chinon-oxidoreduktáza (NQO1, EC 1.6.99.2) a glutathion *S*-transferázy (GST, EC 2.5.1.18) - metabolizují a konjugují léčiva, karcinogeny a přírodní produkty (Vineis *et al.*, 1999). Ve studii Šarmanové *et al.* (2004) byly zkoumány vztahy mezi genetickými polymorfizmy ve výše zmíněných enzymech a rizikem vzniku karcinomu prsu formou studie případů a kontrol. Nejzajímavější výsledek byl získán analýzou distribuce genotypů v exonu 6 NQO1. Výsledky logistické regrese potvrdily,

že nositelé homozygotního genotypu NQO1*2/*2 jsou ve velkém riziku vzniku karcinomu prsu (OR = 3,68, CI = 1,41 - 9,62, P = 0,008; Šarmanová *et al.*, 2004). Výsledky této studie byly ověřeny skupinou Menzel *et al.* 2004 na rakouské populaci.

Mezi faktory osobní anamnézy řadíme příslušnost k etnické skupině, geografickou oblast původu, věk, tělesnou výšku, střední krevní tlak a historii histopatologických změn prsní tkáně. Výskyt karcinomu prsu u žen do 20 let jejich života je extrémně vzácný a u žen do 30 let neobvyklý. Jeho incidence výrazně roste s věkem a výrazných hodnot dosahuje již před 50. rokem života.

Do další skupiny (skupiny faktorů hormonálních a gynekologických) patří nástup menarche a menopauzy, věk při prvním porodu, počet porodů, délka kojení, gynekologické operace či hormonální léčba. Karcinom mammy patří do skupiny hormonálně dependentních nádorů, kam dále náleží například karcinom prostaty a těla děložního. Existuje mnoho důkazů, které ukazují na významnou roli estrogenů v etiologii karcinomu prsu. Například nízký věk ženy v době menarche či naopak pozdní menopauza jsou spojeny se stoupajícím rizikem vzniku karcinomu prsu. V postmenopauzálním období života ženy se hlavním zdrojem estrogenů stává tuková tkáň, a právě tyto obézní ženy mají vyšší hladiny endogenního estrogenu a rovněž vyšší riziko vzniku karcinomu mammy.

Zhruba 5-10 % zhoubných nádorů prsu se vyskytuje familiárně a na jejich vzniku se podílí genetická predispozice. Jedná se především o mutace genů *BRCA1* (17q21) a *BRCA2* (13q12-13), které jsou spojeny i s jinými nádorovými onemocněními (karcinom ovaria, kolorekta). Patří do skupiny tumorsupresorových genů. Podle studií geneticky podmíněných nádorů bylo stanoveno přibližné riziko možného onemocnění karcinomem prsu až na 85 %, čili více než šestkrát vyšší než u běžné populace. Penetrance genu je ale různá u různých žen, dokonce i v rámci jedné rodiny. Nelze tedy s určitostí říci, kdy se nádorové onemocnění objeví a jestli vůbec (Ford *et al.*, 1998). Záleží pak na dalších genetických faktorech jako je polygenní dědičnost imunologických a metabolických funkcí a na životním stylu ženy. Mutace v *BRCA1* a *BRCA2* jsou děděny autozomálně dominantně a existuje 50 % riziko, že potomek nositele této mutace ji zdědí. Jsou tedy ve vysokém riziku ohrožení.

V současné době jsou ke genetickému vyšetření indikovány pouze ty skupiny osob, u nichž je možné očekávat vyšší pravděpodobnost nosičství mutace než u neselektované populace. Na základě dosavadních výsledků vyšetřování mutací genů *BRCA1* a *BRCA2* byla za indikace ke genetickému vyšetření přijata kritéria (Tab. č. 2), která zohledňují buď

rodinnou zátěž probandky, specifický histologický typ nádoru (medulární karcinom prsu), zvláštní charakter manifestace nádorového onemocnění (duplicita, věk, metachronní nádor) a některé další charakteristiky.

Tab. č. 2: Kritéria genetického vyšetření dle Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK v Praze.

1.	Pacientka s karcinomem prsu do 32 let
2.	Pacientka s karcinomem ovária do 40 let
3.	Nádorová duplicita karcinom prsu - karcinom vaječníků
4.	Bilaterální karcinom prsu, první diagnostikován do 40 let věku
5.	Karcinom prsu u muže vzniklý v kterémkoliv věku po vyloučení jiné příčiny (např. Klinefelterův syndrom)
6.	Pacientka s medulárním a atypickým medulárním karcinomem prsu
7.	Dvě příbuzné prvního stupně (přes otce druhého stupně) s nádorem prsu nebo s nádorem vaječníků, alespoň jedna diagnostikována ve věku pod 50 let
8.	Tři a více případů karcinomu prsu v rodině v jedné příbuzenské linii
9.	Tři a více případů karcinomu prsu a ovária v rodině v jedné příbuzenské linii
10.	Zdraví rodinní příslušníci pozitivně testovaných osob, muži i ženy, od 18 let věku

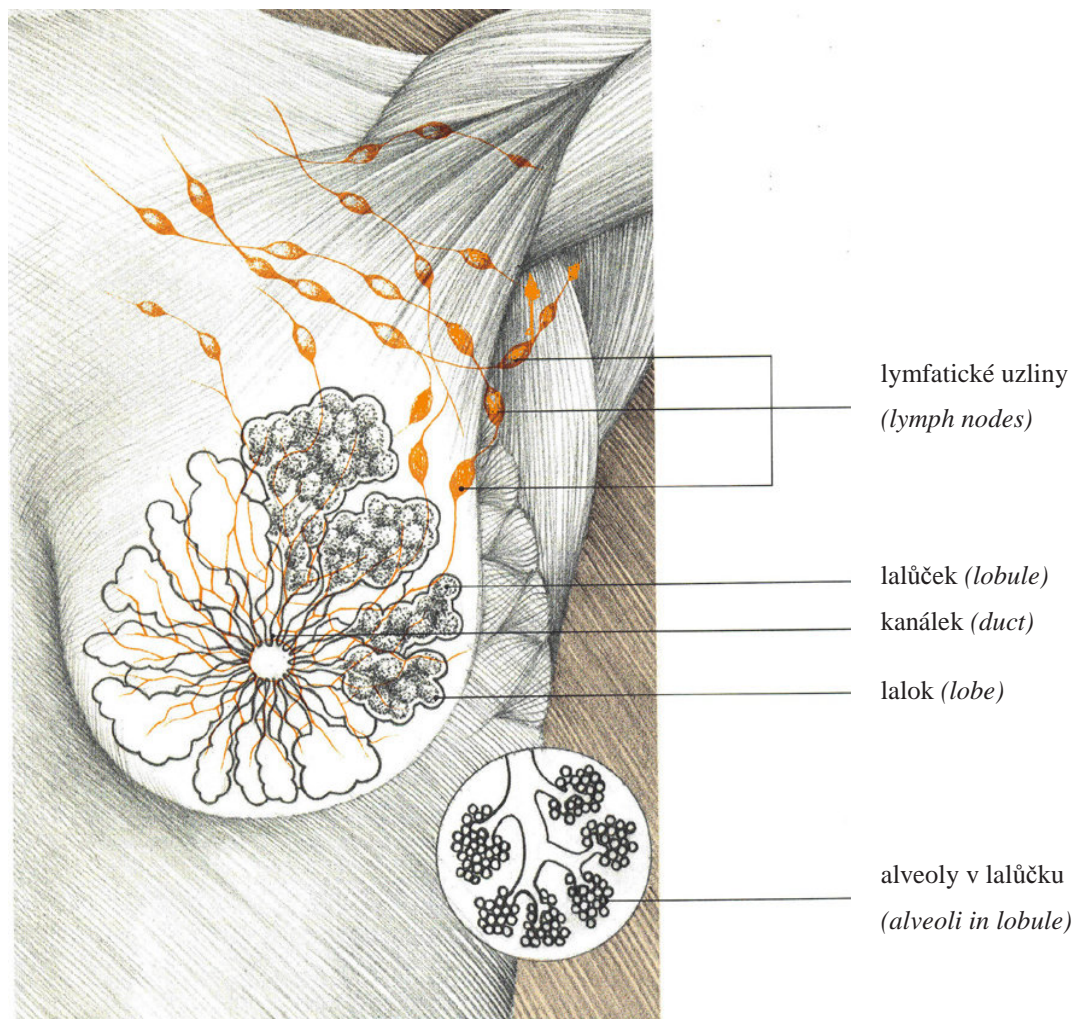
Mezi ostatní rizikové faktory můžeme zařadit vzdělání, místo bydliště, životní prostředí a také psychologické aspekty.

3.1.3 Klinické příznaky

Klinické příznaky karcinomu prsu můžeme rozdělit na celkové a lokální. Obecně však lze říci, že jakýkoli klinický nález vždy znamená pozdní diagnózu. Celkové příznaky bývají nespecifické, můžeme sem zařadit subfebrilie, únavnost, subdeprese, bolesti hrudní nebo krční páteře a flobotrombózy. Nejčastějším lokálním projevem karcinomu prsu je nebolestivé zduření nebo rezistence s nepravidelnými okraji kdekoliv v prsu. Dále deformity bradavky nebo její vpáčení, krvácení nebo sekrece z mlékovodů, změny barvy kůže (např. zarudnutí), vtahování kůže vzhledem připomínající pomerančovou kůru, otok kůže, mokvání, nehojící se vřed. Na nádorové onemocnění také upozorní hmatná rezistence v axile nebo v nadklíčku. Někdy se může pokročilá metastazující nemoc manifestovat příznaky vycházejícími z postižení vzdáleného orgánu (plíce, játra, mozek, skelet), a tím upozorní na základní onemocnění.

Jak již bylo zmíněno výše, strategii léčby určuje lékař podle klinického stádia a prognostických faktorů. Prognostické faktory rakoviny prsu odrážejí základní biologii nádoru a tím i vliv rizika relapsu u jednotlivých pacientů. Lze je rozdělit na ty související

s pacientem (věk, etnický původ a komorbidita neboli současný výskyt několika onemocnění) a ty související s nádorem (velikost nádoru, infiltrace regionálních uzlin, stupeň diferenciace nádoru, mitotický index, histologický typ nádoru, stav hormonálních receptorů a amplifikace nebo overexprese *HER-2/neu*). Bohužel žádný z těchto faktorů nemůže naprosto přesně vyčlenit skupiny pacientek, které budou léčeny buď lokoregionální léčbou, či systémovou terapií.



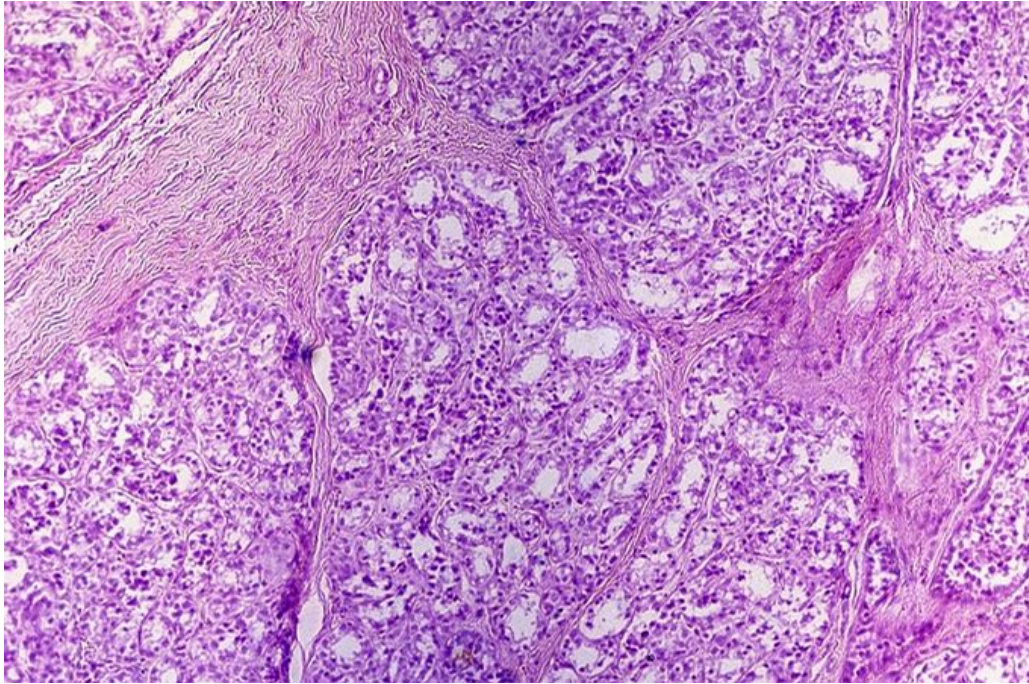
Obr. č. 1: Oblasti ňadra, kde se nejčastěji tvoří nádor

(zdroj: <http://www.immunerecovery.net/Breast%20Cancer.htm>).

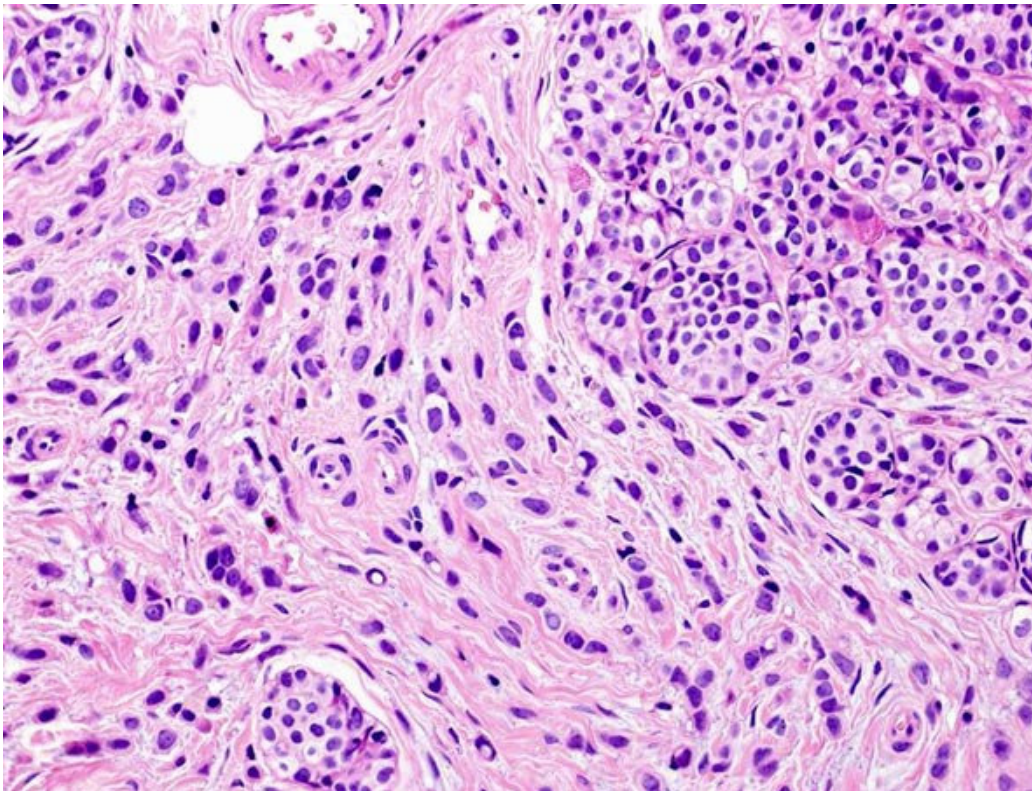
V tradiční histologické klasifikaci karcinomu prsu vycházející z morfologického vzhledu nádoru jsou karcinomy děleny na duktální (papilární, tubulární, mucinózní, medulární), lobulární a vzácnější jako karcinoid, Pagetův nádor a komplexní varianty (viz obr. č. 2 na následující straně). Podle údajů z let 2000-2005 je nejčastějším typem zhoubného novotvaru prsu u žen skupina duktálních karcinomů (73 %), druhým

nejčastějším typem je karcinom lobulární (14 %) (ÚZIS). Součástí histologického vyšetření je rovněž ověření přítomnosti receptorů (HER2), hormon-dependence, proliferační aktivity a neoangiogeneze, které mají vliv na volbu terapie.

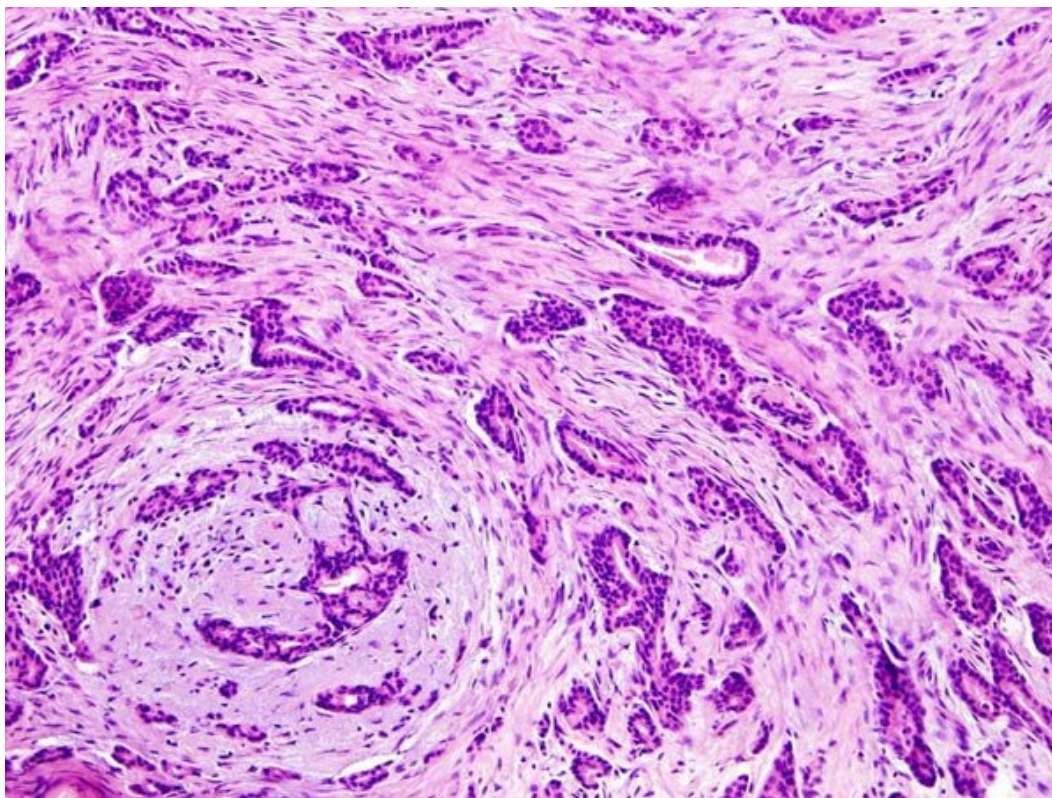
A)



B)



C)



Obr. č. 2: Histopatologie prsní tkáně. A) Normální prsní laktační tkáň. (zdroj: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/atlas/demo/>) B) Diskohezivní růst invazivního (infiltrujícího) lobulárního karcinomu vlevo a ložisko lobulárního *in situ* karcinomu vpravo. (zdroj: <http://www.mamma.cz/klasifikace/who-02.html>) C) Duktální invazivní karcinom (grade 1). (zdroj: <http://www.mamma.cz/klasifikace/who-02.html>)

Jedním z rozhodujících znaků pro určení prognózy a volbu strategie léčby tohoto onemocnění je pokročilost nádoru, tedy klinické stádium. V současnosti nejpoužívanějším klasifikačním systémem pro rozdělení nádorů do stádií (*stage, staging*) je tzv. TNM klasifikace (Sobin *et* Wittekind, 2002; Wittekind *et* Bertolini, 2010). Jedná se o klinický a histopatologický systém založený na velikosti primárního nádoru (T, z angličtiny *tumor*), rozsahu postižení regionálních mízních uzlin metastázemi (N, z angličtiny *node*) a přítomnosti nádorových metastází ve vzdálených orgánech (M, z angličtiny *metastasis*). Z hodnot T, N a M lze vytvořit mnoho kombinací. Z praktických důvodů se však volí dělení onemocnění do 5 stádií (viz Tab. č. 3 na následující straně). Stádia 1 a 2 jsou označována za časná a mají dobrou prognózu a úspěšnost léčby. Pokročilá stádia 3 a 4 pak představují rizikovou skupinu s výrazně horší prognózou. Trend podílu časných stádií mezi

nově diagnostikovanými nádory prsu u českých žen je za období 1980-2005 rostoucí (viz Graf č. 3; Mužík *et al.*, 2009).

Tab. č. 3: Rozdělení nádorů prsu do stádií dle TNM klasifikace

Stage	TNM
Stádium 0	Tis N0 M0
Stádium I	T1 ¹⁾ N0 M0
Stádium IIA	T0 N1 M0 / T1 ¹⁾ N1 M0 / T2 N0 M0
Stádium IIB	T2 N1 M0 / T3 N0 M0
Stádium IIIA	T0 N2 M0 / T1 ¹⁾ N2 M0 / T2 N2 M0 / T3 N1 M0 / T3 N2 M0
Stádium IIIB	T4 N0 M0 / T4 N1 M0 / T4 N2 M0
Stádium IIIC	Jakékoli T N3 M0
Stádium IV	Jakékoli T, jakékoli N a M1

Tis = tumor in situ, T0 = bez známk primárního nádoru, T1 = nádor měřící 2 cm a méně v největším rozměru, T2 = nádor měřící více jak 2 cm a zároveň méně jak 5 cm v největším rozměru, T3 = nádor měřící více jak 5 cm v největším rozměru, T4 = nádor jakékoli velikosti s přímým šířením do stěny hrudní nebo pouze do kůže (zdroj: Sobin *et* Wittekind, 2002).

Pozn.: ¹⁾ T1 včetně T1mic (mikroinvaze).

Dále se určuje stupeň diferenciacie nádoru (*grade, grading*). Podle rychlosti buněčného dělení, utváření tubulů a jaderného pleomorfismu (změn velikosti a uniformity buňky) se nádory rozdělují do tří stupňů. Všeobecně řečeno, nižší stupeň znamená dobře diferencovaný a pomaleji rostoucí zhoubný nádor, zatímco vyšší stupeň označuje nádor méně diferencovaný, zato rychleji rostoucí a tudíž i s horší prognózou.

3.1.4 Léčba karcinomu prsu

Během posledních desetiletí došlo k výraznému posunu v léčbě karcinomu mammy (Petruželka, 2007a). Jedná se o několik na sobě nezávislých faktorů. Kromě změny v chápání biologického chování karcinomu prsu jsou na řadě pracovišť k dispozici technicky dokonalejší přístroje, jež dokáží zjistit přítomnost tumoru již v jeho časných stádiích, a zároveň se zdokonaluje mezioborová spolupráce, nezbytná pro úspěšnou systémovou léčbu. V neposlední řadě stojí rozvoj molekulární biologie.

V léčbě karcinomu prsu se používají všechny léčebné modalitty typické pro nádorová onemocnění - chirurgický zákrok, radioterapie (léčba lokoregionální), dále chemoterapie a hormonoterapie (léčba systémová). V posledních letech byly do léčebných standardů karcinomu prsu zapracovány i metody cílené molekulární biologické léčby (Petruželka, 2007b).

3.1.4.1 Chemoterapie

Chemoterapie je systémová léčba. Dnes se podává jako součást multimodální léčby v kombinaci s dalšími léčebnými metodami. Jako každá jiná léčebná metoda má i cytostatická terapie své vymezené indikace a její nevhodné nebo neracionální podání může významně poškodit pacienta bez léčebného efektu. Načasování a indikace adjuvantní onkologické léčby nikoli s ohledem na empirické zkušenosti, ale na základě vztahů genomických faktorů k podávaným chemoterapeutikům, by přispěly k individualizaci terapie a k vytipování chemorezistentních pacientů.

V systémové léčbě karcinomu prsu existují tři základní indikační skupiny chemoterapie: adjuvantní, neoadjuvantní a paliativní.

Většinou se užívají polychemoterapeutické režimy kombinující několik cytostatik, čímž se zvyšuje účinek léčby. Existuje řada cytostatik, u kterých byla prokázána účinnost v léčbě karcinomu prsu. Nejčastěji používanou kombinací se stal cyklofosamid, doxorubicin a fluorouracil (režim FAC). Dalšího zlepšení se dosáhlo zavedením nových látek (taxany - paklitaxel, docetaxel - gemcitabin a vinorelbin) zhruba před deseti lety. I nyní navzdory tomu, že chemoterapie prakticky dosáhla své léčebné meze, přicházejí nová cytostatika - taxoid larotaxel a vinka alkaloid vinflunin (Chovanec *et* Dostálová, 2009).

Myeloablativní chemoterapie jsou režimy vysokodávkované kombinované chemoterapie, která má mnohem vyšší protinádorovou účinnost, ale na druhé straně dochází prakticky ke zničení krvetvorné tkáně pacienta. Aplikace takových režimů je možná jen za předpokladu následné transplantace kostní dřeně. Chemoterapie společně s hormonoterapií je metodou volby v léčbě metastazujícího karcinomu prsu, kde je dosahováno objektivních léčebných odpovědí u 50 až 80 % pacientů.

3.1.4.1.1 Adjuvantní chemoterapie

Nejčastější je aplikace chemoterapie po chirurgickém odstranění nádoru neboli adjuvantní chemoterapie. Jejím cílem je likvidovat zbytkovou populaci nádorových buněk, tj. klinicky nezjistitelné mikrometastázy. U lokalizovaných stadií můžeme za pomoci prognostických faktorů stratifikovat nemocné do skupin s různým stupněm rizika metastatického rozsevu. Pouze u nemocných náležících do prognostické skupiny nejmenšího rizika metastatické diseminace není v současnosti indikována systémová léčba.

Cílem adjuvantní chemoterapie je prodloužení beznádorového intervalu a celkové doby přežití. Smyslem této léčby je dlouhodobý léčebný výsledek, a proto je možno léčebný záměr považovat za kurativní. Adjuvantní chemoterapie by měla být zahájena nejpozději do tří týdnů od chirurgického výkonu. Velmi důležité je zachování stejné dávkové intenzity léčby.

3.1.4.1.2 Neoadjuvantní chemoterapie

Podání cytostatik před chirurgickým výkonem se označuje jako neoadjuvantní chemoterapie. Tento způsob podání je aplikován u žen s pokročilým, ale technicky operabilním primárním nádorem, nebo u žen s velkým primárním nádorem omezené operability. V době zahájení tohoto typu léčby je pacientka bez známek diseminace choroby. Aplikací neoadjuvantní chemoterapie dochází ke zmenšení velikosti primárního nádoru, což zlepšuje operabilitu nádoru a umožní provedení záchovných, tj. konzervativních chirurgických výkonů. Rovněž se docílí snazšího průniku cytostatika k nádorovým buňkám v důsledku intaktního cévního zásobení. Prostřednictvím neoadjuvantní chemoterapie navíc získáme informace o chemosenzitivitě nádoru. V současné době je tento postup preferován.

3.1.4.1.3 Paliativní chemoterapie

Nemocné s metastatickým karcinomem jsou inkurabilní a pro efektivní léčbu dnes neexistuje žádný standardní postup. Skupina nemocných s diseminací je doménou nově vyvíjených léků. Cílem paliativní chemoterapie, která se používá u IV. stadia karcinomu prsu, je i přes všechny pokroky pouze navození parciálních remisí, usnadnění a prodloužení života chorobou.

3.1.4.2 Hormonální léčba

Uběhlo již více než 100 roků od doby, kdy byla za účelem léčby pokročilého karcinomu mammy provedena první ooforektomie, avšak teprve v posledních desetiletích byly objasněny procesy na úrovni molekulární biologie, které umožnily vysvětlit úspěšnost této operace. Hormonální léčba byla první, která přinesla znatelný efekt v paliativní terapii karcinomu mammy. Spolu s chemoterapií je léčbou systémovou, má však, na rozdíl

od chemoterapie, méně výrazné nežádoucí účinky a velmi dobrou toleranci léčby. Cílem hormonální terapie karcinomu mammy je ovlivnit proliferaci nádorových buněk extracelulárním podnětem.

Účinek hormonů je vázán na přítomnost specifických buněčných receptorů. U karcinomu prsu se jedná o stanovení steroidních estrogenových (ER) a progesteronových (PgR) receptorů. Přítomnost estrogenových receptorů v tumoru, tzv. „pozitivní ER status“ zlepšuje prognózu jak v délce celkového přežití, tak v době trvání tzv. „*disease-free*“ intervalu. Na jakoukoli hormonální terapii při neznámém stavu receptorů odpovídá zhruba 35 % nádorů mammy remisí o průměrném trvání 14 měsíců. Při receptorové pozitivitě se efektivita zvyšuje na 50-70 % (Chovanec *et* Dostálová, 2009).

Jedná se o léčbu systémovou, před jejímž zahájením je nutné znát stav hormonálních receptorů v tumoru. Na rozdíl od chemoterapie se nepoužívá současné kombinace více preparátů. Léčebný efekt hormonální léčby lze nejdříve hodnotit zhruba za 3 měsíce od zahájení terapie. Hormonoterapie má velmi široké uplatnění v léčbě karcinomu mammy, dominantní roli má pak u postmenopauzálních žen. U žen menoaktivních s pokročilým nálezem je prvním krokem arteficiální kastrace chirurgická (laparoskopicky) nebo medikamentózní (analoga gonadoliberinů), dále pak antiestrogeny. U žen po menopauze, které mají ER pozitivní status, jsou stále lékem první linie antiestrogeny reprezentované tamoxifenem, v případě vysokého rizika recidivy se v první linii léčby používají inhibitory aromatázy, které jinak zaujímají dominantní místo v druhé linii hormonální léčby. Nejlepším prediktorem účinnosti druhé linie hormonální léčby je míra a doba trvání léčebné odpovědi na první linii hormonoterapie. Pro třetí a další linie léčby přicházejí do úvahy gestageny, které jsou vhodné při metastatickém postižení měkkých tkání, event. při rozvoji kachexie. Androgeny, používané při výskytu kostních metastáz, či vysoké dávky estrogenů jsou vzhledem k vysoké toxicitě užívány minimálně.

Metody hormonální léčby lze rozdělit na metody ablační, aditivní, inhibiční a kompetitivní.

U ablačních metod je léčebného hormonálního efektu je dosaženo chirurgickým odstraněním či ozáření endokrinní žlázy. V současné době se provádí bilaterální ooforektomie, kterou je možné vykonat metodou chirurgickou (v současné době převážně laparoskopicky) nebo radiační kastrací v dávce 12-16 Gy. Tato léčba je účinná u žen se zachovalou vlastní estrogenovou produkcí. U žen s pozitivními ER i PgR je dosahováno

celkové léčebné odpovědi až v 78 % s remisí trvající 9-16 měsíců (Chovanec *et* Dostálová, 2009).

Princip aditivní metody spočívá v podání steroidních hormonů ve vyšších než substitučních dávkách, čímž dosahujeme paradoxní reakce, tj. blokování vazby hormonů na nukleární steroidní receptory. Přesný mechanismus účinku není dodnes znám. Do úvahy přicházejí estrogeny (byly vytlačeny antiestrogeny), androgeny (u pokročilých stadií nemoci zpomalují rozvoj kachexie), gestageny (metastázy do měkkých tkání, podpůrná léčba kachexie) a kortikoidy.

Princip inhibiční metody spočívá v blokování syntézy hormonů či metabolických účinků hormonů. Patří sem inhibitory aromatázy. Enzym aromatáza je nezbytný pro vznik „periferního“ estrogenu konverzí androstendionu na estron. V současnosti jsou v terapii používány inhibitory III. generace – anastrozol, letrozol (nesteroidní, reverzibilní blokátory aromatázy) a exemestan (steroidní, ireverzibilní blokátory aromatázy). Užívají se při selhání léčby antiestrogeny, eventuálně jejich kontraindikaci. Současně jsou již k dispozici výsledky klinických studií porovnávající efekt tamoxifenu a inhibitorů aromatázy III. generace u postmenopauzálních žen v 1. linii hormonální léčby (Chovanec *et* Dostálová, 2009). Z výsledků je možno vyvodit minimálně stejnou účinnost jako u tamoxifenu. K metodám inhibičním dále náleží analoga gonadoliberinů (účinek spočívá v blokování sekrece FSH a LH v hypofýze) a somatostatinu.

Další možností je metoda kompetitivní. Princip spočívá v kompetici o receptor s přirozeným hormonem. Hlavním představitelem metody jsou antiestrogeny – tamoxifen, který v hormonální léčbě karcinomu prsu zaujímá vedoucí postavení již po několik desítek let. Jedná se o nesteroidní antiestrogen se selektivní tkáňovou estrogení aktivitou. Jeho antiestrogenní působení na mléčnou žlázu vedlo k užití tamoxifenu pro léčbu karcinomu prsu, a to ve všech stadiích této nemoci. Účinek tamoxifenu spočívá ve vazbě na cytoplazmatický receptor buňky, čímž znemožní nitrobuněčnou vazbu estrogenů, dále v inhibici proteinkinázy C, ve zvýšené produkci negativních růstových faktorů, v útlumu pozitivních růstových faktorů a v indukci apoptózy. Tamoxifen je v současnosti stále nejčastěji předepisovaný lék v terapii karcinomu prsu a zůstává lékem první volby v hormonální terapii. Léčba je kontinuální, dlouhodobá (doporučená délka podávání je pět let), při dávce 20 mg denně. Mezi novější antiestrogenní preparáty se dále řadí toremifen, idoxifen, droloxifen, zindoxifen a raloxifen, který byl zařazen mezi selektivní modulátory estrogenových receptorů, neboť prokázal antiestrogenní působení na uterus a mléčnou

žlázu a zároveň estrogenní působení na kosti a lipidový metabolismus. Raloxifen je od roku 1998 v USA používán v prevenci osteoporózy (u nás k léčbě).

3.1.4.3 Cílená molekulární léčba

Éra cílené molekulární léčby byla započata objevením hormonálních receptorů a cíleným podáváním tamoxifenu u hormonálně dependentních tumorů prsu. Bioregulační nehormonální léčba karcinomu prsu byla zahájena použitím trastuzumabu (Herceptin®), což je monoklonální protilátka proti extracelulární doméně HER-2 receptoru. Tento lék byl první schválenou cílenou monoklonální protilátkou v léčbě solidních tumorů. Trastuzumab blokuje vstup buněk do S fáze a zastavuje buněčný cyklus. Látka rovněž snižuje metastatický potenciál nádorových buněk. Trastuzumab se užívá k léčbě metastatického karcinomu prsu u těch žen, kde byla prokázána overexprese *HER-2*. Látka se používá v monoterapii nebo v kombinaci s paklitaxelem. Rovněž užití bevacizumabu, což je rekombinantní monoklonální protilátka proti receptoru vaskulárního endotelového faktoru, bylo prezentováno v klinických studiích jako velmi perspektivní. Dále probíhají studie, které hodnotí možnosti monoklonálních protilátek jako inhibitorů tyrozinkináz.

Jednou z hlavních charakteristik maligní buňky je její schopnost autonomní proliferace, která se vymkla kontrole. To je způsobeno mutací genotypu, což se projeví změnami regulace signálních mechanismů odpovídajících za proliferaci a přežívání buněk. Současný výzkum se posunul na molekulární a intramolekulární úroveň a jeho cílem je identifikovat zásadní nitrobuněčné procesy, které způsobují maligní vývoj dříve normálních buněk. Přesné popsání těchto procesů umožní najít cílové struktury, a ty pak terapeuticky ovlivnit. To je princip cílené (terčové) biologické léčby. Tím se tato léčba výrazně liší od jiné, necílené systémové léčby, chemoterapie. Přínos biologické léčby spočívá v tom, že jsou selektivně napadány pouze nádorové buňky, zatímco zdravé, normální buňky jsou ušetřeny. Rozdíl je tedy v mechanismu účinku a také v profilu toxicity. Právě tím jsou výrazně redukovány vedlejší nežádoucí účinky léčby. V klinické praxi se již standardně využívá preparátů na bázi nízkomolekulárních látek, jež blokují tyrozinkinázy, a dále účinku monoklonálních protilátek.

Téměř u 20 % karcinomů prsu lze prokázat overexpresi HER-2 proteinu či amplifikaci HER-2 genu (Walker *et* Dearing, 1999). Význam tohoto genu byl objeven

v 80. letech minulého století a spočívá v ovlivnění růstu a diferenciaci buňky mléčné žlázy prsu.

Lidský genom obsahuje několik set kinázových genů, které ovlivňují produkci tyrozinkináz. Tyto se dělí na receptorové a nereceptorové. Receptory HER (HER 1, HER 2, HER 3 a HER 4) náleží k tyrozinkinázovým receptorům. Jedná se o transmembránové proteiny skupiny *EGFR* (receptory pro epidermální růstové faktory). Mají část extracelulární (zde se váže ligand) a intracelulární, která disponuje tyrozinkinázovou aktivitou. Vlivem vazby s ligandem dojde k dimerizaci receptoru a následnou nitrobuněčnou fosforylací je spuštěna signální kaskáda, jež spustí negativní proces vedoucí k maligní transformaci buňky. Klinicky se tento proces projeví horší prognózou pro pacientku - agresivní chování nádoru, vyšší metastatický potenciál a zhoršená odpověď na chemoterapii. V současné době je nutné u každé pacientky stanovit expresi tohoto receptoru, stejně jako je již standardně prováděno vyšetření pozitivitu estrogenních a progesteronových receptorů.

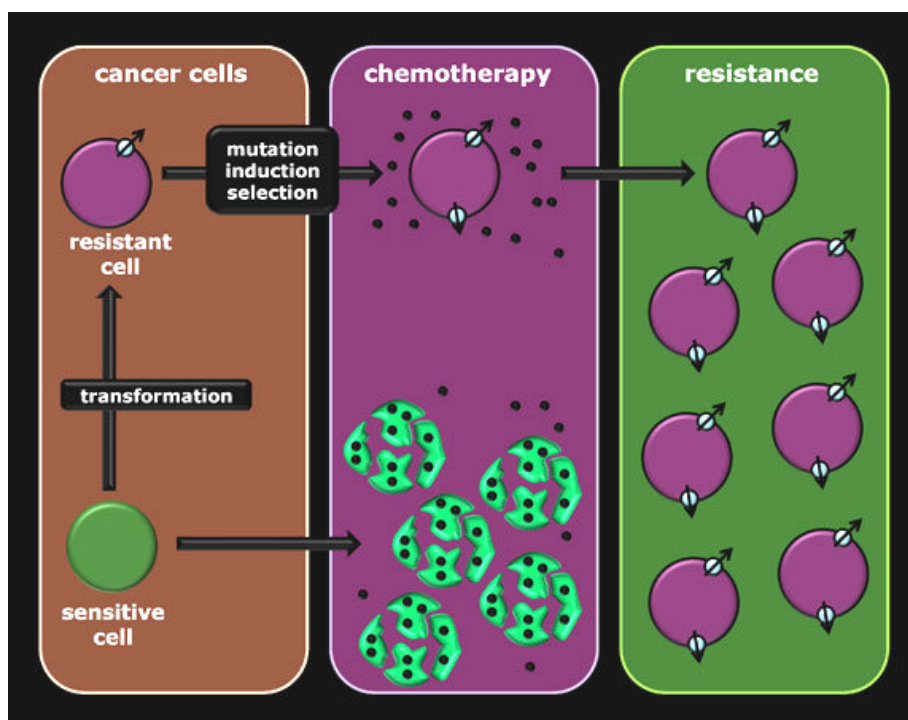
Podstatného pokroku se dosáhlo i v oblasti výzkumu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (*VEGF*) jako silného stimulatoru růstu endoteliálních cév (angiogeneze), které jsou pro růst nádorů životně důležité (Klener, 2005). Nejvíce propracované látky cílené molekulární léčby jsou monoklonální protilátky a nízkomolekulové tyrozinkinázové inhibitory. Klinické použití monoklonální protilátky proti *HER-2* v kombinaci s chemoterapií zahájilo novou etapu bioregulační nehormonální léčby karcinomu prsu.

Velkého pokroku v cílené léčbě karcinomu prsu bylo dosaženo použitím trastuzumabu, lapatinibu a bevacizumabu. V současnosti je cílená biologická léčba jednou z hlavních priorit protinádorového výzkumu. Nové léčebné postupy budou pacientkám „šity na míru“ a přesně směřovány na konkrétní cíle na mikromolekulární úrovni. Je jasné, že i přes vývoj nových cytostatik účinnost chemoterapie dosáhla svých možností. I když jsou perspektivy klasické chemoterapie omezené, má tato léčba stále své místo. Výsledky klinických studií jasně ukazují, že právě kombinace těchto dvou léčebných modalit (biologická léčba s chemoterapií) je výhodná.

3.2 Léková rezistence

Jednou z nejzávažnějších a také nejdůležitějších příčin selhání protinádorové léčby je léková rezistence. Je to schopnost buněk odolávat účinkům cytotoxických látek. Jsou-li

maligní buňky rezistentní vůči chemoterapii již při první léčbě, jde o tzv. primární neboli přirozenou rezistenci. Naopak sekundární (získaná) rezistence vzniká až během léčby a snižuje tak zpětně její účinnost (Nosková *et al.*, 2000).



Obr. č. 3: Získaná MDR jako důsledek chemoterapie. Fialová buňka značí buňku rezistentní a zelená buňku citlivou vůči chemoterapeutikům. Světle modré kolečko se šipkou na povrchu fialových rezistentních buněk představuje přemnožení (zvýšenou expresi) membránových ABC transportérů a šipka směr vyčerpávání účinné látky (chemoterapeutika, znázorněného černou tečkou) ven z buňky. (zdroj: <http://www.mindupbioresearch.com/mdr.html>)

Dojde-li ke ztrátě citlivosti vůči jednomu přípravku, může současně vzniknout rezistence na jiné, často strukturálně podobné cytostatikum. Jedná se o tzv. zkříženou rezistenci (Nosková *et al.*, 2000).

Mnohočetná léková rezistence (MDR, Obr. č. 3) byla poprvé popsána již v roce 1970 (Biedler *et Riehm*, 1970) a je příkladem zkřížené rezistence, kdy se protinádorová léčiva liší jak strukturně, tak mechanismem účinku. MDR vysvětluje případy necitlivosti některých nádorů k alternativní léčbě novými druhy cytostatik, jež nebyly použity v původní léčbě.

Za většinu pozorované MDR je zodpovědná zvýšená exprese ABC proteinů (Choi, 2005) - především ABCB1, ABCC1-9 a nedávno objeveného ABCG2 (Ferguson *et DeFlora*, 2005). Tyto membránové transportéry pumpují léčiva do extracelulárního

prostoru a tím snižují jejich cytotoxický účinek. MDR tak limituje efektivitu chemoterapie různých druhů zhoubných nádorů a je zodpovědná za celkově nízkou účinnost chemoterapie nádorů (Akan *et al.*, 2005; Choi, 2005; Thomas *et al.*, 2003; Liscovitch *et al.*, 2002).

Je důležité také zmínit, že ačkoli je fenomén MDR často používán pouze v souvislosti s protinádorovými léčivými, týká se i jiných léčiv jako jsou antibiotika, fungicidní nebo antiparazitální sloučeniny (Boumendjel *et al.*, 2006).

3.3 ABC transportéry

Přenos specifických molekul skrze semipermeabilní lipidovou membránu buněk je jednou ze základních funkcí všech živých organismů. Zajišťují je transmembránové přenašeče. Mezi největší a nejrozšířenější proteinové rodiny transmembránových přenašečů patří transportéry vázající ATP (ATP-binding cassette transporters, ABC transporters), také známé jako „traffic ATPases“. Tyto proteiny vážou ATP a jeho energii využívají k přenosu široké palety molekul (sacharidů, peptidů, proteinů, aminokyselin, fosfolipidů, kovových a organických iontů, léků a jiných xenobiotik) skrze plasmatickou membránu, intracelulární membránu endoplazmatického retikula, peroxizomu či mitochondrie (Borst *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 1999; Higgins, 1992). Zatímco prokaryotické ABC proteiny mohou mít funkci buď importérů, či exportérů, eukaryotické ABC proteiny jsou výlučně exportéry (Sharom, 2008).

Lidský genom obsahuje 49 ABC genů (Sharom, 2008), jež jsou na základě fylogenetických analýz rozdělovány do sedmi podrodin - ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF a ABCG (Dean *et al.*, 2001). Mutace v těchto genech mohou způsobit rozličná genetická onemocnění. Dodnes bylo popsáno celkem 14 ABC genů, které mají spojitost s 13 genetickými chorobami jako je cystická fibróza, poruchy přenosu cholesterolu či anémie (Borst *et al.*, 2002; Gottesman *et al.*, 2001). V mnoha případech, kdy byla k zacílení na defektní gen použita poziční klonovací technologie, byl objev ABC přenašeče jakožto příčiny onemocnění naprostým překvapením, poněvadž patofyziologie těchto onemocnění v žádném případě neukazovala na problém v transportu. Příkladem může být objevení defektního CFTR genu u cystické fibrózy (Riordan *et al.*, 1989), defektní ALDP gen u adrenoleukodystrofie (Shani *et al.*, 1998), defektní ABC1 cholesterolový přenašeč u Tangierovy choroby (Brooks-Wilson *et al.*, 1999; Rust *et al.*,

1999) nebo defekt v *ABCC6* genu u *pseudoxanthoma elasticum* (Ringpfeil *et al.*, 2000). Funkce ABC genů je velmi odlišná, proto není divu, že také genetická onemocnění jimi způsobená jsou různého charakteru.

Několik ABC transportérů slouží jako tzv. multidrug efflux pumps, které nejenže chrání buňky před endogenními toxiny, ale i cizorodými látkami, a to včetně vychytávání a distribuce léčiv (Schinkel *et Jonker*, 2003).

3.3.2 ABCC1 transportér

V této práci byl detailně sledován z hlediska exprese a genetické variability gen *ABCC1*. Předchozí studie totiž neprokázala vliv ABCB1/Pgp (Vaclavikova *et al.*, 2008) na klinicko-patologické charakteristiky pacientek s karcinomem prsu a pilotní studie naznačila, že *ABCC1* by u karcinomu prsu mohl mít efekt (Perglerová, 2010).

Transmembránový protein ABCC1 (MRP1) náleží do podrodiny ABCC, která zahrnuje celkem 13 proteinů. Patří sem 10 MRP, 2 sulfonfylmočovinné receptory (SUR1 a SUR2) a CFTR (cystic fibrosis conductance regulator). Poslední tři zmíněné proteiny a také MRP10 nejsou ve své podstatě transportéry. SUR1 (ABCC8) a SUR2 (ABCC9) jsou intracelulární čidla ATP/ADP a regulují propustnost specifických draselných kanálů. Není známo, že by se účastnily transportu jakýchkoli substrátů. Mutace v *ABCC8* podmiňují genetickou poruchu známou jako perzistující hyperinsulinemická dětská hypoglykémie. CFTR neboli ABCC7 je cAMP-regulovaný chloridový iontový kanál (Quinton, 1999) a jako takový není považován za přenašeče. Jeho mutace jsou příčinou cystické fibrózy (Riordan *et al.*, 1989). *MRP10* (*ABCC13*) je pseudogen kódující zkrácený protein, jenž je ve velké míře exprimován v lidském plodu. Přehled všech členů ABCC podrodiny, včetně jejich lokalizace, tkáňové exprese a biologické funkce, je zaznamenán v Tab. č. 4 na následující straně.

Tab. č. 4: Přehled proteinů ABCC (CFTR/MRP) podrodiny a jejich vlastností.

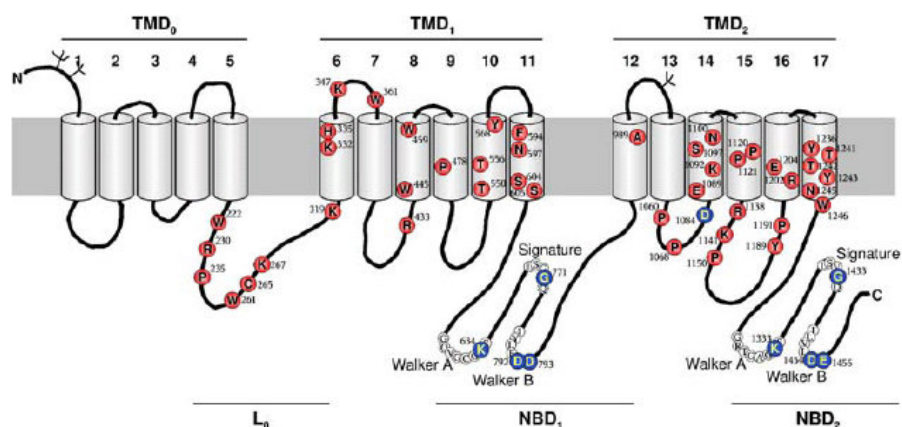
(zdroj: <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>)

Symbol (používané názvy)	Lokalizace	Délka mRNA transkriptu/ počet AMK	Tkáňová exprese	Biologická funkce
ABCC1 (MRP1/GS-X/ABC29)	16p13.1	6,5 kb/ 1531 AMK	většina tkání, zejména plíce a varlata laterální membrány	multispecifický transportér glutathionu, cysteinylových leukotrienů, aflatoxinu B1, glukuronidů, sulfátových konjugátů steroidních hormonů a žlučových solí, některých léčiv
ABCC2 (MRP2, cMOAT)	10q24	5,5 kb/ 1545 AMK	játra, střeva, ledviny apikální membrány	žlučový transportér xenobiotik, např. vinblastinu
ABCC3 (MRP3)	17q21.3	6,5 kb/ 1527 AMK	játra, střeva, ledviny laterální membrány	pravděpodobně transportér žlučové a střevní exkrece s organickými anionty
ABCC4 (MRP4)	13q32	6,5 kb/ 1325 AMK	většina tkání	transportér cyklických nukleotidů, nukleosidových monofosfátových analogů a prostaglandinů
ABCC5 (MRP5)	3q27	6,6 kb/ 1437 AMK	většina tkání, zejména játra	transportér cyklických nukleotidů, nukleosidových monofosfátových analogů
ABCC6 (MRP6)	16p13.1	6,5 kb/ 1503 AMK	ledviny, hepatocyty laterální membrány	transportér malých peptidů a GSH konjugátů
ABCC7 (CFTR)	7q31.2	6 kb	plíce, střeva, cholangiocyty	chloridový kanál
ABCC8 (SUR1)	11p15.1	5 kb/ 1581 AMK	slinivka	modulátor sensitivních draselných kanálů
ABCC9 (SUR2)	12p12.1	5 kb/ 1549 AMK	srdce a kosterní svalstvo, v ostatních tkáních nízké hladiny	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 prsni tkáň	neznámá
ABCC12 (MRP9)	16q12	5kb/ 1359 AMK	nízké hladiny ve všech tkáních	neznámá
ABCC13 (MRP10)	21q11.2	325 AMK	kostní dřev a periferní výskyt	neznámá

3.2.2.1 Struktura ABCC1

Gen *ABCC1* byl objeven v linii H69AR plicních nádorových buněk (Cole *et al.*, 1992). Leží na 16. chromozomu v pozici p13.1 a měří přibližně 200 kb, obsahuje 31 exonů a kóduje 190kDa membránový protein (ABCC1 neboli MRP1) obsahující 1531 aminokyselin (Cole *et al.*, 1992; Grant *et al.*, 1997; Hipfner *et al.*, 1999; Leslie *et al.*, 2001, 2005).

ABC proteiny sdílí obecnou molekulární stavbu. Skládají se ze dvou typů strukturálních domén: domény vázající nukleotid (nucleotid-binding domain, NBD), obsahující tři motivy (dva krátké ATP-vázající peptidové motivy - Walker A a Walker B - a mezi nimi ležící konzervovanou sekvenci C motivu) a transmembránové domény (TMD), které se zpravidla skládají ze šesti transmembránových šroubovic (Hyde *et al.*, 1990; Bakos *et Homolya*, 2007). Typický ABC transporter má dvě NBDs a dvě TMDs (Higgins, 1992). Protein ABCC1 obsahuje 17 transmembránových šroubovic (transmembrane helix, TMH) a dvě velké cytoplazmatické domény (NBDs) - jednu mezi TMH11 a TMH12 a druhou *downstream* (po proudu) od TMH17 (Leslie *et al.*, 2001, 2005). V těchto NBDs leží ony tři konzervované motivy zmíněné výše. Motiv Walker A je zapojen do vazby s β -fosfátem ATP, zatímco motiv Walker B interaguje s hořčnatými kationty. Třetí motiv je známý jako ABC podpisová sekvence (ABC signature sequence, LSGGQ) a byl identifikován jako možné vazebné místo γ -fosfátu ATP (Leslie *et al.*, 2005). Molekulární stavba proteinu ABCC1 je přehledně znázorněna na Obr. č. 4 na následující straně.



Obr. č. 4: Model membránové topologie ABCB1. Zobrazený model byl sestaven na základě sekvenčních analýz a vhodných experimentálních dat. TMD = transmembránová doména, NBD = doména vázající nukleotid, L₀ = spojovací oblast mezi TMD₀ a TMD₁. Mutace ovlivňující substrátovou specifitu a katalytickou aktivitu jsou označeny červenými a modrými značkami (zdroj: Bakos *et al.*, 2007).

3.2.2.2 Funkce ABCB1

ABCB1 transportér exportuje množství endogenních molekul fyziologického a klinického významu i celou řadu xenobiotik (Bakos *et al.*, 2007), jež jsou shrnuty v Tab. č. 5 na následující straně..

Značné množství výzkumů *in vitro* i *in vivo* dokazuje, že ABCB1 hraje roli v ochraně tkání před toxiny způsobujícími poškození (Leslie *et al.*, 2001). Chrání tkáň jako například kostní dřev, sběrné kanálky ledviny či orofaryngeální a střevní sliznici (Leslie *et al.*, 2005). Pravděpodobně je zapojen i do ochrany buněk před škodlivými účinky bilirubinu (Sharom, 2008).

Jedním z vedlejších efektů takové ochranné funkce je, že z buněk vyloučí také různé užitečné léčivé látky a podílí se tak na rezistenci buněk vůči působení léčiv, a to včetně chemoterapeutik. U ABCB1 byla prokázána účast na rezistenci vůči chemoterapii u rozličných typů solidních nádorů - tumoru plic, prsu, vaječníků, prostaty, tlustého střeva, neuroblastomu, melanoblastomu či různých forem leukémie (Hipfner *et al.*, 1999).

Léčiva exportovaná z buněk pomocí ABCB1 jsou aniontové povahy, často konjugovaná s glutathionem, glukuronidem či sulfátem, nebo jsou nekonjugovaná kotransportována s volným glutathionem (Borst *et al.*, 1999). Konjugáty všech tří aniontů

jsou shrnuty v Tab. č. 5. ABCC1 hraje tedy ústřední roli v homeostázi glutathionu *in vivo* a také exportuje LT₄ z mastocytů (Sharom, 2008).

Tab. č. 5: Klinicky významné léky a jiné sloučeniny interagující s ABCC1 (zdroj: Sharom, 2008; Bakos *et al.* Homolya, 2007).

<u>protinádorová léčiva</u> <ul style="list-style-type: none"> • alkaloidy <i>Vinca</i> (vinblastin a vincristin) • antracykliny (doxorubicin a daunorubicin) • epipodofyllotoxiny (etoposid a teniposid) • camptoteciny (topotecan a irinotecan) • metotrexát • antiandrogeny (flutamid) • taxany 	<u>konjugáty glutathionu</u> <ul style="list-style-type: none"> • leukotrien C₄, D₄ a E₄ • prostaglandin A₂-SG • hydroxynonenal-SG • aflatoxin B₁-epoxid-SG • melphalan-SG • cyklofosamid-SG • doxorubicin-SG
<u>inhibitory proteázy HIV</u> <ul style="list-style-type: none"> • ritonavir • saquinavir 	<u>konjugáty sulfátu</u> <ul style="list-style-type: none"> • estron-3-sulfát • dehydroepiandrosteron-3-sulfát • sulfatolitocholyt taurin
<u>inhibitory tyrosin kinázy</u> <ul style="list-style-type: none"> • imatinib mezylát • gefitinib 	<u>konjugáty glukuronidu</u> <ul style="list-style-type: none"> • glukuronosylbilirubin • estradiol-17-β-D-glukuronid • etoposid-glukuronid • NS-38-glukuronid
<u>peptidy</u> <ul style="list-style-type: none"> • glutathion (GSH, GSSG) 	<u>toxiny</u> <ul style="list-style-type: none"> • aflatoxin B₁
<u>antibiotika</u> <ul style="list-style-type: none"> • difloxacin • grepafloxacin 	<u>pesticidy</u> <ul style="list-style-type: none"> • fenitrothion • metoxychlor

3.2.2.3 Genetická variabilita ABCC1

Současný výzkum je soustředěn na roli polymorfizmů v genech kódujících ABC přenašeče v průběhu onkologické léčby, je zkoumán jejich vliv na míru exprese těchto přenašečů a na výsledky terapie (Choudhuri *et al.* Klaassen, 2006). U různých lidských populací bylo v *ABCC1* identifikováno mnoho jednonukleotidových polymorfizmů (single nucleotide polymorphisms, SNPs) a byly také zkoumány jejich haplotypy (Leschziner *et al.*, 2006; Conseil *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Oselin *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2002; Conrad *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001; Perdu *et al.* Germain, 2001).

SNP je bodová mutace, jež se vyskytuje alespoň u 1 % populace. SNPs můžeme rozdělit na synonymní (silent neboli neutrální mutace), které obvykle nemají významný vliv na fenotyp, a nesynonymní, které způsobují změnu v kódující sekvenci. Tyto nesynonymní SNPs mohou mít za následek rozdíly jak v hladině exprese proteinu, tak v jeho funkci, což ovlivní absorpci léku, koncentraci plazmy, distribuci a eliminaci. Podrobnosti o přirozeně se vyskytujících lidských polymorfizmech v ABC proteinech jsou dostupné v několika databázích – National Center for Biotechnology Information (NCBI), Pharmacogenetics Research Network, Japanese single nucleotide polymorphisms (Sharom, 2008). SNPs jsou považovány za hlavní příčinu různé odpovědi na léky u různých jedinců a etnických skupin (Sharom, 2008). Na základě SNPs lze konstruovat haplotyp daného genu.

Gen *ABCC1* vykazuje vysokou haplotypovou diverzitu a byly u něj zaznamenány výrazné rozdíly napříč etnickými skupinami (Wang *et al.*, 2005). Význam těchto variant a jejich potenciální role v transportu léčiv byly zkoumány prostřednictvím transfekce těchto proteinů do savčích buněčných linií a následnou charakterizací jejich expresních hladin a transportních funkcí (Conseil *et al.*, 2005; Letourneau *et al.*, 2005)

V literatuře existuje několik studií sledujících výskyt SNPs *ABCC1* v lidské populaci. Poměrně nedávno provedli Letourneau *et al.* (2005) opravdu důkladný výzkum funkčního významu deseti nesynonymních SNP, vedoucích k záměnám aminokyselin C43S (128G>C), T73I (218C>T), S92F (257C>T), T117M (350C>T), R230Q (689G>A), R633Q (1898G>A), R723Q (2168G>A), A989T (2965G>A), C1047S (3140G>C), R1058Q (3173G>A) a S1512L(4535C>T). Žádný z nich významně neovlivnil stupeň exprese, což signalizuje, že záměny aminokyselin se nemusí nutně projevit v ovlivnění syntézy a stability výsledného proteinu .

V jiné studii byly zkoumány neutrální varianty 816G>A, 825T>C, 1684T>C a 4002G>A z důvodu jejich vlivu na expresi mRNA v periferních buňkách CD4+ u zdravých německých dobrovolníků (Oselin *et al.*, 2003). Nebyly však pozorovány žádné významné rozdíly.

Conrad *et al.* (2001) identifikovali několik mutací v lidském *ABCC1*. Jedna z identifikovaných mutací G671V (2012G>T) byla pod zvláštním drobnohledem, jelikož je lokalizována v blízkosti NBD1, pouhých šest aminokyselin *upstream* (proti proudu) od konzervovaného motivu Walker A. Dřívější studie totiž prokázaly, že mutace v tomto motivu a jeho okolí mohou způsobit pokles transportní aktivity (Ramjeesingh *et al.*, 1999;

Gao *et al.*, 2000; Szakacs *et al.*, 2000). Navíc byla tato mutace spojena s nižšími hladinami mRNA (Conrad *et al.*, 2001). Navzdory těmto faktům však nebyly nalezeny žádné rozdíly v transportu organických aniontů oproti divokému typu ABCC1.

U některých mutací však vliv na ABCC1 prokázán byl. Například substituce vysoce konzervované Arg433 serinem (1299G>T) významně snižuje transport LTC₄ a sulfátu estronu a zvyšuje rezistenci vůči doxorubicinu (Conrad *et al.*, 2002). Nesynonymní SNP 128G>C (C43S) zase zhoršuje umístění proteinu do plazmatické membrány a také zvyšuje rezistenci na doxorubicin a arzenit sodný (Leslie *et al.*, 2003).

Doposud byly z důvodu vlivu na MDR zprostředkovanou ABCC1 zcela prozkoumány pouze tři přirozeně se vyskytující mutace (Gly671Val, Arg433Ser a Cys43Ser) (Conrad *et al.*, 2001, 2002; Leslie *et al.*, 2003). Další nesynonymní SNPs byly studovány pouze z důvodu transportu metotrexátu (Letourneau *et al.*, 2005; Warren *et al.*, 2008). Dále bylo zjištěno, že mutace v 2168G>A (Arg723Gln) významně snižuje rezistenci na daunorubicin, doxorubicin, etoposid, vinblastin a vincristin, kterou zprostředkovává právě ABCC1 (Yin *et al.*, 2009).

V této práci jsme se zaměřili na funkční doménu NBD1 genu *ABCC1*, kde může výskyt mutací i SNPs značně ovlivňovat výslednou transportní funkci proteinu. Celkem bylo sledováno 13 SNPs s neznámým klinickým významem (seznam viz Tab. č. 6 na následující straně).

Tab. č. 6: Přehled SNP v genu *ABCC1*, jimiž se tato práce zabývá.

NCBI SNP ID	pozice, nukleotidy	lokace	typ mutace	frekvence	frekvence genotypu		
				minoritní alely			
rs35623	-718G>T	intron 15	nekódující	T	G/G	G/T	T/T
				0,119	0,79	0,17	0,04
rs35625	-617C>T	intron 15	nekódující	C	C/C	C/T	T/T
				0,371	0,16	0,42	0,42
rs11866794	-609G>C	intron 15	nekódující	C	C/C	C/G	G/G
				0,132	0,00	0,26	0,74
rs4148350	+219G>T	intron 15	nekódující	T	G/G	G/T	T/T
				0,084	0,84	0,15	0,01
rs4148351	+310C>T	intron 15	nekódující	T	C/C	C/T	T/T
				0,115	0,79	0,19	0,02
rs35626	+357G>T	intron 16	nekódující	T	G/G	G/T	T/T
				0,322	0,50	0,36	0,14
rs35628	+848A>G	intron 16	nekódující	G	A/A	A/G	G/G
				0,102	0,81	0,17	0,02
rs4146353	+669A>C	intron 16	nekódující	C	A/A	A/C	C/C
				0,459	0,28	0,51	0,20
rs4148356	2168G>A	exon 17	R723Q	A	A/A	A/G	G/G
				0,027	0,00	0,05	0,95
rs2889517	+1108T>C	intron 17	nekódující	T	C/C	C/T	T/T
				0,283	0,51	0,41	0,08
rs3888565	-1217G>A	intron 18	nekódující	A	A/A	A/G	G/G
				0,190	0,05	0,28	0,67
rs3851711*	-1175C>T	intron 18	nekódující	G	A/A	A/G	G/G
				0,473	0,21	0,46	0,33

Frekvence genotypu a frekvence minoritní alely byly naměřeny u evropské populace (HapMap-CEU; zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

3.2.2.4 Exprese *ABCC1*

ABCC1 je exprimován ve většině tkání celého lidského těla např. v plicích, varlatech, ledvinách, kosterní a srdeční svalovině a placentě (Cole *et al.*, 1992; Flens *et al.*, 1996; St. Pierre *et al.*, 2000, viz Tab. č. 7). Zvýšená hladina exprese byla zjištěna u množství hematologických i solidních nádorů. Některé z nich jako např. nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC, nonsmall-cell lung cancer; Wright *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 2005) nebo chronická lymfoblastická leukémie (Juszczynski *et al.*, 2002) obecně vykazují vysoké hladiny exprese *ABCC1* a jsou rezistentní vůči mnoha léčivům. Naproti tomu jiné nádory, jako např. malobuněčný plicní karcinom (SCLC, small-cell lung carcinoma; Wright *et al.*, 1998), karcinom trávicího traktu (Endo *et al.*, 1996; Alexander *et al.*, 1999), neuroblastom (Norris *et al.*, 1996) a retinoblastom (Chan *et al.*, 1997) vykazují vysoké hladiny exprese *ABCC1*, ale s nižší frekvencí.

V polarizovaných buňkách je ABCC1 lokalizován převážně v bazolaterální plazmatické membráně (Hipfner *et al.*, 1994; Evers *et al.*, 1996; Roelofsen *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1998; Leslie *et al.*, 2005). V některých buněčných typech, jako jsou placentální syncytiotrofoblast či endoteliální buňky mozkových kapilár, je ABCC1 lokalizován v apikální membráně (St. Pierre *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004). Zatím však není známo, proč je tato membránová lokalizace buněčně specifická.

Několik nezávislých studií naznačuje, že exprese *ABCC1* je negativním prognostickým markerem pro některé histologické typy nádoru prsu. Tři z těchto studií došly k závěru, že *ABCC1* pozitivita u časných stádií rakoviny prsu byla spojena s dřívějším relapsem po postchirurgické adjuvantní chemoterapii (Rudas *et al.*, 2003; Nooter *et al.*, 1997a, 1997b). V naší studii jsme sledovali vztah mezi genotypem vyjádřeným SNPs ve funkční doméně *ABCC1* a fenotypem charakterizovaným hladinou transkriptu ve skupině pacientek s karcinomem prsu po chemoterapii. Chtěli jsme získat informace o možné indukci exprese *ABCC1* vlivem chemoterapie a úloze genotypu v tomto fenoménu. Studie podobného typu nebyla dosud zveřejněna. Dále nás zajímal funkční dopad genetické variability a genové exprese *ABCC1* ve vztahu k prognostickým faktorům a výsledku chemoterapie pacientek.

Tab. č. 7: Distribuce ABCC1. (zdroj: Bakos *et Homolya*, 2007).

Tkáň	Zvýšená exprese	Snížená/žádná exprese
Plíce	Epiteliální buňky průdušek a průdušinek, mucinózní žlázy, reaktivní pneumocyty typu II, alveolární makrofágy	Normální alveolární pneumocyty typu I a II
Varlata	Sertoliho buňky v semenných kanálcích, Leydigovy buňky, testosteron produkující intersticiální buňky vně semenných kanálků	
Ledviny	Fetální krevní cévy terminálních a intermediálních klků, glomeruly, epiteliální buňky Henleovy kličky	Buňky proximálního tubulu
Placenta	Syncytiotrofoblast, epiteliální buňky endoplacentálního žloutkového vaku	
Tenké střevo	Panethovy buňky	Enterocyty
Tlusté střevo	Vnitřní klky	
Mozek	Endoteliální buňky mozkových kapilár Choroidální a ependymální buňky, tanocyty v choroid plexus Gliální buňky, parenchymální astrocyty	
Krev	Erytrocyty, T-buňky, mastocyty	

4 Materiál a metody

4.1 Přístroje

Tab. č. 8: Přístroje použité při vypracování diplomové práce.

Přístroj	Použití	Dodavatel
Autokláv Nüve OT O32	Sterilizace materiálu	Nüve, Ankara, Turecko
Laminární box EN 12469	Práce s RNA	Schoeller Instruments, Praha, Česká republika
Centrifuga Hermle Z233MK-2	Centrifugace (odstředování)	Maschinenfabrik Berthold Hermle, Gosheim, Německo
Centrifuga Hermle Z360K	Centrifugace (odstředování)	Maschinenfabrik Berthold Hermle, Gosheim, Německo
Elektrický zdroj Owl EC-105 Compact	Elektroforéza	Thermo Scientific, Waltham, USA
Homogenizátor Precellys 24	Drcení tkání	Bertin technologies, Aix en Provence, Francie
PCR thermocykler GeneAmp 9600 PCR System	PCR, denaturace	Applied biosystems, Austin, USA
Přístroj Quantum TM	Příprava Milli-Q (ultračistá voda)	Millipore, Billerica, USA
Real-time PCR cykler RotorGene 6000	Real-time PCR, HRM analýza	Corbett Research, Sydney, Austrálie
Rotátor Bio rotator RS-Multi	Periodické míchání	Boeco, Hamburg, Německo
Sekvenátor ABI PRISM® 310 Genetic Analyser	Sekvence vzorků DNA	Applied biosystems, Austin, USA
Sekvenátor ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyser	Sekvence vzorků DNA	Applied biosystems, Austin, USA
Spektrofotometr Infinte M200	Stanovení koncentrace RNA/DNA	Tecan, Grodig, Rakousko
Sterilizátor Chiran HS 62 A	Sterilizace materiálu	LABO-MS, Praha, Česká republika
Transiluminátor Benchtop 2UV TM	Detekce vzorků na gelu	UVP, Upland, USA
Fotoaparát KODAK DC290	Focení gelu	Kodak, Rochester, USA

4.2 Chemikálie

Tab. č. 9: Chemikálie, jež byly použity při vypracování diplomové práce, řazeny dle dodavatele.

Dodavatel	Chemikálie/materiál
Ambion Foster City, USA	Nuclase-free Water (not DEPC-treated)
Applied biosystems Austin, USA	ABI PRISM [®] BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 5x Sequencing Buffer Hi-Di Formamide TaqMan [®] PreAmp Master Mix TaqMan [®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase [®] UNG Gene Expression Assays*: Hs00219905_m1, Hs00430290_m1, Hs00608519_m1, Hs00426752_m1, Hs00183533_m1
Invitrogen Gaithersburg, USA	TRIzol Reagent Quant-iT [™] PicoGreen [®] dsDNA Kit Quant-iT [™] RiboGreen [®] RNA Kit Primery ABCC1D1R1F, ABCC1D1R1R, ABCC1D1R2F, ABCC1D1R2R, ABCC1D1R3F, ABCC1D1R3R, ABCC1D1R4F, ABCC1D1R4R
Lachema Brno, Česká republika	Citronan sodný p.a.
MBI Fermentas Vilnius, Litva	RevertAid [™] First Strand cDNA Synthesis Kit
New England Biolabs Ipswich, USA	6x Loading Dye λ RNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> marker Φ X174 DNA- <i>HaeIII</i> Digest marker
Penta Praha, Česká republika	Etanol absolut Chloroform p.a.
Qiagen Hilden, Německo	HRM [™] Type-it [®] PCR Kit
Ridel-de Haën Hannover, Německo	EDTA
Sigma Aldrich Steinheim, Německo	Agarosa (for routine use) Ethidium bromid (0,1 μ g/ml)
Top-Bio Praha, Česká republika	10x PCR Blue Buffer Complete 10x PCR Red Buffer without Mg ²⁺ 50x dNTP Master Mix (12,5mM) MgCl ₂ (25mM) PCR H ₂ O

* Hs00219905_m1 = ABCC1
Hs00430290_m1 = UBB
Hs00608519_m1 = MRPL19
Hs00426752_m1 = ELF2B1
Hs00183533_m1 = IPO8

4.3 Soubor pacientů

Do studie bylo zařazeno celkem 191 pacientek s karcinomem prsu (dg. C50 dle UICC), které byly sledovány ve dvou pražských nemocnicích (FN královské Vinohrady a Medicon a.s.). V tomto souboru byly k dispozici vzorky tkání od 30 pacientek, které se před operací podrobily neoadjuvantní chemoterapii, režimům založeným na antracyklinech a/nebo taxanech. Vzorky nádorových i okolních nenádorových tkání byly odebrány během operace primářem MUDr. Václavem Pechou (Onkochirurgie, Medicon, Praha). Těmto a dalším pacientkám byly rovněž odebrány vzorky krve. Celkem tak bylo k dispozici 191 pacientek pro genetické analýzy v rámci této studie - 125 pacientek z Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV) v Praze a 66 pacientek z Medicon a.s. K odběrům krve byly použity Vacutainery s protisrážlivou látkou K₃EDTA.

Vzorky tkání byly histologicky zpracovány v biotické laboratoři Biolab Praha s.r.o. (spoluřešitel projektu MUDr. Markéta Trnková), kde proběhla histologická kontrola nádorových a nenádorových tkání. Do studie byly zařazeny pouze histologicky verifikované nádorové tkáně a nenádorové tkáně bez přítomnosti nádorových buněk. Do okamžiku izolace byly vzorky tkání uchovávány v hlubokomrazícím boxu při -80° C.

4.3.1 Klinicko-patologické údaje pacientek

Z lékařských záznamů byly získány základní klinicko-patologické informace o pacientkách a průběhu jejich onemocnění - především klinické stádium (před a po chemoterapii u neoadjuvantně léčených), patologické TNM dle UICC, histologický typ a stupeň nádoru, exprese receptorů pro estrogen, progesteron a Her-2, dávka, režim a odpověď na chemoterapii (viz Tab. č. 10 na následující straně).

Tab. č. 10: Klinicko-patologické charakteristiky pacientek.

Charakteristika	Typ	Počet pacientek/vzorků	Zastoupení v %
Stav menopauzy	premenopauzální	44	25
	postmenopauzální	132	75
	neznámo	15	-
Hormonální substituční terapie	ano	44	25,3
	ne	130	74,7
	neznámo	17	-
Osobní anamnéza nádorových onemocnění	pozitivní	10	5,5
	negativní	173	94,5
	neznámo	8	-
Histologický typ nádoru	Invazivní duktální	128	71,9
	jiný	50	28,1
	neznámo	13	-
Histologický stupeň (G)	I	35	24,1
	II	67	46,2
	III	43	29,7
	neznámo	46	-
Stádium (S)	0	9	5,9
	I	72	47,1
	II	63	41,1
	III	9	5,9
	IV	0	0
	neznámo	38	-
pT	T0	10	6,2
	T1	101	62,3
	T2	45	27,8
	T3	3	1,9
	T4	3	1,9
	neznámo	29	-
pN	N0	97	64,2
	N1	47	31,1
	N2	5	3,3
	N3	2	1,3
	neznámo	40	-
pM	M0	191	100
	neznámo	0	0
Expresce receptoru pro estrogen	pozitivní	97	59,9
	negativní	65	40,1
	neznámo	29	-
Expresce receptoru pro progesteron	pozitivní	91	57,2
	negativní	68	42,8
	neznámo	32	-
Expresce/amplifikace receptoru HER2	pozitivní	40	29,2
	negativní	97	70,8
	neznámo	54	-
Chemoterapie u souboru Medicin	antracykliny	29	43,9
	taxany	17	28,8
	antracykliny + taxany	19	25,8
	jiná	1	1,5

4.3.2 Informovaný souhlas pacienta

Všechny pacientky, jež se účastnily této studie, byly informovány o jejím účelu a svým podpisem potvrdily souhlas se svojí účastí ve studii (informovaný souhlas). Studie i formulář informovaného souhlasu byly schváleny Etickou komisí Státního zdravotního ústavu v rámci grantového projektu Interní grantové Agentury Ministerstva zdravotnictví ČR č.:9799-4.

4.4 Izolace RNA z tkáně

RNA byla izolována z tkáně metodou fenol-chloroformové extrakce s guanidin izothiokyanátem pomocí TRIzol Reagentu. Všechny použité kovové nástroje a plastové mikrozkušavky byly předem vysterilizovány (5 hodin při 130 °C).

Celá práce probíhala v laminárním boxu a vzorky tkání musely být před homogenizací drženy na suchém ledu, a to z důvodu degradace RNA při vyšších teplotách. Ke každému vzorku tkáně byl přidán 1 ml TRIzol Reagent, a poté byly podrceny v homogenizátoru PreCellys. Do podrcené směsi bylo přidáno 100 µl chloroformu, směs byla promíchána na vortexu a ponechána 3 minuty při laboratorní teplotě (cca 25 °C). Poté byly vzorky centrifugovány (15 min, 4 °C, 12000 otáček/min). Tím byla suspenze rozdělena na horní vodnou fázi obsahující RNA a dolní fenolovou část obsahující denaturované proteinové molekuly. Na rozhraní těchto dvou fází se nachází tenká vrstvička s DNA a částí proteinů. Díky použití pufru a fenolu s nízkým pH (<5) a chloroformu o nízké objemové koncentraci (do 20 % objemu fenolu) zůstává RNA ve vodné fázi, zatímco DNA je za těchto podmínek ve vodě nerozpustná. Guanidin izothiokyanát, obsažený v TRIzol Reagent, stabilizuje buněčný obsah a chrání RNA před účinkem RNáz, proto může být tento extrakt uchováván při -80 °C dlouhodoběji (převzato z pracovního manuálu pro TRIzol Reagent od Invitrogen).

Následně byla horní fáze přenesena do čisté mikrozkušavky, byl k ní přidán stejný objem ledového izopropanolu, směs byla promíchána a inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Dolní fáze a mezifáze byly dále využity pro izolaci DNA (viz kapitola 4.5). Směs horní fáze a izopropanolu byla centrifugována (5 min, 4 °C, 12000 otáček/min). Supernatant byl odstraněn, sediment promyt 500 µl 70% etanolu a centrifugován (5 min, 4 °C, 12000 otáček/min). Nakonec byla většina etanolu odstraněna, zbytek odpařen při 60 °C a vysušená peleta RNA byla rozpuštěna v příslušném množství

NF vody (40-120 μl , dle velikosti pelety). Takto získaná RNA byla uchovávána při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího použití.

4.5 Izolace DNA z mezifáze

Do mikrozkušavky se spodní fází a mezifází, zbylými z izolace RNA (viz předchozí kapitola 5.1), bylo přidáno 300 μl 100% etanolu. Směs byla důkladně promíchána, inkubována 3 minuty při laboratorní teplotě a poté centrifugována (5 min, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12000 otáček/min). Po odstředění se na dně mikrozkušavky objevila mléčně zakalená peleta. Supernatant, obsahující etanol, byl odstraněn, zbylá peleta byla dvakrát promyta 0,1M roztokem citronanu sodného a 30 minut inkubována za periodického míchání na rotátoru. Následovala centrifugace (5 min, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12000 otáček/min) a resuspendace DNA v 1 ml 75% ethanolu. Tato směs byla opět za periodického míchání a při laboratorní teplotě inkubována 20 minut. Poté byla směs centrifugována (5 min, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12000 otáček/min), supernatant byl odstraněn a zbytek etanolu vysušen při laboratorní teplotě. Nakonec bylo k peletě přidáno příslušné množství ultračisté vody (80-100 μl , dle velikosti pelety) a ta v ní byla rozpouštěna 10 minut při $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zkušavka byla poté uložena v lednici, kde byl roztok inkubován přes noc. Druhý den byl roztok stočen a odebrán do čisté zkušavky.

4.6 Izolace DNA z krve

Izolace DNA z krevních vzorků byla prováděna fenol-chloroformovou extrakcí. Touto metodou jsou bílkoviny extrahovány do organické fáze a DNA zůstává ve vodné fázi. Z ní je poté precipitována ethanolem a nakonec je rozpuštěna v ultračisté vodě.

Tato izolace byla provedena RNDr. Radkou Václavíkovou, PhD. a Ing. Lenkou Neufussovou. Koncentrace takto získané DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje Infinite M200. Zásobní roztoky DNA byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pracovní roztoky v lednici.

4.7 Horizontální elektroforéza na agarózovém gelu

Principem elektroforézy je rozdělení nabitých částic (např. proteinů, DNA či RNA) podle jejich elektroforetické pohyblivosti. Působící elektrická síla je v rovnováze s odporem prostředí (agarózového gelu) a rychlost nabitě částice je tedy téměř konstantní.

Fosfátové skupiny udělují molekule DNA parciální (částečný) záporný náboj, jehož velikost je dána v podstatě pouze délkou řetězce. Proto se vzorky při elektroforéze dělí především podle velikosti, případně podle tvaru.

Pro horizontální elektroforézu byl obvykle používán 1-3% (pro DNA, dle velikosti fragmentů), resp. 1% agarózový gel (pro RNA). Do 25 ml 0,5x TBE pufru bylo naváženo 0,75 g agarózy pro 3% nebo 0,25 g agarózy pro 1% gel. Z okrajů nádoby byla agaróza spláchnuta Milli-Q vodou a směs byla touto vodou doplněna na zhruba dvojnásobný objem (50 ml), a to z důvodu delšího a lepšího rozpuštění agarózy. Nádoba byla vložena do mikrovlnné trouby a zahřívána, dokud se všechna přidaná voda nevypařila a objem směsi v nádobě se nevrátil na původních 25 ml. Poté byla směs zchlazena pod tekoucí vodou zhruba na 60 °C, nalita do připravené vaničky na elektroforézu a byl do ní zasunut hřebínek, jenž vytváří jamky pro aplikaci vzorků. Po zatuhnutí gelu (min. 30 min) byl hřebínek vyndán a gel byl přenesen do elektroforetické aparatury, do lázně s 0,5x TBE puftrem. Do jamek, vzniklých po vyndání hřebínku, byly jednotlivě nanášeny vzorky obarvené 6x Loading Dye (na 5 µl vzorku postačuje 0,5 µl barviva). Do jedné jamky bylo vždy aplikováno 6 µl ΦX174 DNA-*HaeIII* Digest markeru, resp. λRNA/*EcoRI*+*HindIII* markeru. Aparatura byla poté zapojena do elektrické sítě a při napětí 100-110 V ponechána 25 (RNA)-45 (DNA) minut. Po ukončení elektroforézy byl gel přibližně na 10 minut umístěn do lázně s roztokem ethidium bromidu (1 mg/l) a následně na transluminátor, kde bylo pozorováno a fotoaparátem zaznamenáno rozdělení molekul DNA, resp. RNA v gelu.

4.8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace

Měření koncentrace DNA (resp. RNA) probíhalo na přístroji Infinite M200, jenž měří koncentraci na principu vazby fluorescenční barvy PicoGreen (RiboGreen) k nukleovým kyselinám. Jde o velmi citlivou metodu, až 1000x citlivější než je měření absorbance. Nadto ještě eliminuje příspěvek kontaminací, jako jsou bílkoviny a nukleotidy, běžně přítomné ve vzorcích nukleových kyselin.

Před měřením (nejlépe den předem, minimálně však 4 hodiny) byly vždy připraveny čerstvé roztoky, potřebné k měření. Množství roztoků odpovídalo počtu měřených vzorků. K měření bylo zapotřebí 3 roztoků (reagencie viz Tab. č. 11): 1/ 1x TE pufr, jenž vzniknul naředěním koncentrovaného 20x TE pufru, přítomného v kitu, 2/ Quant-iT pracovní roztok, jenž byl připraven naředěním komponenty A 200x v 1x TE pufru a 3/ pracovní roztok standardu (2 µg/ml), jenž vzniknul smícháním 4 µl komponenty B se 196 µl 1x TE pufru. Pro měření RNA byly připraveny ještě pracovní roztoky RNA, a to smícháním vždy 1-2 µl vzorku se 198-199 µl 1x TE pufru.

Tab. č. 11: Reagencie pro přípravu roztoků na měření koncentrace DNA/RNA.

	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 pro porovnání koncentrací byla připravena dle tabulky na následující straně (Tab. č. 12).

Tab. č. 12: Příprava standardní křivky.

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

Do jamek na 96-jamkové destičce bylo rozpipetováno 99 µl 1x TE pufru pro měření DNA, nebo 90 µl 1x TE pufru pro měření RNA, následně bylo do každé jamky přidáno po 1 µl vzorku DNA, nebo po 10 µl pracovního roztoku RNA. Nakonec bylo přidáno 100 µl komponenty A, a to jak pro měření DNA, tak pro měření RNA, jen s rozdílnou fluorescenční barvou viz Tab. č. 9 a 10.

Takto připravená destička byla ponechána 5 minut ve tmě na třepače a poté byla změřena koncentrace s excitačním maximem 480 nm a emisním maximem 520 nm.

4.9 Syntéza cDNA

Komplementární DNA (cDNA) byla připravována reverzní transkripcí z RNA pomocí reverzní transkriptázy, součásti RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit.

Nejprve bylo do každé mikrozkušavky napipetováno po 1 μ l náhodných hexamerů (0,2 μ g/ μ l). Množství bylo doplněno na 14 μ l Milli-Q vodou a vzorky obsahujícími 1 μ g RNA. Množství vzorku bylo vypočteno dle koncentrace RNA, naměřené v podkapitole 4.8.

Po promíchání a stočení byla směs inkubována 5 minut při 70 °C. Následně byla ochlazená na ledovém stojanu a byl k ní přidán mix, jenž byl během inkubace připraven následovně: na každý vzorek bylo potřeba smíchat 4 μ l pufru, 2 μ l 10mM směsi deoxynukleotidů (dNTP) a 1 μ l inhibitoru RNázy. Směs byla opět promíchána, stočena a ponechána 5 minut při laboratorní teplotě a následně zchlazena na ledovém stojanu. Jako negativní kontrola (bez reverzní transkriptázy) byly do čisté mikrozkušavky odebrány 2 μ l směsi, zatímco ke každému vzorku byl přidán 1 μ l reverzní transkriptázy (200 μ g/ μ l). Takto připravené vzorky i s kontrolou byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě, 60 minut při 42 °C (aktivace reverzní transkriptázy) a nakonec 10 minut při 70 °C (inaktivace reverzní transkriptázy).

Příprava cDNA (kromě kroků inkubace při teplotě vyšší než je laboratorní) probíhala v laminárním boxu, a to z důvodu ochrany RNA před RNázami. S hexamerem a vzorky RNA bylo třeba pracovat ve vychlazeném stojánku a samotný enzym a také inhibitor RNázy byly vytaženy z mrazáku těsně před použitím a ihned po použití opět vráceny.

4.10 Ověření kvality cDNA pomocí PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je metodou pro amplifikaci cílové sekvence DNA pomocí specifického páru primerů. Provádí se v termocykleru, jenž je schopen střídát různé teplotní režimy v krátkém časovém úseku během jednoho cyklu.

Kvalita cDNA byla zjištěna pomocí PCR pro kontrolní gen ubikvitin. Tento gen je exprimován ve všech tkáních a nemá pseudogeny. Primery byly navrženy tak, aby amplifikovaný úsek DNA obsahoval intron. Pokud by se tedy amplifikovala cDNA pouze z RNA, tudíž neobsahovala intron, byla by velikost PCR produktu 190 bp. Ovšem pokud

by byl vzorek kontaminován genomovou DNA (s intronem), byla by velikost produktu 1009 bp.

Reakční směs na PCR v přepočtu na jeden vzorek obsahovala 3,7 µl sterilní Milli-Q vody, 5 µl PCR mixu (MasterMix Combi PPP), 0,4 µl 10mM přímého (*forward*) primeru a 0,4 µl 10mM zpětného (*reverse*) primeru. Ke směsi bylo přidáno vždy 0,5 µl cDNA.

Reakční podmínky v termocykleru byly nastaveny následovně:

94 °C	5 minut	aktivace reverzní transkriptázy
38 cyklů:		
94 °C	30 sekund	rozvolnění cDNA
64 °C	30 sekund	nasednutí primerů
72 °C	30 sekund	prodlužování řetězců
72 °C	5 minut	dosyntetizování úseku DNA
8 °C	∞	

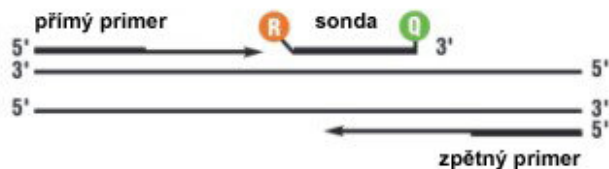
∞ ... udržování teploty do odebrání vzorků

4.11 Relativní kvantifikace genové exprese pomocí rtPCR

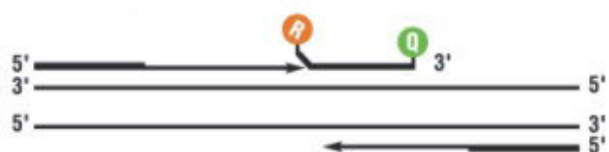
Metoda rtPCR umožňuje monitorovat koncentraci PCR produktu ve vzorku v reálném čase, tj. kdykoli během cyklu, oproti běžné PCR, kdy zjistíme až koncentraci konečného produktu. Velkou výhodou oproti klasické PCR je možnost kvantifikovat PCR produkt. Kvantifikace je buď relativní, kdy vzorky porovnáváme se vzorky kontrolními, nebo absolutní, kdy je sestavena kalibrační křivka, např. pomocí rekombinantní DNA sledovaného genu o známém množství. V této práci byla použita metoda relativní kvantifikace.

Pro real-time PCR je potřeba kromě páru primerů (přímý a zpětný) navrhnout i sondu, jež je na jednom konci značená emitorem fluorescence (fluorescenční barvou, např. FAM) a na druhém konci zhášedčem fluorescence (např. TAMRA). V prodlužovací fázi každého cyklu se tato sonda odbourává 5' → 3' exonukleázovou aktivitou polymerázy, dojde k oddělení obou konců sondy a tím k fluorescenci (viz Obr. č. 5 na další straně). Ta je zaznamenávána speciálním senzorem termocykleru, ve kterém PCR probíhá. Čím více se sonda odbourává, tím je fluorescence silnější.

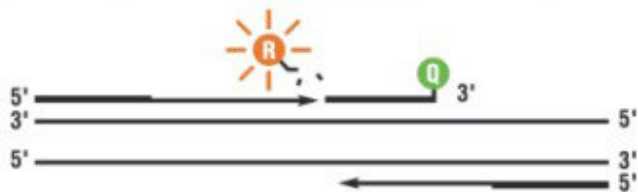
1. Polymerizace: Fluorescenční barva (R) a její zhášec (Q) jsou navázány na 5' a 3' konce TaqMan sondy.



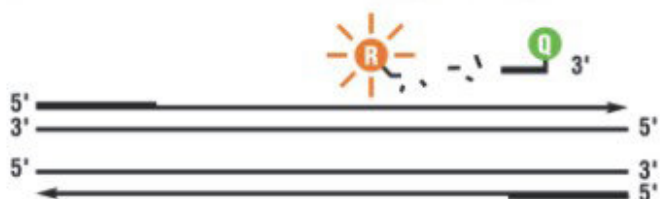
2. Elongace řetězce: Dokud je sonda intaktní, záření emitované barvou je pohlcováno zhášecem.



3. Odštěpení: Jakmile Taq polymeráza dorazí k začátku sondy, začne ji postupně odbourávat, až odštěpí fluorofor. Ten se tímto oddálí od zhášece a emitované světlo přestane být pohlcováno. Detekovaná fluorescence stoupá.



4. Ukončení polymerizace: Barva R oddělená od zhášece emituje charakteristickou fluorescence.



Obr. č. 5: Průběh real-time PCR. R = fluorescenční barvivo (fluorofor, reporter), Q = zhášec fluorescence (quencher). (zdroj: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>)

4.11.1 Preamplifikační PCR

Před samotnou rtPCR byly vzorky cDNA preamplifikovány. Účelem preamplifikace bylo připravit dostatečné množství cDNA pro studium exprese většího počtu genů a také zvýšit citlivost jejich detekce. Do preamplifikace byly zařazeny primery pro sledovaný kandidátní gen (*ABCCI*) a použité referenční geny.

Nejprve bylo nutné připravit tzv. TaqMan PreAmp Pool. Bylo smícháno po 10 μ l 20 \times TaqMan Gene Expression Assay každého ze sledovaných genů a naředěno 1 \times TE pufrem do celkového objemu 1 ml. Z této směsi bylo odebráno 12,5 μ l, přidáno k 25 μ l 2 \times Taqman[®] PreAmp Master Mix. Takto připravený reakční mix byl rozpipetován do mikrozkušavek, k němu bylo přidáno 12,5 μ l naředěné cDNA (5 μ l cDNA v 7,5 μ l NF vody) a mikrozkušavky byly vloženy do termocykleru GeneAmp 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Reakční podmínky pro preamplifikaci byly nastaveny takto:

95 °C	10 minut	počáteční denaturace
14 cyklů:		
95 °C	15 sekund	rozvolnění cDNA
60 °C	4 minuty	nasednutí primerů
		prodlužování řetězců
8 °C	∞	

∞ ... udržování teploty do odebrání vzorků

Po skončení reakce byly vzorky uchovávány při -20 °C do dalšího použití nebo ihned 1:20 naředěny 1 \times TE pufrem pro rtPCR.

4.11.2 Test účinnosti preamplifikace

Účinnost preamplifikace byla zjištěna porovnáním exprese referenčních genů preamplifikované a neamplifikované cDNA.

Neamplifikovaná cDNA byla naředěna na výslednou koncentraci 0,3 ng/ μ l, tedy 2,4 μ l cDNA bylo smícháno s 47,6 μ l 1 \times TE pufru. Všechny preamplifikované vzorky cDNA byly ředěny 1:20 (viz výše, kapitola 4.11.1). Po naředění zacházíme

s preamplifikovanou i neamplifikovanou cDNA stejně. Odebereme 2,5 µl cDNA a smícháme se 7,5 µl reakčního mixu, který v přepočtu na vzorek obsahoval 2 µl NF vody, 0,5 µl TaqMan® Gene Expression Assays (směs dvou neznačených primerů (18µM) a 6-FAM™ značené TaqMan sondy s MGB (5µM)) a 6 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix, který již v sobě zahrnuje všechny další potřebné komponenty (AmpliTaq Gold DNA polymerázu, AmpErase UNG, dNTP, dUTP, pasivní referenční barvivo ROX™ a optimalizovaný pufr). Pro přesnější měření byly vzorky stanovovány v duplikátech.

Reakční podmínky byly následující:

50 °C	2 minuty	aktivace AmpErase UNG
95 °C	10 minut	denaturace a aktivace polymerázy
40 cyklů:		
95 °C	15 sekund	nasednutí sondy a primerů
60 °C	1 minuta	prodlužování řetězců

Účinnost preamplifikace byla stanovena na základě hodnoty $\Delta\Delta C_T$ dle vztahu:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{preamplifikovaná cDNA}) - \Delta C_T (\text{neamplifikovaná cDNA})$$

Pro výpočet průměrného C_T duplikátů bylo potřeba nejprve vypočítat ΔC_T pro neamplifikovanou i preamplifikovanou cDNA. Výpočet pro oba typy cDNA probíhá stejně - od průměrného C_T sledovaného genu bylo odečteno průměrné C_T referenčního genu:

$$\Delta C_T (\text{cDNA}) = C_T \text{ cílového genu} - C_T \text{ referenčního genu}$$

Hodnoty $\Delta\Delta C_T$ blízké 0 ($\pm 1,5$) signalizovaly dostatečnou účinnost preamplifikace.

4.11.3 Real-time PCR

Míra exprese genů byla měřena metodou kvantitativní rtPCR, tzn. že byl sledován relativní poměr exprese sledovaného genu k expresi referenčních genů.

Nejprve byl připraven stejný mix jako v předchozí kapitole. Jako kalibrátor byl vybrán vzorek zdravé tkáně, k němuž nebyla dodána tkáň nádorová. Z něj byla posléze vytvořena ředící řada na kalibrační křivku, kdy byl tento kalibrátor naředěn 5x, 25x, 125x

a 625x. Do 0,1 µl mikrozkušavek bylo napipetováno nejprve po 7,5 µl připraveného mixu, poté po 2,5 µl každý článek ředící řady. Do ostatních mikrozkušavek bylo k mixu přidáno 2,5 µl 4x naředěné preamplifikované cDNA (nádorové tkáně nebo okolní nenádorové tkáně). Pro přesnější měření byly vzorky nanášeny po dvojicích (v duplikátech). Jako negativní kontrola byla do dvou mikrozkušavek nanesena NF voda (opět 2,5 µl). Real-time PCR pro gen *ABCC1* i pro referenční geny (*UBB*, *IPO8*, *ELF2B1* a *MRPL19*) byla prováděna na přístroji RotorGene 6000 v následujícím programu:

50 °C	2 minuty	aktivace uracil-N-glykosylázy
95 °C	10 minut	denaturace a aktivace polymerázy
50 cyklů:		
95 °C	15 sekund	nasednutí sondy a primerů
60 °C	1 minuta	prodlužování řetězců

Nakonec byly výsledky vyhodnoceny v počítačovém programu RotorGene 6000 Series Software verze 1.7. Výsledkem byly hodnoty C_T neboli *cycle threshold*, které odpovídají cyklu, kdy fluorescence dosáhla prahové hodnoty (*threshold*). Tento cyklus odpovídá okamžiku, kdy začne množství produktu exponenciálně růst a lze jej stanovit automaticky softwarovým programem nebo manuálně.

4.12 Genotypizace *ABCC1* - stanovení SNPs

4.12.1 HRM analýza

HRM (High Resolution Melting) analýza je vysoce účinná postPCR metoda pro stanovování mutací, SNPs a celých sekvencí vzorků DNA. Rozlišuje vzorky DNA na základě jejich teploty tání a detekuje tak i malé rozdíly v sekvencích.

Nejprve je třeba zkoumanou oblast namnožit prostřednictvím PCR, kdy je do reakce přidáno ještě speciální interkalační barvivo (např. LC Green, SYTO Dye, EvaGreen), které emituje fluorescenci pouze v přítomnosti dvouvláknové DNA. Amplifikovaná oblast zájmu se pak nazývá ampikon. Zvyšující se koncentrace ampikonu, zvyšuje fluorescenci. Po skončení PCR je spuštěna HRM analýza. Ampikon DNA je postupně zahříván

od cca 50 °C do cca 95 °C. Jakmile teplota dosáhne bodu tání ampliconu, DNA se denaturuje, vlákna se od sebe oddělují a fluorescence slábně.

Nejdříve byla připravena reakční směs, která v přepočtu na vzorek obsahovala 6,25 µl 2x HRM PCR Master Mix (obsahující HotStarTaq[®] Plus DNA polymerázu, Type-it HRM PCR pufr s barvivem EvaGreen[®], Q-Solution[®], směs dNTP), 2,875 µl vody bez RNáz a 0,875 µl směsi přímých a zpětných primerů (10µM). Tato reakční směs byla po 10 µl rozpipetována do 0,1µl mikrozkušavek a k ní bylo přidáno po 2,5 µl vzorků DNA. Jako negativní kontrola byla do dvou mikrozkušavek k mixu přidána voda bez RNáz.

Mikrozkušavky byly vloženy do přístroje RotorGene 6000. Nejprve proběhla klasická rtPCR s následujícími podmínkami:

95 °C	5 minut
-------	---------

50 cyklů:

95 °C 10 sekund

60 °C 30 sekund

Poté byl spuštěna HRM analýza s postupným zvyšováním teploty z 65 °C do 85 °C. S každým cyklem byla teplota navýšena o 0,1 °C.

Výsledky byly analyzovány v počítačovém programu RotorGene 6000 Series Software verze 1.7.

Touto metodou byl stanovován SNP rs2889517 genu *ABCC1*.

4.12.2 Sekvenování

Sekvenování (sekvenace, sekvencování) DNA je souhrnný název několika metod, jimiž je zjišťována primární struktura úseků DNA, tedy pořadí jednotlivých nukleotidů.

4.12.2.1 Amplifikace úseků pomocí PCR

V této práci byly zkoumány 4 oblasti genu *ABCC1* obsahující 13 SNPs. Tyto oblasti bylo nutno nejprve namnožit pomocí PCR. Reakční podmínky PCR musely být optimalizovány pro každou oblast zvlášť, a to jak teplota nasedání primerů, tak složení

reakční směsi. Nanášeno bylo vždy 9 µl reakční směsi a 1 µl DNA vyizolované z krve (20 ng/µl).

Optimalizované reakční podmínky a reakční směsi pro jednotlivé oblasti byly následující:

Oblast 1:

Reakční směs (v přepočtu na vzorek):

4,2 µl Milli-Q vody, 1 µl červeného pufru TopBio (bez Mg^{2+}), 1 µl 8mM $MgCl_2$, 0,8 µl 2,5mM dNTP, 0,5 µl 10µM přímého primeru, 0,5 µl 10µM zpětného primeru a 1 µl bílé Taq polymerázy TopBio

Reakční podmínky:

94 °C	5 minut
-------	---------

35 cyklů:

94 °C 30 sekund

63 °C 30 sekund

72 °C 30 sekund

72 °C	5 minut
-------	---------

8 °C ∞

Oblast 2:

Reakční směs (v přepočtu na vzorek):

4,2 µl Milli-Q vody, 1 µl červeného pufru TopBio (bez Mg^{2+}), 1 µl 16mM $MgCl_2$, 0,8 µl 2,5mM dNTP, 0,5 µl 10µM přímého primeru, 0,5 µl 10µM zpětného primeru a 1 µl bílé Taq polymerázy TopBio

Reakční podmínky:

94 °C	5 minut
-------	---------

35 cyklů:

94 °C 30 sekund

68 °C 1 minuta

72 °C	5 minut
-------	---------

8 °C ∞

Oblast 3:

Reakční směs (v přepočtu na vzorek):

5,2 µl Milli-Q vody, 1 µl modrého pufru complete TopBio, 0,8 µl 2,5mM dNTP, 0,5 µl 10µM zpětného primeru, 0,5 µl 10µM zpětného primeru a 1 µl bílé Taq polymerázy TopBio

Reakční podmínky:

94 °C	5 minut
-------	---------

35 cyklů:

94 °C 30 sekund

63 °C 30 sekund

72 °C 30 sekund

72 °C	5 minut
-------	---------

8 °C ∞

Oblast 4:

Reakční směs (v přepočtu na vzorek):

5,2 µl Milli-Q vody, 1 µl modrého pufru complete TopBio, 0,8 µl 2,5mM dNTP, 0,5 µl 10µM přímého primeru, 0,5 µl 10µM zpětného primeru a 1 µl bílé Taq polymerázy TopBio

Reakční podmínky:

94 °C	3 minuty
-------	----------

10 cyklů:

94 °C 30 sekund

65-55 °C * 30 sekund

72 °C 30 sekund

25 cyklů:	
------------------	--

94 °C	30 sekund
-------	-----------

65 °C	30 sekund
-------	-----------

72 °C	30 sekund
-------	-----------

8 °C ∞

* každý cyklus snížení teploty o 1 °C

Pro ověření úspěšnosti amplifikace byla po každé PCR provedena horizontální elektroforéza na 3% agarózovém gelu.

4.12.2.2 Sekvenační PCR

Sekvenační PCR je v principu tzv. nested PCR, kdy se amplifikuje produkt předchozí PCR. Pro sekvenační PCR tedy není potřeba dvojice primerů a je třeba přítomnost pouze jednoho z nich - komplementárního vůči vlákně, které je třeba přečíst.

Tato metoda byla prováděna pomocí kitu ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Reakční směs obsahovala v přepočtu na vzorek 1 μ l 2,5x BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Premix, 0,5 μ l sekvenačního pufu BigDye[®] Terminator, 0,25 μ l 10 μ M sekvenačního primeru a 2,75 μ l Milli-Q vody. Nanášeno bylo vždy 4,5 μ l reakční směsi a 0,5 μ l produktu PCR (DNA).

Reakční podmínky byly stanoveny následovně:

96 °C	1 minuta
30 cyklů:	
96 °C	10 sekund
50 °C	5 sekund
60 °C	4 minuty
4 °C	∞

4.12.2.3 Purifikace sekvenačních produktů

Před samotnou sekvenací bylo vždy potřeba sekvenační produkty přečistit. Nejprve bylo ke všem vzorkům přidáno 0,5 μ l 125mM EDTA, 0,5 μ l 3M acetátu sodného a 12,5 μ l 100% etanolu. Směs byla pečlivě promíchána a ponechána při laboratorní teplotě 15 minut ve tmě. Po inkubaci byla směs centrifugována (15 min, 4 °C, 5000 otáček/min). Z důvodu odstranění supernatantu byly mikrozkmavky odvíčkovány, obráceny, překryty buničinou a centrifugovány (1 min, 4 °C, 200 otáček/min). Poté do nich bylo nanášeno 17,5 μ l 70% etanolu a zavíčkované byly centrifugovány (5 min, 4 °C, 5000 otáček/min). Supernatant byl odstraněn stejným způsobem viz výše, poté bylo ještě jednou přidáno 17,5 μ l 70%

etanolu, za stejných podmínek zcentrifugováno a supernatant opět odstraněn. Nakonec byl zbylý etanol z mikrozkušavek vysušen (15 min, 50 °C).

Takto vyčištěné a vysušené vzorky bylo možné zamrazit (-80 °C) a po delší dobu uchovat. Nebo k nim bylo rovnou přidáno 10 µl deionizovaného formamidu a takto byly ponechány přes noc (nejméně však 4 hodiny), aby došlo k rozpuštění pelety. Před samotnou sekvenací bylo nutné rozpuštěnou DNA ještě zdenaturovat (5 min, 95 °C) a přenést do mikrozkušavek kompatibilních se sekvenátorem.

4.12.2.4 Sekvence

Přečištěné a zdenaturované vzorky byly osekvenovány na přístroji ABI PRISM[®] 3100 Avant Genetic Analyser se 16 kapilárami pod dohledem RNDr. Martina Musílka, Ph.D., resp. na jednokapilárovém přístroji ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyser pod dohledem Ing. Ivony Hlavaté, resp. Mgr. Veroniky Brynychové.

4.13 Statistická analýza

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 (χ^2) test. Pro analýzy vztahů genové exprese, věku při diagnóze a velikosti nádorů k faktoriálním veličinám, jako jsou SNP nebo některá klinická data, byl použit parametrický test ANOVA. Rozložení velikosti nádorů bylo významně odlišné od normálního rozložení (podle testu Kolmogorova-Smirnova) a proto bylo logaritmicky normalizováno. Spojité veličiny (např.: věk při diagnóze vs. exprese nebo velikost nádoru vs. exprese) byly korelovány pomocí parametrického Pearsonova testu. K vyjádření rozdílů mezi expresí v nádorové a nenádorové tkáni byl použit párový T-test a rovněž REST2009 software, který je pro tyto účely doporučován. Rozdíly a vztahy dosahující hladiny významnosti nižší než 0,05 (všechny testy použity jako oboustranné) byly považovány jako statisticky významné a prezentovány ve výsledkové části.

5 Výsledky

5.1 Charakteristika sledovaného souboru pacientek

Soubor pacientek sledovaný v této práci byl charakterizován na základě klinicko-patologických údajů (viz kapitola 4.3.1, Tab. č. 10). Jednalo se o pacientky s karcinomem prsu s průměrným věkem $58,0 \pm 10,5$ let. Jednalo se o dva soubory sledované ve dvou pražských nemocnicích. Oba soubory se lišily především v některých charakteristikách, na jejichž základě je volena léčba. Soubor z FNKV ($n=125$) tvořily neselektované pacientky s ohledem na datum první diagnózy a další klinická data kromě stádia nádoru. Pacientky v generalizovaném stádiu IV nebyly v rámci této studie studovány, protože by mohly ovlivnit vztahy biomarkerů k přežívání. Pacientky ze souboru FNKV byly léčeny standardními režimy v adjuvantním podání, tj. u hormonálně pozitivních antiestrogeny nebo inhibitory aromatáz a u hormonálně negativních chemoterapií obvykle na bázi antracyklinů nebo taxanů. Soubor byl studován s cílem odhalit eventuální vztahy genetické variability *ABCC1* k prognostickým faktorům karcinomu prsu. Pacientky ze souboru sledovaného v Mediconu ($n=66$) byly léčené jak adjuvantně, režimy aplikované po předchozí chirurgické léčbě (ve všech případech se jednalo o FAC/FEC, následované taxany - docetaxel nebo paklitaxel; $n=28$), tak neoadjuvantně, režimy založenými na taxanech či antracyklinech ($n=38$). Soubor neoadjuvantně léčených pacientek byl primárně určen ke sledování markerů rezistence (např.: *ABCC1* v této práci) vůči chemoterapii na základě antracyklinů a taxanů, tj. k hledání prediktivních faktorů úspěšnosti léčby.

5.2 Preamplifikace vzorků cDNA nádorové a nenádorové tkáně a test účinnosti preamplifikace

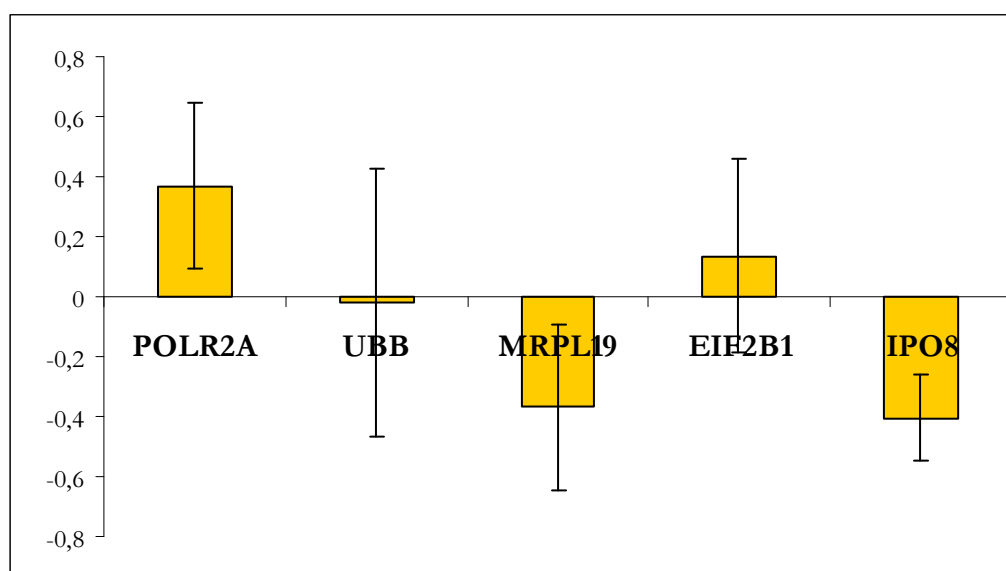
Ze 28 párů nádorové a nenádorové tkáně a z 2 nepárových nádorů pacientek s neoadjuvantně léčeným karcinomem prsu byla úspěšně izolována RNA a poté syntetizována cDNA. Vzorky cDNA byly následně použity k specifické preamplifikaci pomocí PCR reakce, umožňující stanovení genové exprese s velmi malou spotřebou výchozího materiálu. Účinnost provedené preamplifikace byla hodnocena tzv. „Testem účinnosti preamplifikace“ (viz kapitola 4.11.2), kde je porovnávána genová exprese

neamplifikované a preamplifikované cDNA v rtPCR reakci na základě hodnot C_T . Výsledky preamplifikačního testu jsou uvedeny v Tab. č. 13.

Tab. č. 13: Účinnost preamplifikace vzorků cDNA.

Vzorek P147V	Název genu	Referenční gen	C_T	Průměrné C_T	SD	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$
PreAmp	POLR2A	MRPL19	20,59	20,615	0,025	-1,945	0,37
PreAmp			20,64				
NeAmp			30,69	30,645	0,045	-2,315	
NeAmp			30,6				
PreAmp	UBB	POLR2A	18,94	18,98	0,0	-1,635	-0,02
PreAmp			19,02				
NeAmp			29,04	29,03	0,01	-1,615	
NeAmp			29,02				
PreAmp	MRPL19	POLR2A	22,62	22,56	0,06	1,945	-0,37
PreAmp			22,5				
NeAmp			32,94	32,96	0,02	2,315	
NeAmp			32,98				
PreAmp	EIF2B1	POLR2A	21,25	21,29	0,04	0,675	0,135
PreAmp			21,33				
NeAmp			31,11	31,185	0,075	0,54	
NeAmp			31,26				
PreAmp	IPO8	POLR2A	25,99	25,89	0,1	5,275	-0,405
PreAmp			25,79				
NeAmp			36,38	36,325	0,055	5,68	
NeAmp			36,27				

Hodnoty $\Delta\Delta C_T$ blízké 0 ($\pm 1,5$) znamenají dostatečnou účinnost preamplifikace.



Graf č. 4: Výsledné hodnoty testu účinnosti preamplifikace. Znázorněn medián $\Delta\Delta C_T$ referenčních genů.

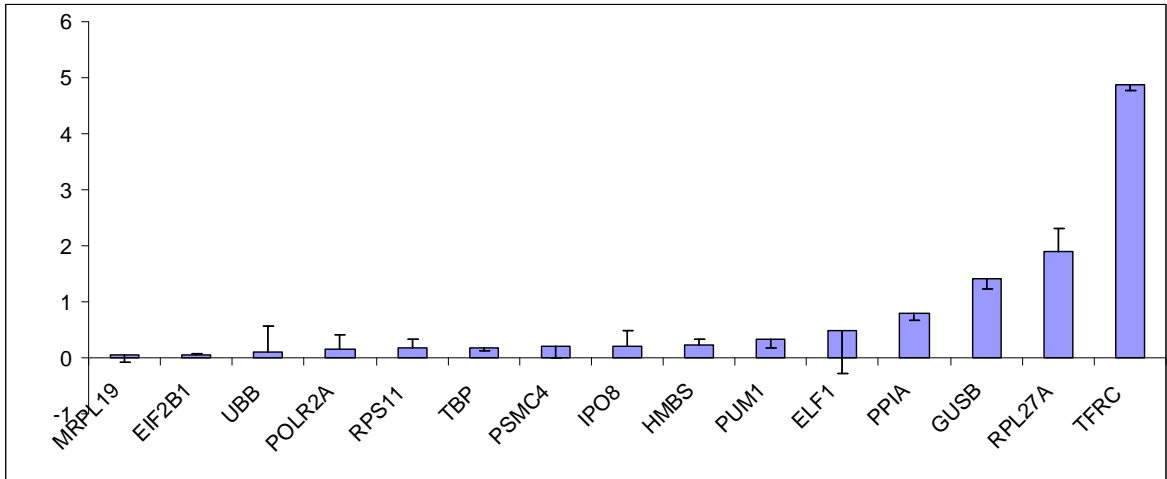
5.3 Výběr referenčních genů

Pro sledování genové exprese pomocí rtPCR s relativní kvantifikací bylo nejprve nutné vybrat vhodné referenční geny, vůči kterým bude exprese normalizována. Bylo použito celkem 16 referenčních genů (viz Tab. č. 14), u kterých byla změřena exprese pomocí rtPCR (bylo použito 15 párových tkání - nádorová a nenádorová). Na základě hodnot C_T byly pomocí softwarových programů GeNorm (verze 3.5 z března 2007, Vandersompele *et al.*, 2002) a NormFinder (verze 19 z června 2009, Andersen *et al.*, 2004) vybrány 4 nejvhodnější referenční geny, které měly jednak nejnížší interindividuální variabilitu exprese a jednak byly nejstabilnější z hlediska exprese v párové - nádorové a okolní nenádorové - tkáni prsu (Graf č. 5 - NormFinder a Graf č. 6 - GeNorm). Mezi nejstabilnějšími geny figurovaly *EIF2B1*, *MRPL19*, *UBB* a *IPO8*, které byly použity jako referenční v dalších analýzách

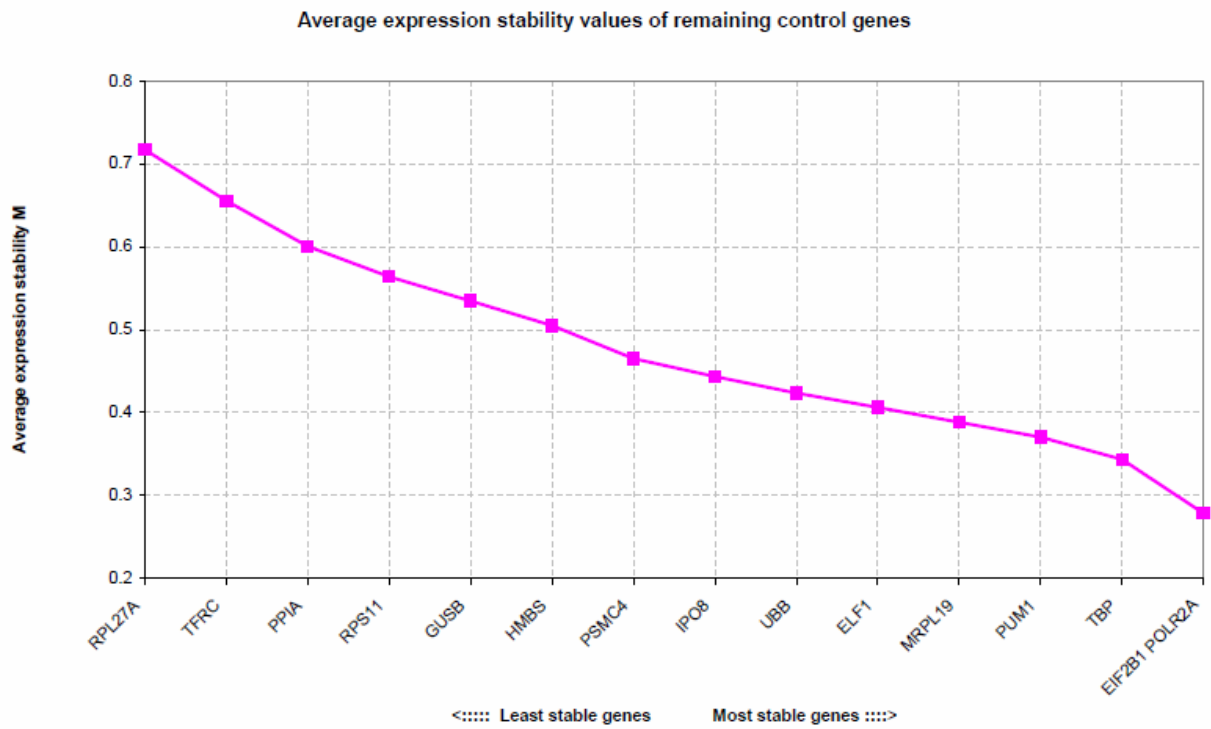
Tab. č. 14: Seznam 16 referenčních genů.

Referenční gen	Celý název	Hs
18S	18S podjednotka ribozomální RNA	x
GUSB	Gen pro beta-D-glukuronidázu	Hs99999908_m1
POLR2A	Gen pro menší podjednotku DNA řízené RNA polymerázy II	Hs00172187_m1
TFRC	Gen pro transferinový receptor	Hs99999911_m1
IPO8	Gen pro importin 8	Hs00183533_m1
HMBS	Gen pro hydroxymethylbilansyntázu	Hs00609297_m1
PSMC4	Gen pro proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4	Hs00197826_m1
PUM1	Pumilio homolog 1 (Drosophila)	Hs00206469_m1
ELF1	Gen pro E74-like faktor 1	Hs00152844_m1
ELF2B1	Gen pro ETS family transkripční faktor (Mus musculus)	Hs00426752_m1
MRPL19	Gen pro mitochondriální ribozomální protein L19	Hs00608519_m1
UBB	Gen pro ubikvitin B	Hs00430290_m1
PPIA	Gen pro peptidylprolyl izomerázu A (cyklofilin A)	Hs01565700_g1
TBP	Gen pro TATA box binding protein (TATA box vázající protein)	Hs00427621_m1
RPL27A	Gen pro ribozomální protein R27A	Hs00741143_s1
RPS11	Gen pro ribozomální protein S11	Hs00817975_g1

Referenční geny byly vybrány pomocí předdefinovaných *TaqMan Array Plates* obsahujících 16 endogenních kontrol vybraných ze seznamu dostupného na webových stránkách výrobce (Applied Biosystems).



Graf č. 5: Hodnocení stability referenčních genů programem NormFinder. Nejstabilnější geny jsou řazeny zleva do prava.

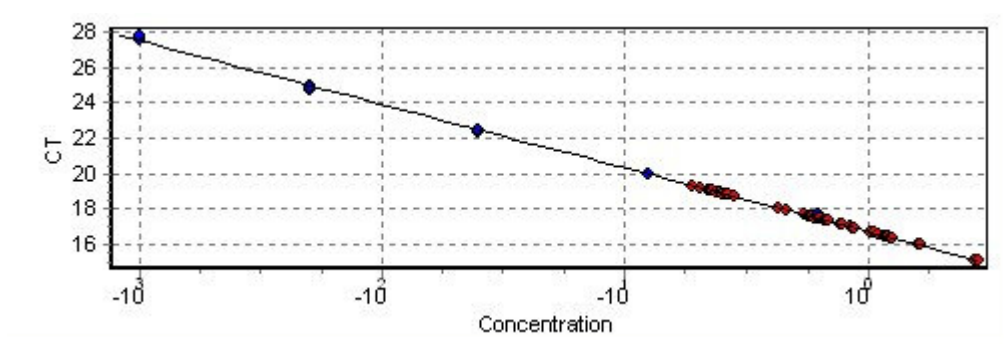


Graf č. 6: Hodnocení stability referenčních genů programem GeNorm. Nejstabilnější geny jsou řazeny zprava doleva.

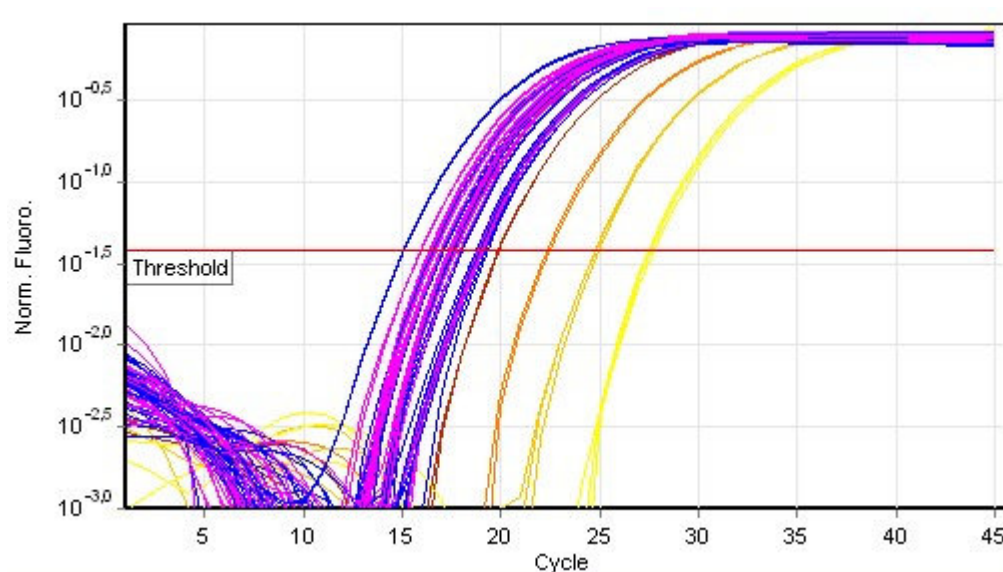
5.4 Stanovení exprese

Expresе genu *ABCCI* byla měřena pomocí rtPCR za použití specifického stanovení na základě genové expresní sondy *TaqMan* (ID: Hs00219905_m1) u 28 párů nádorové a nenádorové prsní tkáně a u 2 nepárových nádorů. Všechny vzorky byly stanoveny v duplikátech. V případě, že rozdíl exprese mezi duplikáty byl větší než 10 %, bylo stanovení daného vzorku opakováno. Jako negativní kontrola byl použit vzorek, kde byla místo cDNA aplikována voda. Pro zjištění účinnosti reakce byla sestrojena a měřena kalibrační křivka nařaděného kalibrátoru, kterým byl vzorek zdravé prsní tkáně (konkrétně vzorek 147). Kalibrační křivka, účinnost reakce, včetně koeficientu R^2 jsou uvedeny v Grafu č. 7.

Expresе *ABCCI* byla detekována u všech vzorků nádorové i nenádorové prsní tkáně a rtPCR byla vyhodnocena softwarem RotorGene 6000 série 1.7 metodou relativní kvantifikace s využitím kalibrační křivky. Průběh rtPCR zaznamenaný programem RG6000 série 1.7. je uveden v Grafu č. 8.



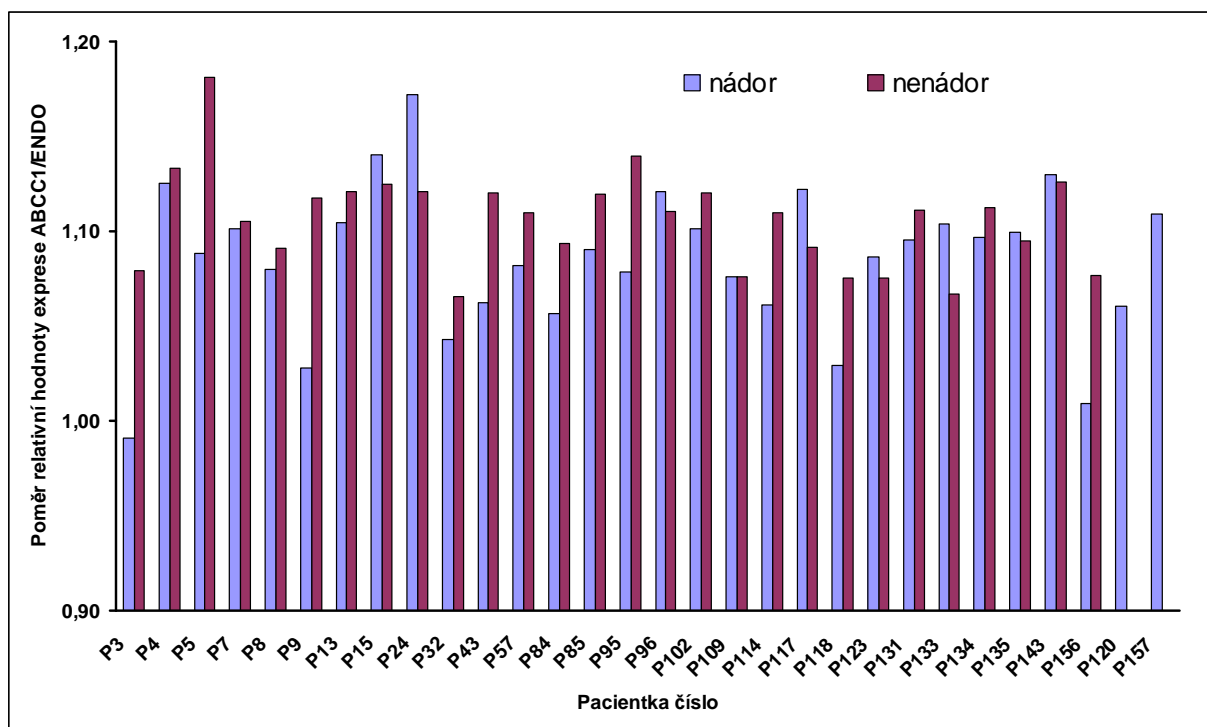
Graf č. 7: Kalibrační křivka pro stanovení exprese. Kalibrační křivka vznikla nařaděním kalibrátoru (vzorek č. 147). Osa x představuje koncentraci (počet kopií na reakci) a osa y hodnoty C_T . Modře jsou značeny standardy, červeně vzorky. Účinnost reakce byla 90 % a koeficient R^2 0,998.



Graf č. 8: Výsledky exprese zdravých a nádorových tkání. Výstup z programu Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2. Na ose x je znázorněn počet cyklů, na ose y fluorescence. Růžově jsou znázorněny exprese nádorových tkání, modře exprese zdravých tkání a paleta barev od červené po oranžovou značí kalibrační křivku (vzorek č. 147).

6.4.1 Hodnocení rozdílů exprese mezi nádorovou a zdravou tkání

Po stanovení exprese *ABCC1* byl hodnocen rozdíl míry exprese genu v nádorové a okolní nenádorové tkáni pacientek. Hodnoty relativní exprese *ABCC1* u všech sledovaných vzorků jsou znázorněny v Grafu. č. 9 na následující straně. Rozdíly v expresi normalizovaných dat vůči průměrům exprese referenčních genů byly dále hodnoceny pomocí programu REST a výsledek je uveden v Tab. č. 15. Ve sledovaném souboru došlo k významnému zvýšení exprese genu *ABCC1* v nádorové oproti kontrolní tkáni ($p=0,01$).

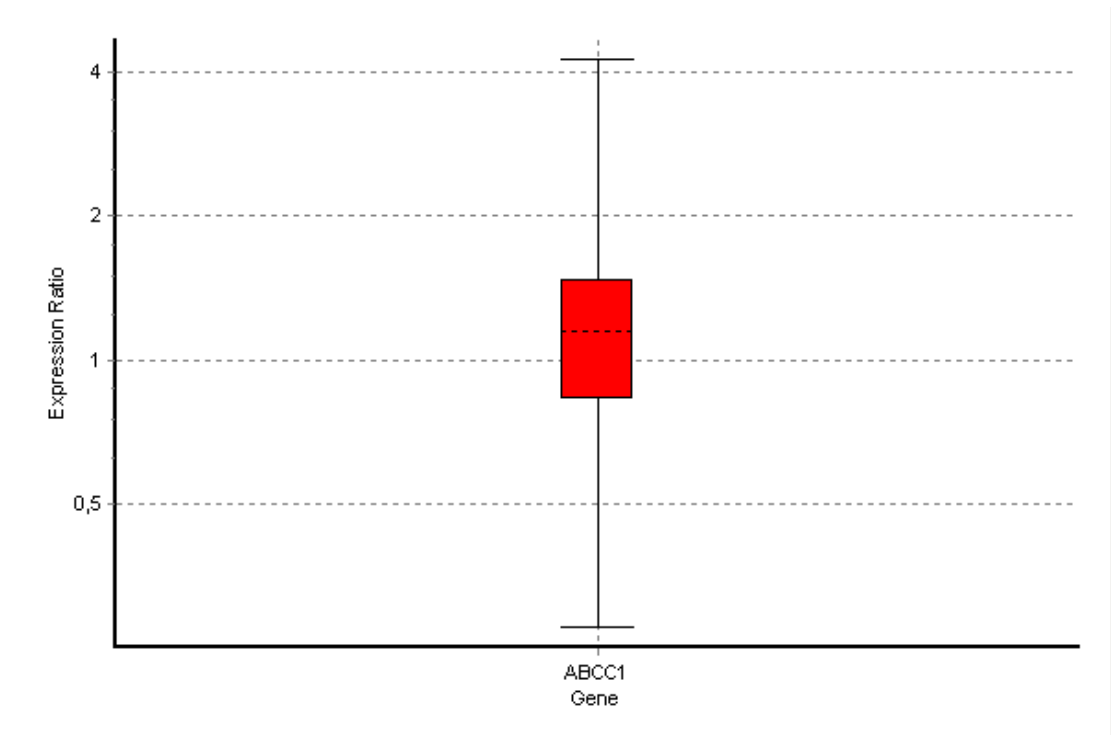


Graf č. 9: Individuální hodnoty exprese ABCC1 u všech sledovaných pacientek. ENDO je aritmetický průměr exprese referenčních genů.

Tab. č. 15: Výsledky rtPCR s relativní kvantifikací.

Gen	Typ genu	Účinnost reakce	Expresce nádorová vs. zdravá tkáň	Standardní odchylka	95% CI	P
UBB	referenční	92 %	1,00			
IPO8	referenční	92 %	1,03			
MRPL19	referenční	94 %	1,00			
ELF2B1	referenční	94 %	0,97			
ABCC1	zkoumaný	90 %	1,27	0,81-2,05	0,56-3,52	0,010

Vysvětlivky: P = hodnota pravděpodobnosti, 95% CI = 95% interval spolehlivosti.



Graf č. 10: Grafický výstup z programu REST symbolizující rozdíl v expresi genu *ABCC1* mezi nádorovými a zdravými tkáněmi pacientek. Červený obdélník představuje rozmezí mezi kvartilami, tečkovaná čára v něm znázorňuje střední hodnotu genové exprese a chybové úsečky ukazují minimum a maximum naměřených hodnot.

5.5 Genotypizace *ABCC1*

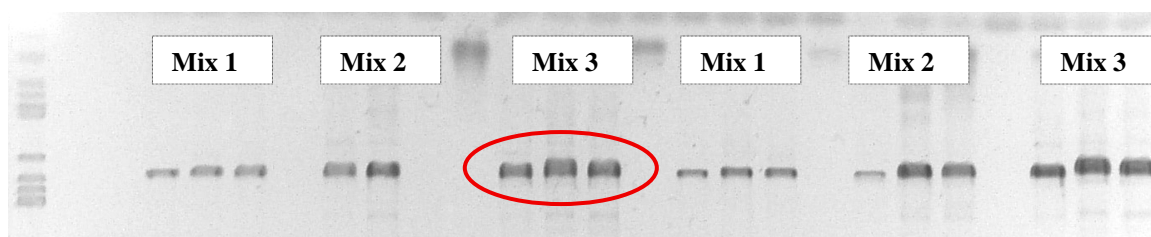
Z celkového počtu 12 SNPs bylo 11 SNPs stanoveno přímou sekvenací na sekvenátoru (konkrétně rs35623, rs35625, rs11866794, rs4148350, rs4148351, rs35626, rs35628, rs4146353, rs4148356, rs3888565, rs3851711). Pro poslední SNP (rs2889517) byla optimalizována a provedena HRM analýza.

5.5.1 Stanovení SNPs pomocí sekvenace

Ke sledování 11 genetických polymorfizmů genu *ABCC1* byla použita metoda přímé sekvenace. Celkem bylo sledováno 191 vzorků DNA pacientek s rakovinou prsu včetně těch, kde byla k dispozici i RNA z tkání a měřena exprese *ABCC1*.

Nejdříve bylo třeba optimalizovat všechny amplifikační reakce tak, aby nevznikaly nespecifické produkty, které by znesnadnily sekvenační analýzu konkrétních SNPs.

Nejllepší poměr specifity a výtěžku poskytla reakce probíhající za následujících podmínek: teplota nasedání primerů 63 °C, reakční mix 3. Na obrázku gelu (Obr. č. 5) je tato reakce označena červeně.



Obr. č. 5: Příklad optimalizace PCR reakce pro oblast 3. V prvním sloupci je nanesen DNA marker Φ X174, další jamka zůstala volná a do další byla nanesena negativní kontrola. Dále byly naneseny vždy tři vzorky (39641, 39652, 39748). Každá trojice vzorků je oddělena prázdnou jamkou (bez naneseného vzorku). Prvních devět bylo amplifikováno v programu s teplotou nasedání primerů 63 °C, posledních devět v programu s teplotou 60 °C. Pravidelně byly střídány reakční mixy viz obrázek. Složení mixů viz tabulka níže (Tab. č. 16).

Tab. č. 16: Reakční mixy při rozcházení PCR pro oblast 3.

Reagencie	Mix 1	Mix 2	Mix 3
Pufr	Červený TopBio bez Mg 10 μ l	Červený TopBio bez Mg 10 μ l	Modrý TopBio complete 10 μ l
MgCl ₂ TopBio	10 μ l (0,8mM)	10 μ l (1,6mM)	-----
dNTP MBI, 2,5mM	8 μ l	8 μ l	8 μ l
Oligonukleotidy, 10 μ M	5 μ l + 5 μ l	5 μ l + 5 μ l	5 μ l + 5 μ l
Taq pol. TopBio White	10 μ l	10 μ l	10 μ l
dH ₂ O	42 μ l	42 μ l	52 μ l
DNA + mix (μ l)	1 + 9	1 + 9	1 + 9

Vybraný úsek genu *ABCC1*, kde je umístěna funkční doména 1, byl rozdělen na čtyři sekvenační oblasti obsahující celkem 12 SNPs. Pro každou ze čtyř oblastí byl navrhnut a použit specifický pár primerů. Jejich přehled je zaznamenán v Tab. č. 17.

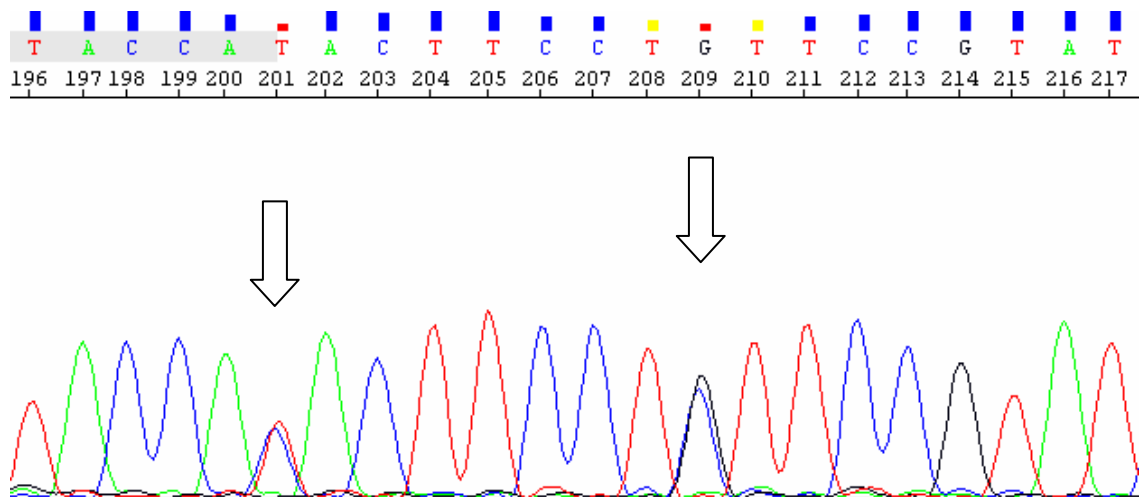
Tab. č. 17: Páry primerů použité při amplifikačních reakcích.

Primery pro oblast č./ název primerů	Sekvence přímého primeru (5' → 3')	Sekvence zpětného primeru (5' → 3')
1/ ABCC1D1R1F a R	tgcacatcctgtagtcccagtt	acatgcaaacctctctccactg
2/ ABCC1D1R2F a R	tcctctctgtgacctgaaca	acaattgaagcaggcaggattt
3/ ABCC1F1D3F a R	ccctcttccaagcaatagtt	gcagtcattgtaccacaaagggt
4/ ABCC1F1D4F a R	cgcacgtgtcctgttcttta	catcatgtgtccaggctca

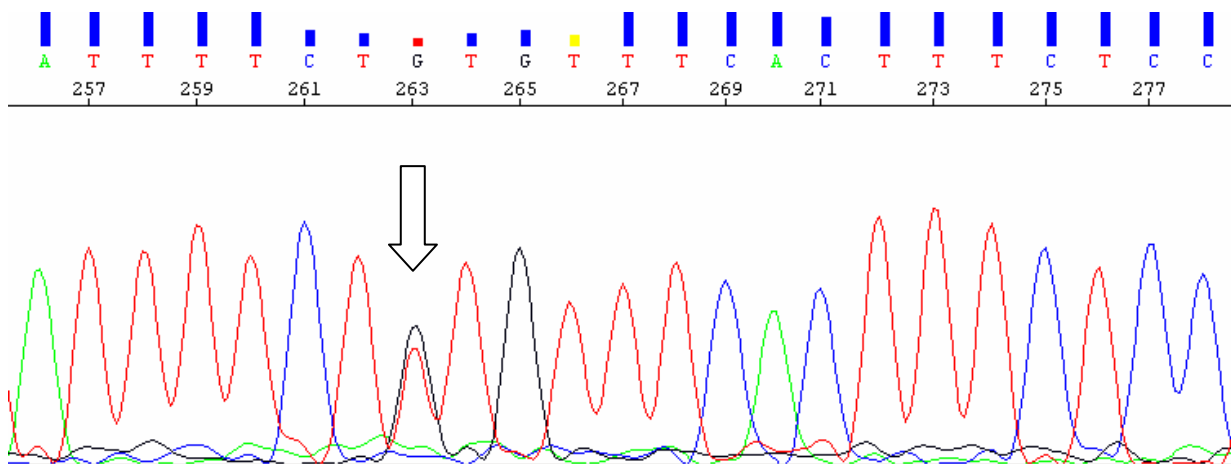
Po úspěšné optimalizaci reakce byly jednotlivé úseky genu *ABCC1* amplifikovány (klasickou PCR a sekvenační PCR), přečištěny a přes noc byly ponechány v 10 μ l

formamidu. Po rozpuštění byly druhý den zdenaturovány (5 min, 94 °C) a umístěny do automatického podavače kapilárního sekvenátoru ABI310, resp. ABI3100, kde došlo k chromatografickému rozdělení. Nejprve bylo několik vzorků sekvenováno jak přímým, tak zpětným primerem a dle výsledků pak byl použit pouze jeden z nich (s výjimkou oblasti 2, která byla příliš dlouhá a musela být tedy sekvenována oběma primery).

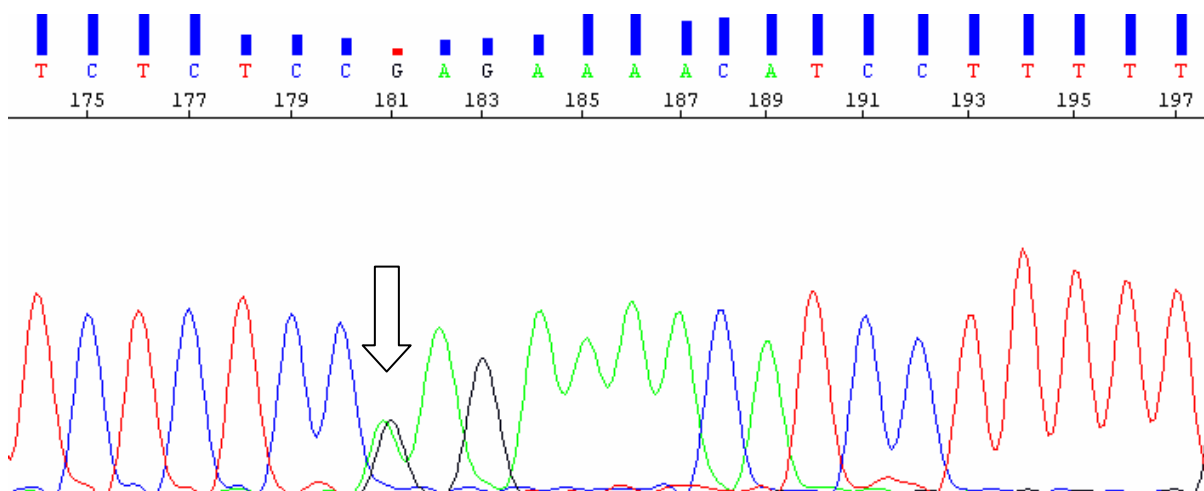
Na Obr. č. 6-9 jsou ukázky chromatogramů všech čtyř oblastí s vyznačenými SNPs. Výsledky sekvenací jsou pak umístěny v příloze jako Tab. č. 18.



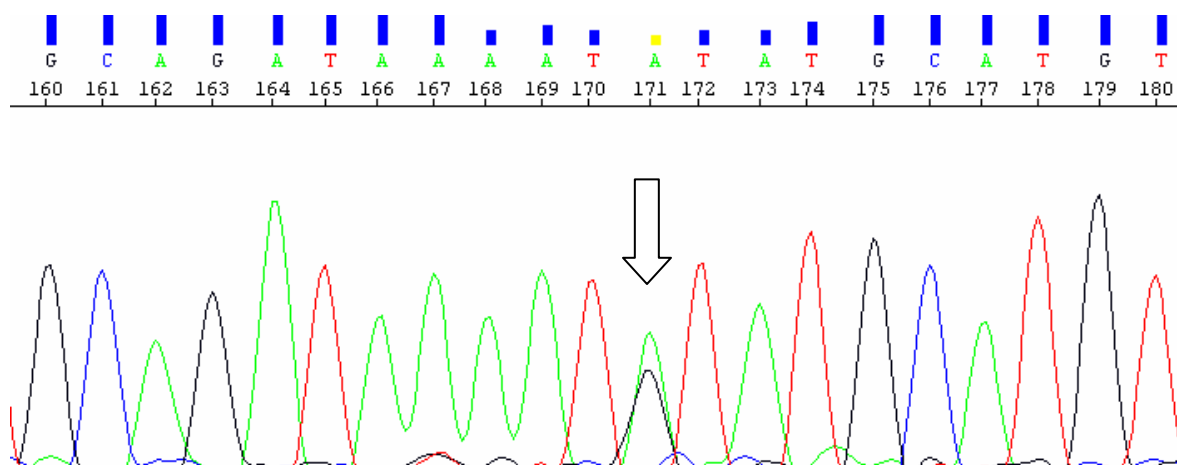
Obr. č. 6: Chromatogram oblasti 1. Výstup z počítačového programu Sequencing Analysis v5.2, s jehož pomocí byly analyzovány sekvence vzorků. Červená křivka odpovídá signálu tyminu (T), zelená odpovídá adeninu (A), modrá cytozinu (C) a černá guaninu (G). Tahle sekvence patří vzorku 39972. Na obrázku jsou zřetelně vidět dva SNPs (šipky), v pořadí zleva rs35625 a rs11866794. V obou SNPs je pacientka heterozygotní (C/T a G/C).



Obr. č. 7: Chromatogram oblasti 2. Výstup z počítačového programu Sequencing Analysis v5.2, s jehož pomocí byly analyzovány sekvenční vzorky. Křivky viz vysvětlení u Obr. č. 6. Tahle sekvenční data patří vzorku 39585. Na obrázku je zřetelně vidět SNP (šipka) rs35626, pacientka je tedy heterozygotní (T/G).



Obr. č. 8: Chromatogram oblasti 3. Výstup z počítačového programu Sequencing Analysis v5.2, s jehož pomocí byly analyzovány sekvenční vzorky. Křivky viz vysvětlení u Obr. č. 6. Tahle sekvenční data patří vzorku 40278. Na obrázku je zřetelně vidět SNP (šipka) rs4148356, pacientka je tedy heterozygotní (G/A).

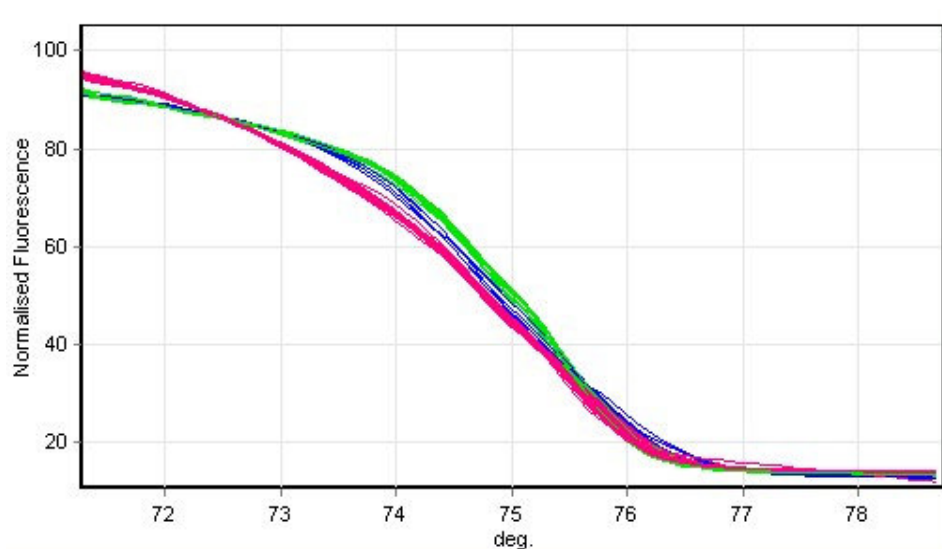


Obr. č. 9: Chromatogram oblasti 4. Výstup z počítačového programu Sequencing Analysis v5.2, s jehož pomocí byly analyzovány sekvence vzorků. Křivky viz vysvětlení u Obr. č. 6. Tahle sekvence patří vzorku 39951. Na obrázku je zřetelně vidět SNP (šipka) rs3888565, pacientka je tedy heterozygotní (G/A).

5.5.2 Stanovení SNP rs2889517 pomocí HRM analýzy

Pro sledování SNP *ABCC1* rs2889517 byla použita metoda HRM. Optimalizace spočívala ve změnách teplotních režimů amplifikace a teplotního rozsahu, v němž byl hledán bod tání, charakterizující jednotlivé genotypy. Pro samotnou analýzu HRM bylo zvoleno postupné zvyšování teploty od 65 °C do 85 °C po 0,1° C a 2 sekundy.

Na základě porovnání rozdílných křivek tání vzorků neznámého genotypu se standardy, u nichž byl genotyp stanoven sekvenací, byly vzorky rozděleny do tří skupin, jak je znázorněno na Grafu č. 11. Analýza byla provedena pomocí programu RotorGene 6000 série 1.7.



Graf č. 11: Křivka HRM analýzy - tání vzorků DNA. Výstup z programu Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2. Na ose x je znázorněna teplota ve °C a na ose y fluorescence, kterou vyzařovala barvička navázaná na vzorky DNA. Růžová křivka znázorňuje divokého homozygota, modrá heterozygota a zelená mutovaného homozygota.

Jako standardy, vůči nimž byly vztahovány ostatní vzorky, byly určeny tyto vzorky:
 1/ pro porovnání vzorků z FNKV - 38376 jakožto genotyp, 39559 genotyp a 39641.
 2/ pro porovnání vzorků z Mediconu - P91, P83 a P89.

U vzorku 39641, použitého jako standard, byl bohužel genotyp určen na základě špatné sekvenace (vzorek byl slabší), čehož jsme si při provádění pokusu všimli až při posledním pokusu. V tomto posledním pokusu byl tedy vzorek 39641 nahrazen vzorkem jiným. Už ale nezbýval čas provést všechny nepřesně stanovené analýzy znovu, a proto jsou výsledky SNP rs2889517 navzájem neporovnatelné a byli jsme nuceni je ze studie vyřadit (především tedy ze statistického hodnocení). Nepřesné výsledky potvrzují i rozdíly ve frekvencích genotypů námi stanovených a těmi z HapMap-CEU (viz Tab. č. 16 v kapitole 5.5.3).

5.5.3 Celkové výsledky genotypizace *ABCC1*

Výsledky genotypizace *ABCC1* analyzované v rámci diplomové práce jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. č. 19). Jsou zde uvedena jak procentuelní zastoupení jednotlivých genotypů, tak frekvence mutovaných alel v našem souboru pacientek

s rakovinou prsu. Výsledky byly porovnány s frekvencemi genotypů bělošské populace získané projektem HapMap na souboru CEU.

Tab. č. 19: Výsledky genotypizace *ABCC1*.

NCBI SNP ID	frekvence genotypů dle NCBI			frekvence genotypů v našem souboru			počet vzorků daného genotypu			celkový počet vzorků
	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	
rs35623	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	149
	79,6 %	16,8 %	3,5 %	80,5 %	16,8 %	2,7 %	120	25	4	
rs35625	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	150
	16,1 %	42,0 %	41,9 %	12,5 %	44,1 %	43,4 %	19	65	66	
rs11866794	C/C	C/G	G/G	C/C	C/G	G/G	C/C	C/G	G/G	154
	0,0 %	26,3 %	73,7 %	2,6 %	14,5 %	82,9 %	4	21	129	
rs4148350	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	167
	84,1 %	15,0 %	0,9 %	86,8 %	12,0 %	1,2 %	145	20	2	
rs4148351	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	166
	78,8 %	19,5 %	1,8 %	82,5 %	14,5 %	3,0 %	137	24	5	
rs35626	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	170
	49,6 %	36,3 %	14,2 %	54,1 %	37,6 %	8,2 %	92	64	14	
rs35628	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	167
	81,4 %	16,8 %	1,8 %	84,4 %	13,2 %	2,4 %	141	22	4	
rs4148353	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	156
	78,8 %	19,5 %	1,8 %	85,3 %	12,2 %	2,6 %	133	19	4	
rs4148356	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	186
	0,0 %	5,4 %	94,6 %	0,0 %	4,3 %	95,7 %	0	8	178	
rs2889517*	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	165
	51,3 %	40,7 %	8,0 %	39,4 %	19,4 %	41,2 %	65	32	68	
rs3888565	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	189
	5,3 %	27,4 %	67,3 %	3,7 %	23,3 %	73,0 %	7	44	138	
rs3851711	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	190
	20,8 %	45,8 %	33,3 %	30,0 %	49,5 %	20,5 %	57	94	39	

Přehled všech 12 SNPs, jejich frekvencí, počtu vzorků jednotlivých genotypů a celkového počtu vzorků. Pro srovnání jsou uvedeny i frekvence dle NCBI (HapMap CEU, hodnoty pro evropskou populaci stanoveny na vzorcích). Tučně jsou zvýrazněny genotypy divokého typu (*wild type*). Některé vzorky nebyly stanoveny díky opakovanému selhání stanovení z důvodů nedostatečné kvality nebo kvantity DNA.

* rs2889517 byl stanovován HRM analýzou.

5.6 Výsledky statistických analýz

Při statistickém zhodnocení byly sledovány vztahy mezi expresí *ABCC1* a klinicko-patologickými daty pacientek, vztahy mezi genotypem *ABCC1* a klinicko-patologickými

daty. A nakonec byly hodnoceny vztahy mezi expresí *ABCC1* a jeho genotypem na základě stanovených SNPs.

5.6.1 Hodnocení rozdílů exprese mezi nádorovou a zdravou tkání

Při hodnocení rozdílů exprese *ABCC1* mezi nádorovou a nenádorovou tkání byla nalezena významně zvýšená exprese *ABCC1/ENDO* v nádoru oproti zdravé tkáni. ENDO je aritmetický průměr referenčních genů *IPO8*, *MRPL19*, *EIF2B1* a *UBB*). Analýza byla provedena jak párovým neparametrickým testem Wilcoxon ($p=0,009$), tak parametrickým párovým T-testem ($p=0,006$). Výsledek analýzy programem SPSS potvrdil i výsledek z RESTu ($p=0,010$). Můžeme tedy na závěr konstatovat, že jsme v nádoru prokázali zvýšenou expresi *ABCC1*.

5.6.2 Korelace exprese *ABCC1* s klinicko-patologickými daty

V rámci analýzy exprese *ABCC1* byly pacientky rozděleny na dvě skupiny dle klinicko-patologických dat. Pacientky, které prodělaly neoadjuvantní chemoterapii, byly rozděleny na odpovídající a neodpovídající na léčbu. Rozdělení bylo v této pilotní studii provedeno na základě změny režimů z FAC/FEC na taxany, ke které docházelo u patientek s nedostatečnou odpovědí na původní terapii. Jako další kritérium byla zvolena změna stádia onemocnění před a po chemoterapii. Snížení stádia jsme hodnotili jako dobrou odpověď a pokud se stádium nezměnilo nebo zvýšilo, byla odpověď hodnocena jako nedostatečná. Statistické zhodnocení bylo provedeno parametrickým testem ANOVA, protože rozložení poměru exprese *ABCC1/ENDO* v nádorové tkáni bylo normální.

Z analýz rozdílů v expresi *ABCC1* u patientek rozdělených podle klinicko-patologických dat vyplynulo, že histologické charakteristiky nádoru (typ a stupeň vyzrávání nádoru nebo-li grade), exprese receptorů pro estrogen, progesteron a HER2 nekorelují s expresí *ABCC1* v nádorové tkáni patientek. Další klinické charakteristiky (věk při diagnóze, osobní a rodinná anamnéza, velikost nádoru a počet postižených uzlin) rovněž s expresí *ABCC1* nekorelovaly. Ani jedno ze dvou hodnocení odpovědi na chemoterapii neukázalo vliv exprese genu *ABCC1* na účinky léčby antracykliny. Korelace na hranici významnosti byla nalezena mezi hladinou *ABCC1/ENDO* v nádoru a stádiem před neoadjuvantní chemoterapií ($p=0,047$, Tab. č. 20 na následující straně).

Tab. č. 20: Hodnoty exprese *ABCC1* v nádorové tkáni pacientek rozdělených podle stádia.

	Počet pacientek	<i>ABCC1</i> /ENDO v nádoru (hodnota ± standardní odchylka)
Stádium II	19	1,08 ± 0,03
Stádium III	7	1,11 ± 0,03

5.6.3 Korelace genotypu *ABCC1* a klinicko-patologických dat

Při statistickém srovnání výsledných SNPs a klinických charakteristik pacientek vyšlo několik významných vztahů. Pacientky s variantním genotypem jsou významně starší než pacientky s divokými alelami (pro rs4148351 $p=0,017$, pro rs4148353 $p=0,014$). Pacientky s divokým, homozygotním genotypem (*wild type*) mají významně větší nádory než pacientky s variantním genotypem (pro rs35626 $p=0,045$, pro rs3851711 $p=0,020$; viz Tab. č. 21). Rozložení poměru SNPs v nádorové tkáni bylo normální, proto mohl být pro tohle statistické hodnocení použit parametrický test ANOVA.

Dalším významným výsledkem bylo, že pacientky s pozitivní rodinnou anamnézou (tj. s výskytem karcinomu prsu nebo ovária v rodině) mají významně častěji variantní genotyp (SNP rs11866794) oproti pacientkám bez výskytu těchto nádorů v rodině ($p=0,002$). Pro analýzu těchto vztahů byl použit Pearsonův χ^2 test.

Tab. č. 21: Vybrané významné vztahy korelace genetické variability *ABCC1* vzhledem k velikosti nádoru.

SNP	Genotyp	Počet pacientek	Velikost nádoru v mm (hodnota ± standardní odchylka)	χ^2
rs35626	1 (T/T)	12	26,33 ± 9,48	0,045
	2 (T/G)	48	17,40 ± 10,16	
	3 (G/G)	78	19,56 ± 13,10	
rs3851711	1 (C/C)	30	23,03 ± 12,98	0,020
	2 (C/T)	73	20,16 ± 12,19	
	3 (T/T)	50	16,66 ± 10,88	

Genotyp: 1 = divoký genotyp (*wild type*), 2 = heterozygotní genotyp, 3 = variantní genotyp.

5.6.4 Vztahy mezi genotypem pacientek a expresí *ABCC1*

Statistická analýza vztahů mezi stanovenými SNPs a expresí genu *ABCC1* byla prováděna za použití parametrického testu ANOVA, přičemž i zde byl zjištěn významný

výsledek. Byla nalezena významně nižší exprese v nenádorové tkáni pacientek s divokým genotypem ve srovnání s pacientkami s variantními alelami daného SNP (viz Tab. č. 22).

Tab. č. 22: Významné korelace genetické variability *ABCC1* vzhledem k expresím tohoto genu ve zdravé tkáni pacientek.

SNP	Genotyp	Počet pacientek	<i>ABCC1</i> /ENDO ve zdravé tkáni (hodnota ± standardní odchylka)	χ^2
rs11866794	2/3	2	1,08 ± 0,01	0,013
	1	14	1,11 ± 0,02	
rs4148353	2/3	2	1,08 ± 0,01	0,008
	1	12	1,11 ± 0,02	
rs4148351	2/3	2	1,08 ± 0,01	0,018
	1	13	1,11 ± 0,02	

Genotyp: 2/3 = heterozygotní nebo variantní genotyp, 1 = divoký genotyp (*wild type*).

6 Diskuze

V rámci předkládané diplomové práce jsme si stanovili 3 hlavní cíle, jež vycházely z předchozí práce naznačující zvýšenou expresi *ABCC1* v nádorové tkáni pacientek s karcinomem prsu (Václavíková *et al.*, 2008a; Perglerová, 2010). Dříve studovaná skupina se skládala především z neselektovaných pacientek, které nebyly před odebráním vzorků tkání léčeny chemoterapií. Tento výsledek jsme chtěli potvrdit na nezávislé skupině pacientek léčených předoperační (neoadjuvantní) chemoterapií substráty *ABCC1*, antracykliny a taxany. Dále jsme chtěli zjistit, zda má zvýšená exprese tohoto transportéru význam pro prognózu a léčbu onemocnění. Posledním cílem bylo zjistit, zda a jak je exprese *ABCC1* (fenotyp) ovlivněna přítomností jednonukleotidových polymorfizmů ve funkční doméně genu (genotyp).

Gen *ABCC1* leží na 16. chromozomu v pozici p13.1 a kóduje 190kDa membránový fosfoglykoprotein (*ABCC1* neboli *MRP1*, Leslie *et al.*, 2001). Tento protein náleží do rodiny ABC transportérů, jež hrají důležitou roli v rozvoji mnohočetné lékové rezistence nádorových buněk vůči působení protinádorových léčiv (Cole *et al.*, 1992). Zvýšená exprese *ABCC1* byla zaznamenána u mnoha hematologických a solidních nádorů včetně karcinomu prsu (Hipfner *et al.*, 1995; Nooter *et al.*, 1997), což značí možný klinický význam tohoto transportního proteinu. Dosud však nebylo zjištěno, zda hladina exprese transkriptu či proteinu *ABCC1* ovlivňuje prognózu nebo výsledek léčby pacientek s karcinomem prsu.

Toto onemocnění je velmi vhodné pro studium úlohy ABC transportérů, protože část pacientek je léčena předoperačně a k této léčbě se používají substráty ABC transportérů včetně sledovaného *ABCC1*. Je tedy možné studovat korelaci mezi expresí ABC transportérů a výsledkem chemoterapie i možnost indukce exprese transportérů vlivem podané chemoterapie.

Do studie bylo zařazeno celkem 191 pacientek s karcinomem prsu, z nichž 30 bylo léčeno neoadjuvantně. Vzorky tkání a krve pacientek byly podrobeny zkoumání z hlediska variability *ABCC1* (SNPs, genotypu) i z hlediska jeho exprese (fenotypu).

6.1 Sledování exprese genu *ABCC1*

Pro sledování genové exprese pomocí real-time PCR s relativní kvantifikací jsme vybrali referenční geny, vůči nimž byla posléze exprese normalizována. Výběr referenčních genů zásadně ovlivňuje výsledky relativní kvantifikace pomocí rtPCR (Vandermompele *et al.*, 2009). Celkem bylo použito 16 referenčních genů (viz Tab. č. 11 v kapitole 5.3), u kterých byla změřena exprese pomocí rtPCR, pro niž bylo použito 15 párů tkání (15 nádorových a 15 zdravých). Za pomoci softwarových programů (GeNorm a NormFinder) byly vybrány 4 nejvhodnější referenční geny na základě hodnocení stability z hlediska exprese v nádorové a nenádorové tkáni prsu. Jako referenční geny pro další analýzy byly tedy použity tyto geny: *EIF2B1*, *MRPL19*, *UBB* a *IPO8*.

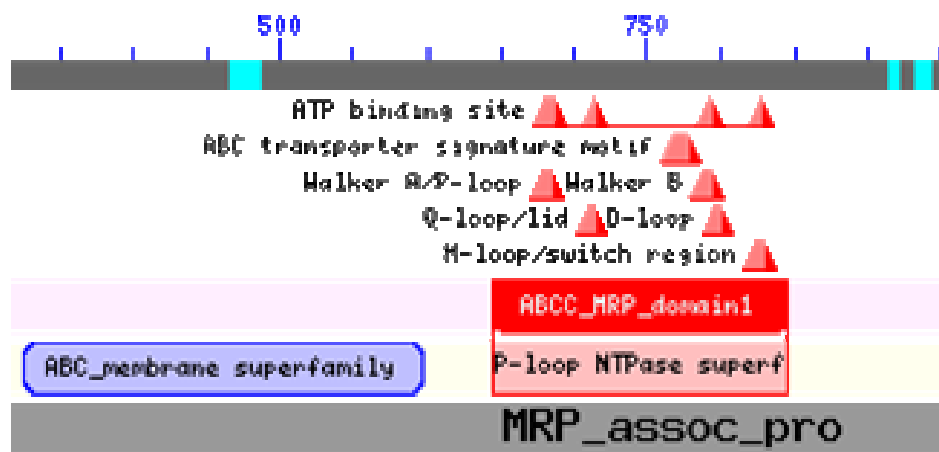
Jedním z nejběžněji používaným referenčním genem v literatuře je nejspíše *GAPDH* (gen pro glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu; Medhurst *et al.*, 2000; Langman *et al.*, 2003; Barber *et al.*, 2005). Dále jsou pak využívány β -aktin, β 2-mikroglobulin, cyklooxygenáza 1 nebo třeba transferrin receptor (Barber *et al.*, 2005). Studie Zhang *et al.* (2005) se zabývala výběrem referenčních genů pro genovou expresi pomocí rtPCR. Její výsledky naznačují, že *GNB2L1* (gen pro protein vázající nukleotid guanin (G protein), beta polypeptide 2-like 1), *HPRT1* (gen pro hypoxantin fosforibozyltransferázu 1), *RPL32* (gen pro 60S ribozomální protein L32), *ACTB* (gen pro aktin-beta), a *B2M* (gen pro beta-2 mikroglobulin) mohou být vhodnými referenčními geny ve studiích genové exprese z DNA neutrofilních granulocytů. V naší studii však často používané referenční geny (*GAPDH*, *ACTB*, *B2M*, *HPRT1*, apod.) vycházely nejhůře. Z tohoto důvodu byly vybrány jiné referenční geny a naše práce ukazuje na význam systematického přístupu ke sledování expresních profilů a jejich normalizace.

U všech 30 neoadjuvantně léčených pacientek byla pomocí referenčních genů úspěšně stanovena hladina transkriptu genu *ABCC1*, tj. sledovaný transkript byl exprimován nad limitem detekce metody ve všech sledovaných vzorcích. V nádorové tkáni byla zaznamenána významně vyšší exprese *ABCC1* než v tkáni zdravé ($p=0,01$), čímž jsme opakovaně prokázali, že u pacientek léčených neoadjuvantně dochází ke zvýšení exprese *ABCC1* v nádorové tkáni. Předchozí výsledky naznačily zvýšenou expresi v nádorech pacientek sledovaných ve Fakultní nemocnici Motol, které prodělaly adjuvantní (pooperační) léčbu (nepublikovaná data). Zhodnotili jsme tedy dva soubory odlišné jednak poskytnutou terapií, dále způsobem odběru vzorku (před vs. po chemoterapii) a rovněž i logistikou zpracování vzorků, která může mít vliv na kvalitu RNA. Lze tedy uzavřít, že

zvýšená exprese ABCC1, na úrovni transkriptu, v nádorové tkáni pacientek s karcinomem prsu je velmi pravděpodobně obecným jevem. Nemáme zatím dostupné vzorky biopsií nádorových tkání od stejných pacientek před prodělanou chemoterapií a tudíž nemůžeme zhodnotit zda došlo k indukci exprese ABCC1 poskytnutou chemoterapií.

6.2 Genetická variabilita ABCC1

Tato studie se zabývala analýzou funkční domény NBD1 genu *ABCC1* (viz Obr. č. 10), kde může výskyt mutací i SNPs ovlivnit transportní funkci proteinu. Do zkoumání genetické variability *ABCC1* bylo zařazeno 191 vzorků DNA pacientek s rakovinou prsu včetně části těch, u nichž byla změřena i exprese *ABCC1* (viz kapitola 4.3).



Obr. č. 10: Funkční doména NBD1 genu ABCC1. Na obrázku jsou vyznačeny funkčně významné motivy v NBD1, např.: ATP vazebné místo, smyčky typu Walker a další.

Vybraný úsek genu *ABCC1*, kde je umístěna funkční doména NBD1, byl dle délky ampliconu (mezi 480-960 bp) rozdělen na čtyři oblasti obsahující celkem 11 SNPs. Pro sledování posledního, odlehlého, SNP v genu *ABCC1* (rs2889517) byla použita metoda HRM (*High Resolution Melting*). Celkem bylo tedy sledováno 12 SNPs. Výsledné frekvence jednotlivých genotypů SNPs odpovídaly frekvencím HapMap-CEU (*Haplotype mapping project*, NCBI), což je databáze čítající 226 obyvatel Utahu původem ze severní či západní Evropy (ze souboru CEPH).

Existuje velké množství studií zabývajících se výskytem a funkcí SNPs v genu *ABCC1*. Ale pouze jedna se týkala námi sledovaných SNPs. SNP rs4148356 (R723Q) zahrnuli d své studie i Letourneau *et al.* (2005). Zkoumali funkční význam celkem 10 nesynonymních SNPs, avšak žádný z nich hladinu exprese *ABCC1* neovlivnil.

Všechny metody sledování variability NBD1 v *ABCCI* byly námi vyvinuty a optimalizovány pro další použití. Analýzy SNPs ve vztahu k výsledku a vedlejším účinkům chemoterapie tvoří významnou součást farmakogenomiky.

Významně nižší hladina transkriptu *ABCCI* v nenádorové tkáni byla nalezena u pacientek s divokým genotypem SNPs rs11866794, rs4148353 a rs4148351 ve srovnání s pacientkami s variantními alelami. Při zvýšené expresi *ABCC1* v buňkách u nosičů variantních alel může docházet ke zvýšenému vyplavování škodlivých látek včetně různých léčiv. Současně tak mohou být paradoxně nosiči chráněni proti karcinogenezi.

V literatuře nebyl ještě vliv SNPs v *ABCCI* na riziko vzniku karcinomu prsu studován. Byl však popsán např. u *ABCBI* (Vaclavikova *et al.*, 2008b).

Námi nalezený vztah mezi genotypem a fenotypem *ABCCI* může být využit ve farmakogenetice všech nádorových onemocnění léčených jeho substráty, protože stanovení dědičného (a tedy neměnného) SNP je jednorázové, jednodušší a podstatně levnější než sledování hladin transkriptů nebo proteinů v nádorové tkáni. S tímto využitím je však třeba vyčkat na průkaz funkční relevance *ABCCI* v prognóze a terapii nádorových onemocnění.

6.3 Analýzy vztahů mezi genotypem a fenotypem *ABCC1* a klinicko-patologickými daty

Výsledky analýz SNPs byly statisticky porovnány jednak s klinicko-patologickými údaji pacientek a jednak s hladinami transkriptu *ABCCI* v nenádorové tkáni pacientek. Bylo nalezeno několik významných korelací: 1/ Polymorfismy rs4148351 a rs4148353 významně korelovaly s věkem pacientek. 2/ Pacientky s divokým genotypem (*wild type*) ve SNP rs35626 a rs3851711 měly významně větší nádory než pacientky s variantním genotypem. 3/ SNP rs11866794 koreloval s výskytem karcinomu prsu nebo vaječníku v rodině (pozitivní rodinou anamnézou).

Interpretace těchto vztahů může být různá. Všechny SNPs byly srovnávány se všemi charakteristikami, tj. bylo provedeno 240 testů. Pravděpodobnost náhodného výsledku na námi zvolené hladině významnosti $p=0,05$ je 1:20, tj. 12 testů potenciálně mohlo vyjít falešně pozitivně.

U rs4148351 a rs4148353 byly pacientky s variantním genotypem významně starší než pacientky s divokými alelami. Zde je možnost vlivu právě ABCC1 transportéru. Při zvýšené expresi *ABCC1* v buňkách dochází k vyplavování škodlivých látek ven z buňky. A právě tato ochranná funkce ABCC1 transportéru by pravděpodobně mohla zapříčinit pozdější nástup onemocnění.

Díky vztahu mezi SNP a fenotypem ABCC1 mohou mít pacientky rozdílné aktivity enzymu (významné jsou zde právě ty samé SNPs, jež korelují i s fenotypem) a tím i odlišné riziko vzniku nádoru při expozici substrátům během života - ochranná alela tak může způsobit pozdější nástup onemocnění.

Co se týče vztahů genetické variability ABCC1 a rodinné anamnézy, významné výsledky byly nalezeny u SNPs, které rovněž významně korelovaly s věkem. Obecně platí, že pacientky s pozitivní rodinnou anamnézou podmíněnou mutací ve vysokopenetrujícím genu (např.: *BRCA1/2*) dostanou nádor dříve než pacientky bez mutací. V našem souboru však stav *BRCA1/2* není známý a tudíž nevíme, zda námi sledované pacientky mají kauzální mutaci, která je k časnému výskytu nádoru predisponuje. Záchyt *BRCA1/2* mutací u pacientek s karcinomem prsu českého původu se udává kolem 30-35% (Pohlreich *et al.*, 2005, Machackova *et al.*, 2008). V budoucnu bychom právě tyto vztahy rádi ověřili na souboru *BRCA1/2* pozitivních (s mutacemi v *BRCA* genech) pacientek.

V případě velikosti nádorů lze spekulovat o možném vlivu sledovaných SNP nebo jiných, neznámých, SNP, které jsou s nimi ve vazebné nerovnováze (*linkage disequilibrium*) na prognózu pacientek, protože velikost nádoru je nepříznivý prognostický faktor.

Nelze ani vyloučit, že nalezené vztahy mezi SNPs a klinicko-patologickými údaji byly náhodnými výsledky. Při rigorózní aplikaci korekce na mnohočetné testování dle Bonferroniho by většina z nalezených vztahů nebyla významná.

Při porovnávání klinicko-patologických charakteristik s hladinou transkriptu jsme našli pouze hraniční vztah hladiny *ABCC1* ke stádiu před chemoterapií. Tento výsledek dosud nebyl publikován. Stejně jako v naší studii nebyla ani v jiných studiích (Cole *et al.*, 1992; Ferrero *et al.*, 2000; Lacave *et al.*, 1998; Filipits *et al.*, 1999) nalezena korelace mezi expresí ABCC1 (proteinu či mRNA) a histologickým typem karcinomu prsu a stupněm nádoru (tzv. *grade*). Ani další klinické charakteristiky pacientek (věk při diagnóze, osobní a rodinná anamnéza, velikost nádoru, počet postižených uzlin, exprese

receptorů pro estrogen, progesteron a HER2) s expresí *ABCC1* v nádorové tkáni pacientek nekorelovaly.

Ani jedno ze dvou hodnocení odpovědi na chemoterapii neukázalo vliv exprese genu *ABCC1* na účinky léčby antracykliny a/nebo taxany. Tudíž je třeba tuto pilotní studii uzavřít konstatováním, že hladina transkriptu *ABCC1* pravděpodobně nehraje úlohu v odpovědi na podanou chemoterapii.

Podobný výzkum expresních profilů *ABC* genů provedli v roce 2006 také Park *et al.* Analyzovali expresní profily právě u pacientek s karcinomem prsu léčených neoadjuvantní chemoterapií (po týdnu střídavě paklitaxel a FEC). Výsledky této studie naznačují, že několik *ABC* transportérů (konkrétně *ABCA1* a *12*, *ABCB3* a *6*, *ABCC5*, *7*, *11* a *13*, *ABCF2*) v nádorových buňkách prsu může způsobovat klinickou odpověď vůči neoadjuvantní chemoterapii. Transkripční profily těchto genů pak mohou být užitečné i v odhadování patologické odpovědi na léčbu paklitaxel/FEC u pacientek s karcinomem prsu.

7 Závěr

V rámci předkládané diplomové bylo dosaženo všech stanovených cílů. U všech pacientek byla stanovena míra exprese *ABCC1* relativní kvantifikací pomocí rtPCR. Expresní profily pacientek byly posléze statisticky vyhodnoceny v porovnání s klinicko-patologickými daty a genetickou variabilitou *ABCC1* (stanovenými SNPs).

Všechny metody použité při stanovování genetické variability *ABCC1* byly v rámci této diplomové práce zavedeny a optimalizovány. Metoda a výsledky relativní kvantifikace exprese pomocí rtPCR byla prezentována na konferenci Diagnostika, léčba a prevence závažných civilizačních onemocnění, konané 25. 11. 2010 v Plzni (Mohelníková-Duchoňová, *et al.*, 2010).

Výsledky této práce neukázaly vliv *ABCC1* na odpověď pacientek na neoadjuvantní chemoterapii. Byly však zaznamenány značné interindividuální rozdíly v expresi v nádorové tkáni pacientek s karcinomem prsu, které mohou u malé frakce pacientek (zachytitelné ve větší studii) vliv na léčbu mít.

Výsledky této studie naznačují, že genetická variabilita i exprese *ABCC1* transportéru může ovlivňovat prognózu pacientek, protože byla zaznamenána korelace s klinickým stádiem (před léčbou) a s velikostí nádoru vyňatého během operace po léčbě. Zároveň byla nalezena asociace SNPs v *ABCC1* s věkem a výskytem nádorů prsu či ovária v rodinné anamnéze pacientek. Tento vztah nepřímo naznačuje úlohu genu nebo souvisejícího neznámého genetického faktoru v karcinogenezi.

V případě, že by se podařilo námi nalezené vztahy ověřit nezávislou studií bylo by možné je využít ke upřesnění prognózy pacientek v klinické praxi.

8 Seznam použité literatury

Abrahámová, J., Dušek, L., Dvořák, K., Foretová, L., Geryk, E., Holub, J., Horák, J., Koptíková, J., Matýšek, R., Mužík, J., Pecen, L., Svobodník, A. Možnosti včasného záchytu rakoviny prsu. 1. vydání. Praha, *Grada Publishing a.s.*, 2003. ISBN 80-247-0499-4.

Akan, I., Akan, S., Akca, H., Savas, B., Ozben, T. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of *N*-acetylcysteine and *Buthionine sulfoximine*. *Cancer Cell International*. 2005, 5(1):22.

Alexander, D., Yamamoto, T., Kato, S., Kasai, S. Histopathological assessment of multidrug resistance in gastric cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein, and lung-resistance protein. *Surgery Today*. 1999, 29(5):401-406.

Andersen, C. L., Jensen, J. L. *et* Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*. 2004, 64(15):5245-5250.

Bakos, É. *et* Homolya, L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 2007, 453(5):621-641.

Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., Clark, B. J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics*. 2005, 21(3):389-395.

Berger, W., Setinek, U., Hollaus, P., Zidek, T., Steiner, E., Elbling, L., Cantonati, H., Attems, J., Gsur, A., and Micksche, M. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2005, 131(6):355-363.

Biedler, J. L. *et* Riehm, H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Research*. 1970, 30(4):1174-84.

Borst, P. *et* Elferink, R. O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review of Biochemistry*. 2002, 71: 537-592.

Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. The multidrug resistance protein family. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999, 1461:347-357.

Boumendjel, A., Baubichon-Cortay, H., Trompier, D., Perrotton, T., Di Pietro, A. Anticancer Multidrug Resistance Mediated by MRP1: Recent Advances in the Discovery of Reversal Agents. *Medicinal Research Reviews*. 2005, 25 (4): 453-472

Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L.-H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H. O. F., Loubser, O., Ouelette, B. F. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J. D., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J. P., Genest Jr, J., Hayden, M. R. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature Genetics*. 1999, 22(4):336-345.

Chan, H. S., Lu, Y., Grogan, T. M., Haddad, G., Hipfner, D. R., Cole, S. P., Deeley, R. G., Ling, V., Gallie, B. L. Multidrug resistance protein (MRP) expression in retinoblastoma correlates with the rare failure of chemotherapy despite cyclosporine for reversal of P-glycoprotein. *Cancer Research*. 1997, 57(12):2325–2330.

Choi, C. H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International*. 2005, 5:30.

Choudhuri, S. *et* Klassen, C.D. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *International Journal of Toxicology*. 2006, 25(4):231-259.

Chovanec J. *et* Dostálová Z. Biologická léčba karcinomu prsu. *Praktická Gynekologie*. 2009. 13: 228-231.

Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., Deeley, R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992, 258(5088):1650-4.

Conrad, S., Kauffmann, H. M., Ito, K., Deeley, R. G., Cole, S. P., Schrenk, D. Identification of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) mutations and characterization of a G671V substitution. *Journal of Human Genetics*. 2001, 46(11):656-663.

Conrad, S., Kauffmann, H. M., Ito, K., Leslie, E. M., Deeley, R. G., Schrenk, D., Cole, S. P. A naturally occurring mutation in MRP1 results in a selective decrease in organic anion transport and in increased doxorubicin resistance. *Pharmacogenetics*. 2002, 12(4):321-330.

Conseil, G., Deeley, R. G., Cole, S. P. Polymorphisms of MRP1 (ABCC1) and related ATP-dependent drug transporters. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2005, 15(8):523-533.

Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*. 2001, 42(7):1007-1017.

Dunning, A. M., Healey, C. S., Pharoah, P. D. P., Teare, M. D., Ponder, B. A., Easton, D. F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2001, 8(10):843-854.

Endo, K., Maehara, Y., Ichiyoshi, Y., Kusumoto, T., Sakaguchi, Y., Ohno, S., Sugimachi, K. Multidrug resistance-associated protein expression in clinical gastric carcinoma. *Cancer*. 1996, 77(8 Suppl):1681-1687.

Evers, R., Zaman, G. J., van Deemter, L., Jansen, H., Calafat, J., Oomen, L. C., Oude Elferink, R. P., Borst, P., Schinkel, A. H. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996, 97(5):1211-1218.

Ferguson, L. R. *et* De Flora, S. Multiple drug resistance, antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutation Research*. 2005, 591(1-2):24-33.

Ferrero, J. M., Etienne, M. C., Formento, J. L., Francoual, M., Rostango, P., Peyrottes, I., Ettore, F., Teissier, E., Leblanc-Talent, P., Namer, M., Milano, G. Application of an original RT-PCR-ELISA multiplex assay for MDR1 and MRP, along with p53 determination in node-positive breast cancer patients. *Breast Journal Cancer*. 2000, 82(1):171-177.

Filipits, M., Malayeri, R., Suchomel, R. W., Pohl, G., Stranzl, T., Dekan, G., Kaider, A., Stiglbauer, W., Depisch, D., Pirker, R. Expression of the multidrug resistance protein (MRP1) in breast cancer. *Anticancer Research*. 1999, 19(6B):5043-5049.

Flens, M. J., Zaman, G. J., van der Valk, P., Izquierdo, M. A., Schroeijers, A. B., Scheffer, G. L., van der Groep, P., de Haas, M., Meijer, C. J., Scheper, R. J. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *The American Journal of Pathology*. 1996, 148(8):1237-1247.

Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D. T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., Sobol, H., Teare, M. D., Struwing, J., Arasaon, A., Scherneck, S., Peto, J., Rebbeck, T. R., Tonin, P., Neuhausen, S., Barkardottir, R., Eyfjörd, J., Lynch, H., Ponder, B. A., Gayther, S. A., Birch, J. M., Lindblom, A., Stoppa-Lyonnet, D., Bignon, Y.-J., Borg, Å., Hamann, U., Haites, N., Scott, R. J., Maugard, C. M., Vasen, H., Seitz, S., Cannon-Albright, L. A., Schofield, A., Zelada-Hedman, M. *et* The Breast Linkeage Cancer Consortium. Genetic heterogenity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *American Journal of Human Genetic*. 1998, 62(3): 676-689.

Gao, M., Cui, H. R., Loe, D. W., Grant, C. E., Almquist, K. C., Cole, S. P., Deeley, R. G. Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275(17):13098-13108.

Gottesman, M. M. *et* Ambudjar, S. V. Overview: ABC transporters and human disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2001, 33(6):453-458.

Grant, C. E., Kurz, E. U., Cole, S. P., Deeley, R. G. Analysis of the intron-exon organization of the human multidrug-resistance protein gene (MRP) and alternative splicing of its mRNA. *Genomics*. 1997, 45(2):368-378.

Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*. 1992, 8:67-113.

Hipfner, D. R., Deeley, R. G., Cole, S. P. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999, 1461(2):359-376.

Hipfner, D. R., Gauldie, S. D., Deeley, R. G., Cole, S. P. Detection of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein, MRP, with monoclonal antibodies. *Cancer Research*. 1994, 54(22):5788-5792.

Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., Higgins, C. F. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*. 1990, 346(6282):362-365.

Ito, S., Ieiri, I., Tanabe, M., Suzuki, A., Higuchi, S., Otsubo, K. Polymorphisms of the ABC transporter genes, NDR1, MRP1 and MRP2/ cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics*. 2001, 11(2):175-184.

Jemal A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. Cancer Statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2010, 60(5):277-300.

Juszczynski, P., Niewiarowski, W., Krykowski, E., Robak, T., Warzocha, K. Expression of the multidrug resistance-associated protein (mrp) gene in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2002, 43(1):153-158.

Klein, I., Sarkadi, B., Váradi, A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999, 1461(2):237-262.

Klener, P. Bevacizumabum. *Remedia*. 2005. 15: 312-315.

Lacave, R., Coulet, F., Ricci, S., Touboul, E., Flauhault, A., Rateau, J. G., Cesari, D., Lefranc, J. P., Bernaudin, J. F. Comparative evaluation by semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of MDR1, MRP and GSTp gene expression in breast carcinomas. *British Journal of Cancer*. 1998, 77(5):694-702.

Langman, T., Mauerer, R., Zahn, A., Moehle, C., Probst, M., Stremmel, W., Schmitz, G. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clinical Chemistry*. 2003, 49(2):230-238.

Leschziner, G., Zabaneh, D., Pirmohamed, M., Owen, A., Rogers, J., Coffey, A. J., Balding, D. J., Bentley, D. B., Johnson, M. R. Exon sequencing and high resolution haplotype analysis of ABC transporter genes implicated in drug resistance. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2006, 16(6):439-450.

Leslie, E. M., Deeley, R. G., Cole, S. P. Multidrug resistance proteins: role of P-glykoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005, 204(3):216-237.

Leslie, E. M., Deeley, R. G., Cole, S. P. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology*. 2001, 167(1):3-23.

Leslie, E. M., Létourneau, I. J., Deeley, R. G., Cole, S. P. Functional and structural consequences of cysteine substitutions in the NH2 proximal region of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Biochemistry*. 2003, 42(18):5214–5224.

Letourneau, I. J. Deeley, R. G., Cole, S. P. Functional characterization of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the gene encoding human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pharmacogenetics and Genomics*. 2005, 15(9):647-657.

Liscovitch, M. et Lavie, Y. Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. *I Drugs: the investigational drugs journal*. 2002, 5(4):349-355.

Machackova, E., Foretova, L., Lukesova, M., Vasickova, P., Navratilova, M., Coene, I., Pavlu, H., Kosinova, V., Kuklova, J., Claes, K. Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2008, 8:140.

Medhurst, A. D., Harrison, D. C., Read, S. J., Campbell, C. A., Robbins, M. J., Pangalos, M. N. The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease model. *Journal of Neuroscience Methods*. 2000, 98(1):9-20.

Menzel, H. J., Sarmanova, J., Soucek, P., Berberich, R., Grünewald, K., Haun, M., Kraft, H. G. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *British Journal of Cancer*. 2004, 90(10):1989-1994.

Mohelníková-Duchoňová, B., Oliverius, M., Honsová, E., **Kunická, T.**, Souček, P. Relativní kvantifikace míry exprese genů kódující membránové transportéry pomocí real-time PCR metody (qPCR) - pilotní studie. Prezentována na konferenci: Diagnostika, léčba a prevence závažných civilizačních onemocnění.

Mužík, J., Dušek, L., Abrahámová, J., Koptíková, J. Stručný přehled epidemiologie zhoubného novotvaru prsu v České republice. *Onkologie*. 2009.

Nathanson, K. L. et Weber, B. L. 'Other' breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail. *Human Molecular Genetics*. 2001, 10(7):715-720.

Nooter, K., de la Riviere, G. B., Klijn, J., Stoter, G., Foekens, J. Multidrug resistance protein in recurrent breast cancer. *Lancet*. 1997b, 349(9069):1885-1886.

Nooter, K., de la Riviere, G. B., Look, M. P., van Wingerden, K. E., Henzen-Logmans, S. C., Scheper, R. J., Flens, M. J., Stoter, G., Foekens, J. A. The prognostic significance of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *British Journal of Cancer*. 1997a, 76(4):486-493.

Norris, M. D., Bordow, S. B., Marshall, G. M., Haber, P. S., Cohn, S. L., Haber, M. Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine*. 1996, 334(4):231-238.

Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál, V., Cwierka, K. Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. I. typická MDR. *Klinická Onkologie*. 2000, 2:4-9.

Oselin, K., Mrozikiewicz, P. M., Gaikovitch, E., Pahkla, R., Roots, I. Frequency of MRP1 genetic polymorphisms and their functional significance in Caucasians: detection of a novel mutation G816A in the human MRP1 gene. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2003, 59(4):347-350.

Park, S., Shimizu, C., Shimoyama, T., Takeda, M., Ando, M., Kohno, T., Katsumata, N., Kang, Y.-K., Nishio, K., Fujiwara, Y. Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2006, 99(1):9-17.

Perdu, J. et Germain, D.P. Identification of novel polymorphisms in the pM5 and MRP1 (ABCC1) genes at locus 16p13.1 and exclusion of both genes as responsible for pseudoxanthoma elasticum. *Human Mutation*. 2001, 17(1):74-75.

Perglerová, K. Úloha vybraných ABC transportérů v rozvoji karcinomu prsu : diplomová práce. Praha, 2010. 106 str.

Petruželka, L. Karcinom prsu - jak dál v diagnostice a léčbě ve světle nových možností. *Vnitřní lékařství*. 2007a, 53:22-23.

Petruželka, L. Současné možnosti a nové perspektivy systémové léčby karcinomu prsu. *Klinická Farmakologie*. 2007b, 21:103-113.

Pohlreich, P., Zikan, M., Stribrna, J., Kleibl, Z., Janatova, M., Kotlas, J., Zidovska, J., Novotny, J., Petruzelka, L., Szabo, C., Matous, B. High proportion of recurrent germline mutations in the *BRCA1* gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Research*. 2005, 7(5):R728-36.

Quinton, P. M. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiological Reviews*. 1999, 79(1 Suppl):S3-S22.

Ramjeesingh, M., Li, C., Garami, E., Huan, L.-J., Galley, K., Wang, Y., Bear, C. E. Walker mutations reveal loose relationship between catalytic and channel-gating activities of purified CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). *Biochemistry*. 1999, 38(5):1463–1468.

Ringfeil, F., Lebwohl, M. G., Christiano, A. M., Uitto, J. Pseudoxanthoma elasticum: Mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, 97(11):6001-6006.

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., Drumm, M. L., Iannuzzi, M. C., Collins, F. S., Tsui, L.-C. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989, 245(4922):1066-1073.

Roelofsen, H., Vos, T. A., Schippers, I. J., Kuipers, F., Koning, H., Moshage, H., Jansen, P. L., Müller, M. Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells. *Gastroenterology*. 1997, 112(2):511-521.

Rudas, M., Filipits, M., Taucher, S., Stranzl, T., Steger, G. G., Jakesz, R., Pirker, R., Pohl, G. Expression of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2003, 81(2):149-157.

Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Denèfle, P., Assmann, G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature Genetics*. 1999, 22(4):352-355.

Saito, S., Iida, A., Sekine, A., Miura, Y., Ogawa, C., Kawauchi, S., Higuchi, S., Nakamura, Y. Identification of 779 genetic variations in eight genes encoding the members of the ATP-binding cassette, subfamily C (ABCC/MRP/CFTR). *Journal of Human Genetics*. 2002, 47(4):147-171.

Schinkel, A. H. *et* Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003, 55(1):3-29.

Shani, N. *et* Valle, D. Peroxisomal ABC transporters. *Methods in Enzymology*. 1998, 292:753-776.

Sharom, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. 2008, 9(1):105-127.

Sobin, L. H. *et* Wittekind, C. TNM classification of malignant tumours. 6th ed. *Wiley-Liss*. 2002. ISBN 0-471-22288-7.

St. Pierre, M. V., Serrano, M. A., Macias, R. I., Dubs, U., Hoechli, M., Lauper, U., Meier, P. J., Marin, J. J. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000, 279(4):R1495-R1503.

Szakacs, G., Ozvegy, C., Bakos, E., Sarkadi, B., Váradi, A. Transitionstate formation in ATPase-negative mutants of human MDR1 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000, 276(3):1314-1319.

Šarmanová, J., Šůsová, S., Gut, I., Mrhalová, M., Kodet, R., Adámek, J., Roth, Z., Souček, P. Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *European Journal of Human Genetics*. 2004. 12(10): 848-854.

Thomas, H. *et* Coley, H. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*. 2003, 10(2):159-165.

Vaclavikova, R., Nordgard, S. H, Alnaes, G. I., Hubackova, M., Kubala, E., Kodet, R., Mrhalova, M., Novotny, J., Gut, I., Kristensen, V. N., Soucek P. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Farmacogenetics and genomics*. 2008a, 18(3):263-73.

Vaclavikova, R., Nordgard, S. H., Alnaes, G. A., Hubackova, M., Hlavata, I., Kodet, R., Mrhalova, M., Pecha, V., Kristensen, V. N., Gut, I., Soucek, P. The role of ABCB1 transporter gene in breast cancer resistance. 31st Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 10-14.12, 2008, San Antonio, Texas, USA. Abstrakt posteru je otištěn v Book of Abstracts SABCS 2008b, str. 305s.

Vandersompele, J., Kubista, M., Pfaffl, M. W. Reference gene validation software for improved normalization. in Logan, J., Edwards, K. et Saunders, N. Real-time PCR: Current technology and Applications. *Caister Academic Press*. 2009. ISBN:978-1-904455-39-4.

Vineis, P., Malats, N., Lang, M. et al. eds. IARC Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. Lyon, France. *Oxford University Press*. Publication number 148, 1999.

Walker, R. A. et Dearing, S. J. Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Research Treatment*. 1999, 53(2):167-176.

Wang, Z., Sew, P.-H., Ambrose, H., Ryan, S., Chong, S. S., Lee, E. D. J., Lee, C. G. L. Nucleotide sequence analyses of the MRP1 gene in four populations suggest negative selection on its coding region. *BMC Genomics*. 2006, 7:111.

Wang, Z., Wang, B., Tang, K., Lee, E. J. D., Chong, S. S., Lee, C. G. L. A functional polymorphism within the MRP1 gene locus identified through its genomic signature of positive selection. *Human Molecular Genetics*. 2005, 14(14):2075-2087.

Wittekind, C. et Bertolini, J. TNM system 2010 Amendments in the new 7th edition of the TNM classification of malignant tumours. *Onkologe*. 2010. 16: 175-180.

Wright, S. R., Boag, A. H., Valdimarsson, G., Hipfner, D. R., Campling, B. G., Cole, S. P., Deeley, R. G. Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. *Clinical Cancer Research*. 1998, 4(9):2279-2289.

Yin, J.-Y., Huang, Q., Yang, Y., Zhang, J.-T., Zhong, M.-Z., Thou, H.-H., Liu, Z.-Q. Characterization and analyses of multidrug resistance-associated protein 1

(MRP1/ABCC1) polymorphisms in Chinese population. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2009, 19(3):206-216.

Zhang, X., Ding, L., Sandford, A. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Molecular Biology*. 2005, 6(1):4.

Zhang, Y., Schuetz, J. D., Elmquist, W. F., Miller, D. W. Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologues in brain capillary endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004, 311(2):449-455.

<http://www.immunerecovery.net/Breast%20Cancer.htm>

<http://old.lf3.cuni.cz/histologie/atlas/demo/>

<http://www.mamma.cz/klasifikace/who-02.html>

<http://www.mamma.cz/klasifikace/who-02.html>

<http://www.mindupbioresearch.com/mdr.html>

<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>

.

9 Přílohy

Tab. č. 18: Přehled výsledků 11 SNPs.

Č. vzorku	Oblast 1			Oblast 2					Oblast 3	Oblast 4	
	rs35623	rs35625	rs11866794	rs4148350	rs4148351	rs35626	rs35628	rs4146353	rs4148356	rs3888565	rs3851711
38376	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	3 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39559	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39565	1 (G/G)	1 (C/C)	1 (G/G)	1(T/T)	1 (C/C)	1 (T/T)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)	1 (G/G)
39567	1 (G/G)	1 (C/C)	2 (G/C)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39573	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39577	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39585	1 (G/G)	2 (C/T)	2 (G/C)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39604	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39622	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39633	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39641	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	ND	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39646	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39648	1 (G/G)	1 (C/C)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)
39652	2 (G/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39658	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39668	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1 (A/A)	ND	2 (G/A)	2 (G/A)	1 (G/G)
39669	1 (G/G)	1 (C/C)	3 (C/C)	3 (G/G)	3 (T/T)	1 (T/T)	1 (A/A)	3 (T/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)
39671	1 (G/G)	1 (C/C)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39681	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39683	3 (T/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	ND	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39686	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39687	2 (G/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39689	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39695	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39718	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39719	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39722	3 (T/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	1 (T/T)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)	1 (G/G)
39731	2 (G/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39738	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39740	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39748	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39751	ND	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39758	1 (G/G)	2 (C/T)	2 (G/C)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39763	1 (G/G)	1 (C/C)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39774	2 (G/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39776	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39787	2 (G/T)	2 (C/T)	1 (G/G)	2 (T/G)	1 (C/C)	1 (T/T)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)	1 (G/G)
39803	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39804	2 (G/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39822	2 (G/T)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)
39829	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	2 (T/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39830	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)	2 (G/A)
39833	2 (G/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39836	2 (G/T)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)
39845	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39859	1 (G/G)	2 (C/T)	2 (G/C)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39862	1 (G/G)	2 (C/T)	2 (G/C)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39864	3 (T/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	1 (T/T)	3 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)	1 (G/G)
39878	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39894	ND	ND	ND	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)
39903	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39948	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39951	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
39962	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
39968	2 (G/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)	2 (G/A)
39972	2 (G/T)	2 (C/T)	2 (G/C)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	ND	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)
39975	1 (G/G)	2 (C/T)	2 (G/C)	3 (G/G)	2 (C/T)	1 (T/T)	2 (A/G)	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
39979	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40003	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40009	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40012	1 (G/G)	2 (C/T)	2 (G/C)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40029	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40033	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40071	1 (G/G)	1 (C/C)	1 (G/G)	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)

40076	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40083	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	ND	ND	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
40088	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40095	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40097	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40099	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40104	1 (G/G)	1 (C/C)	2 (G/C)	ND	ND	1 (T/T)	ND	ND	2 (G/A)	1 (G/G)	1 (G/G)
40106	2 (G/T)	2 (C/T)	2 (G/C)	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	ND	3 (A/A)
40112	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40127	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40135	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)
40157	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40163	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)	1 (G/G)
40167	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40173	ND	1 (C/C)	2 (G/C)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)
40175	3 (T/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	1 (T/T)	3 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)	1 (G/G)
40176	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40178	1 (G/G)	2 (C/T)	2 (G/C)	ND	ND	ND	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40179	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40190	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40192	ND	ND	ND	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
40195	ND	ND	ND	3 (G/G)	2 (C/T)	1 (T/T)	2 (A/G)	2 (G/T)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)
40196	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40219	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40232	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40235	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40251	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40273	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40278	ND	ND	ND	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)	1 (G/G)
40324	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40325	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
40326	1 (G/G)	2 (C/T)	2 (G/C)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40331	2 (G/T)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40346	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40364	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40405	2 (G/T)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)
40436	ND	ND	ND	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40448	ND	ND	ND	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)
40465	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40523	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)
40544	2 (G/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40547	2 (G/T)	2 (C/T)	2 (G/C)	3 (G/G)	1 (C/C)	ND	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)
40558	ND	ND	ND	2 (T/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	ND	ND	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
40563	ND	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
40567	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40572	ND	ND	ND	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
40591	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40601	ND	ND	ND	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
40602	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40626	ND	ND	ND	3 (G/G)	ND	ND	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40639	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40677	ND	ND	ND	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
40683	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	1 (T/T)	3 (G/G)	1 (G/G)	ND	2 (G/A)	1 (G/G)
40689	ND	ND	ND	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	ND	1 (G/G)	2 (G/A)
40692	ND	ND	ND	3 (G/G)	2 (C/T)	1 (T/T)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (C/C)
40707	ND	ND	ND	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40718	ND	ND	ND	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)
40724	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
40739	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2 (G/A)	1 (G/G)	2 (G/A)
40772	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
40783	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P3	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
P4	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
P7	1 (G/G)	1 (C/C)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)
P8	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	2 (T/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	2 (G/A)	1 (G/G)	2 (G/A)
P9	2 (G/T)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	2 (T/G)	2 (A/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)	2 (G/A)
P13	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
P15	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
P20	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	ND	ND	ND	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
P24	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
P32	1 (G/G)	2 (C/T)	2 (G/C)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (G/T)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
P43	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
P48	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	ND	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
P57	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	1 (C/C)	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
P65	1 (G/G)	3 (T/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	ND	3 (G/G)	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	3 (A/A)
P83	1 (G/G)	2 (C/T)	1 (G/G)	3 (G/G)	ND	ND	1 (A/A)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)	2 (G/A)
P86	1 (G/G)	1 (C/C)	3 (C/C)	3 (G/G)	3 (T/T)	1 (T/T)	1 (A/A)	3 (T/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)
P88	1 (G/G)	1 (C/C)	2 (G/C)	3 (G/G)	2 (C/T)	2 (T/G)	1 (A/A)	2 (G/T)	1 (G/G)	1 (G/G)	1 (G/G)

P89	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P91	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	2(A/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)	2(G/A)
P94	ND	ND	ND	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P99	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P100	2(G/T)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	2(T/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P103	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	2(T/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P105	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P106	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P108	1(G/G)	2(C/T)	2(G/C)	3(G/G)	2(C/T)	2(T/G)	1(A/A)	2(G/T)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)
P114	1(G/G)	1(C/C)	1(G/G)	2(T/G)	1(C/C)	2(T/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)	2(G/A)
P115	1(G/G)	1(C/C)	3(C/C)	3(G/G)	3(T/T)	1(T/T)	1(A/A)	3(T/T)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)
P116	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P119	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	3(T/T)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P120	2(G/T)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	2(T/G)	2(A/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)	2(G/A)
P121	1(G/G)	2(C/T)	2(G/C)	3(G/G)	2(C/T)	2(T/G)	1(A/A)	ND	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P123	1(G/G)	1(C/C)	3(C/C)	3(G/G)	3(T/T)	1(T/T)	1(A/A)	3(T/T)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)
P124	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	2(G/A)	1(G/G)	3(A/A)
P125	1(G/G)	2(C/T)	2(G/C)	3(G/G)	2(C/T)	2(T/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P127	2(G/T)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	2(T/G)	2(A/G)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P130	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P135	1(G/G)	1(C/C)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)
P138	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	ND	1(C/C)	3(G/G)	ND	ND	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P147	1(G/G)	1(C/C)	1(G/G)	2(T/G)	ND	2(T/G)	1(A/A)	ND	1(G/G)	2(G/A)	1(G/G)
P148	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	3(G/G)	ND	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P150	2(G/T)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	2(A/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)	2(G/A)
P154	2(G/T)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	2(T/G)	2(A/G)	ND	1(G/G)	2(G/A)	2(G/A)
P156	2(G/T)	2(C/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	2(T/G)	ND	ND	1(G/G)	2(G/A)	1(G/G)
P157	2(G/T)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	2(T/G)	ND	ND	1(G/G)	2(G/A)	2(G/A)
P171	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	ND	ND	2(T/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)	1(G/G)
P172	1(G/G)	2(C/T)	2(G/C)	3(G/G)	2(C/T)	2(T/G)	1(A/A)	2(G/T)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P174	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	2(T/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P176	1(G/G)	1(C/C)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	2(T/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)	1(G/G)
P177	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	2(A/G)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P178	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	1(T/T)	1(C/C)	2(T/G)	1(A/A)	1(G/G)	2(G/A)	1(G/G)	2(G/A)
P179	2(G/T)	2(C/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	2(T/G)	ND	ND	ND	2(G/A)	1(G/G)
P180	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	ND	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P181	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P182	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	2(G/T)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P184	1(G/G)	2(C/T)	2(G/C)	3(G/G)	2(C/T)	2(T/G)	1(A/A)	2(G/T)	ND	1(G/G)	2(G/A)
P186	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	ND	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	ND	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P187	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P188	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P189	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P190	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	2(G/T)	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P191	1(G/G)	2(C/T)	2(G/C)	3(G/G)	2(C/T)	2(T/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P193	1(G/G)	1(C/C)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	3(G/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)	1(G/G)
P195	1(G/G)	2(C/T)	1(G/G)	ND	ND	ND	ND	ND	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)
P196	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	ND	ND	ND	ND	ND	1(G/G)	1(G/G)	3(A/A)
P198	1(G/G)	3(T/T)	1(G/G)	3(G/G)	1(C/C)	2(T/G)	1(A/A)	1(G/G)	1(G/G)	2(G/A)	2(G/A)

ND = nebyl detekován.