

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Transkriptomové sekvenování u akutní lymfoblastické leukémie

Diplomová práce

Bc. Zuzana Bačová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: MUDr. Josef Srovnal, PhD.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením MUDr. Josefa Srovnala, Ph.D. a pouze s použitím citované literatury.

V Olomouci, 22. dubna 2015

.....

podpis

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Zuzana Bačová

Název práce: Transkriptomové sekvenování u akutní lymfoblastické leukémie

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP Olomouc

Vedoucí práce: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt

Technologie sekvenování nové generace výrazně urychlily oblasti genomického výzkumu. Jejich využití v analýze RNA transkriptů překonává a nahrazuje analýzu různými microarray platformami.

Akutní lymfoblastická leukemie je nejčastěji se vyskytující maligní onemocnění dětí. Celkové procento přežití u dětí dosahuje až 90 %. Stanovení profilů genové exprese umožňuje stanovit molekulárně-genetické vlastnosti onemocnění a navrhnout cílenou terapii.

V experimentální části byly metodou DNA microarray identifikovány různé splicingové varianty genů PTPN14 a IGF2BP3 mezi pacienty vykazujícími dobrou a špatnou odpověď na prednisolon.

Klíčová slova:

akutní lymfoblastická leukemie, masivní paralelní sekvenování (MPS), microarray, prednisolon

Bibliographical Identification:

Author's first and sure name: Bc. Zuzana Bačová

Title: Transcriptome sequencing in acute lymphoblastic leukemia

Type of thesis: diploma

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

Supervisor: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract

Next generation sequencing technology has significantly accelerated the field of genomic research. RNA sequencing is going to repeal and replace a different microarray platforms.

Acute lymphoblastic leukemia is the most common childhood malignant disease. The overall survival rate in children is up to 90 %. Gene expression profiles can determine molecular-genetic characteristics of the disease and propose targeted therapy.

In the experimental different splicing variations of PTPN14 and IGF2BP3 genes between patients who had good and poor response to prednisolone were identified using DNA microarray profiling.

Keywords:

acute lymphoblastic leukemia, massive parallel sequencing (MPS), microarrays, prednisolone

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D za odborné vedení a konzultace. A dále Mgr. Andree Benedíkové a Mgr. Hanušovi Slavíkovi za seznámení s laboratorními technikami. Práce vznikla za finanční podpory grantu IGA LF UP 2015 10.

Děkuji také své rodině a svému příteli za podporu a pochopení.

Obsah

1.	Úvod	8
2.	Současný stav řešené problematiky.....	9
2.1.	Leukemie	9
2.2.	Akutní lymfoblastická leukemie	9
2.2.1.	Klasifikace.....	9
2.2.2.	Klinické příznaky nemoci	10
2.2.3.	Incidence	11
2.2.4.	Diagnosticky a prognosticky významné geny.....	13
2.2.5.	Diagnostika	13
2.2.6.	Léčba	13
2.2.7.	Prognóza.....	14
2.3.	Sekvenování	15
2.3.1.	Historie sekvenování	15
2.3.2.	Maxam-Gilbertova metoda sekvenování	15
2.3.3.	Sangerova metoda sekvenování	16
2.3.4.	Technologie nové generace	17
2.3.4.1.	Pyrosekvenování- metoda 454/Roche	18
2.3.4.2.	Illumina (Solexa) Genome Analyzer	20
2.3.4.3.	Applied Biosystems (AB) SOLiD™ System.....	22
2.3.4.4.	Ion Torrent	24
2.3.4.5.	Sekvenování jednotlivých molekul DNA	25
2.3.4.5.1	Helicos Biosciences HeliScope™	25
2.3.4.5.2	Pacific Biosciences SMRT™	26
2.3.5.	Transkriptomové sekvenování	27
2.4.	Využití sekvenování v genové analýze ALL	28
2.5.	Technologie DNA čipů	29
3.	Cíl práce.....	30
4.	Materiál a metodika	31
4.1	Izolace RNA a DNA	31
4.1.1.	Materiál a reagentie	31
4.1.2.	Přístroje a zařízení.....	31
4.1.3.	Příprava roztoků	32

4.1.4.	Postup.....	32
4.2	Měření koncentrace a čistoty RNA spektrofotometricky.....	34
4.3	Kontrola kvality RNA prostřednictvím Agilent 2100 Bioanalyzer	35
4.3.1.	Materiál a reagentie	35
4.3.2.	Přístroje a zařízení.....	35
4.3.3.	Postup.....	35
4.4	Expresní čipy GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix).....	37
4.4.1.	Příprava Poly-A RNA kontrol.....	38
4.4.2.	Syntéza prvního vlákna cDNA.....	38
4.4.3.	Syntéza druhého vlákna cDNA	38
4.4.4.	Syntéza cRNA <i>In Vitro</i> Transkripce (IVT).....	39
4.4.5.	Purifikace cRNA	39
4.4.6.	Syntéza druhého vlákna cDNA	40
4.4.7.	Hydrolyza RNA s použitím RNasy H.....	40
4.4.8.	Purifikace druhého vlákna cDNA	41
4.4.9.	Fragmentace jednovláknové DNA	41
4.4.10.	Značení fragmentované jednovláknové DNA.....	42
4.4.11.	Hybridizace	42
5.	Výsledky.....	44
5.1.	Izolace RNA a DNA.....	44
5.2.	Kontrola kvality RNA přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer	46
5.3.	Human Exon 1.0 ST Array	48
6.	Diskuze	51
7.	Závěr.....	53
8.	Literatura	54
9.	Seznam použitých zkratk a symbolů	6

1. Úvod

Akutní lymfoblastická leukemie je nejčastěji se vyskytující maligní onemocnění dětského věku, nejčastěji pak postihuje děti mezi 2. a 5. rokem života. V současné době je diagnostika ALL založena na morfologických, genetických a imunofenotypických znacích, které umožňují odlišit normální hematopoetické buňky od buněk nádorových. Celkové přežití u dětské akutní lymfoblastické leukemie dosahuje až 90 % (Inaba et al., 2013). U dospělých pacientů dosahuje celkového vyléčení 40-50 % případů (Gökbuget et al., 2012). Dosažení lepších výsledků léčby souvisí s rozdělením pacientů do rizikových skupin na základě prognostických faktorů zahrnující věk, počet bílých krvinek, odpověď na léčbu, postižení centrální nervové soustavy a výskyt genetických abnormalit a s následným rozdělením do léčebných skupin dle stanoveného rizika. Nicméně riziko relapsu je značné, vyskytuje se přibližně u 20-25 % pacientů (Yeo, 2015).

Masivně paralelní sekvenování (MPS) představuje revoluci v genomovém výzkumu. Nejenže urychlilo některé oblasti genomického výzkumu, ale umožňuje experimenty, které dříve nebyly technicky nebo cenově proveditelné. Technologie se vyznačují společným znakem a to masivně paralelním sekvenováním až tisíců molekul DNA současně. Nabízejí také nové a rychlé způsoby charakterizace celého genomu, profilování mRNA, malých RNA, regionů transkripčních faktorů, struktury chromatinu a vzorů DNA metylace (Ansorge, 2009).

Sekvenování nové generace umožňuje charakterizaci rakoviny na genomových, transkriptomových a epigenetických úrovních. Identifikace znaků podílejících se na rozvoji akutní lymfoblastické leukemie se využívá ke stanovení prognózy a cílenější terapie. Ke stanovení genových profilů leukemických blastů se rovněž využívá technologie DNA microarray (Szczepanek et al., 2011).

2. Současný stav řešené problematiky

2.1. Leukemie

Leukemie, zastarale nazývána jako hemoblastóza, je krevní nádorové onemocnění. Tvoří 30 % zhoubných nádorů u dětí a představuje nejčastější nádorové onemocnění dětského věku (1-15 let) (www.linkos.cz). Onemocnění je zapříčiněné genetickými změnami v hematopoetické kmenové buňce, případně liniových progenitorech. Genetické změny znemožní normální diferenciaci buněk, znemožní odstranění mutované buňky apoptózou a podpoří proces proliferace a sebeobnovy. Dle klinického průběhu se leukemie klasifikuje na akutní a chronickou. Dále můžeme leukemii dělit na myeloidní a lymfoidní podle toho, jakou vývojovou linii hematopoetických buněk postihuje.

2.2. Akutní lymfoblastická leukemie

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je hematologická malignita vyskytující se ve všech věkových skupinách, avšak nejčastěji u dětí do 15 let. Ve skupině dětí do 15 let stoupá incidence o 0,8 % za rok a to nejvíc ve skupině od 2 do 5 let (Míhal, 2011).

ALL patří mezi velmi heterogenní onemocnění. Podle charakteristických genetických změn rozdělujeme ALL na několik genetických podtypů, které se liší svou prognózou a také druhem léčby (Teuffel et al., 2004). Celkové procento přežití u dětí se blíží 90 % (Šálek, 2012).

2.2.1. Klasifikace

Existuje několik klasifikací ALL. FAB (French-American-British) klasifikace patří k základnímu dělení, které rozlišuje jednotlivé skupiny na základě morfologických znaků a řadí je do těchto tří skupin:

1. L1- malé nádorové buňky, uniformní populace
2. L2- malé i velké nádorové buňky, heterogenní populace
3. L3- velké nádorové buňky s basofilní cytoplazmou a vakuolizací (Papajík et al., 2005).

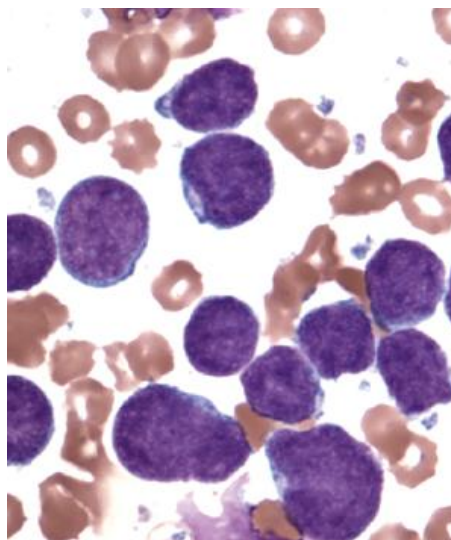
FAB rozdělení se v dnešní době považuje za zastaralé a prakticky se už nevyužívá. Ke stanovení léčby a následné prognózy se používá základní rozdělení dle WHO, která klasifikuje ALL na dvě skupiny:

1. B-lymfatické leukemie/lymfomy jsou častější a nesou znaky prekurzorů B-lymfocytů
2. T-lymfatické leukemie/lymfomy jsou méně časté a nesou znaky prekurzorů T-lymfocytů (Šálek, 2012).

Z těchto dvou základních skupin vychází i další dělení podle evropské skupiny pro imunologickou klasifikaci leukémií (EGIL). Základem je určitý imunofenotyp skupin, který se rozlišuje přítomností tzv. CD (z anglického „cluster of differentiation“) antigenů na povrchu buněk. Stanovením více znaků, lze lépe zvolit individuální léčbu daného pacienta (Starý, 2010).

2.2.2. Klinické příznaky nemoci

Klinické příznaky se mezi jednotlivými věkovými skupinami neliší. Objevuje se maligní bujení nádorových buněk, tzv. blastů, a potlačení normální hematopoézy. Hyperleukocytóza (výrazně vysoký počet leukocytů) není vždy zjištěna při diagnóze z periferní krve. Důsledek potlačení hematopoézy se projevuje jako anémie, trombocytopenie a neutropenie, která se vyznačuje zvýšenou náchylností k infekcím s febrilním průběhem. Převažují infekce respiračního a urogenitálního traktu a kůže. Anémie se vyskytuje až u 85 % pacientů a velmi často se projevuje zvýšenou únavou a bledostí. Trombocytopenii doprovází časté krvácivé kožní a slizniční projevy. Infiltrace lymfoblastů do extramedulárních orgánů (slezina, játra, kůže, lymfatické uzliny, varlata) způsobují zvětšení a následné poruchy funkce těchto orgánů. Lymfadenopatie může způsobit až obstrukci dýchacích a útlak velkých cév. Dále se až u 65 % pacientů objevují bolesti kloubů. U některých nemocných se prokáže v čase diagnózy leukemická infiltrace centrální nervové soustavy (CNS). Projevuje se neurologickými symptomy, jako je bolest hlavy, zvracení, nauzea, změna chování nebo paréza hlavových nervů (Míhal, 2011).

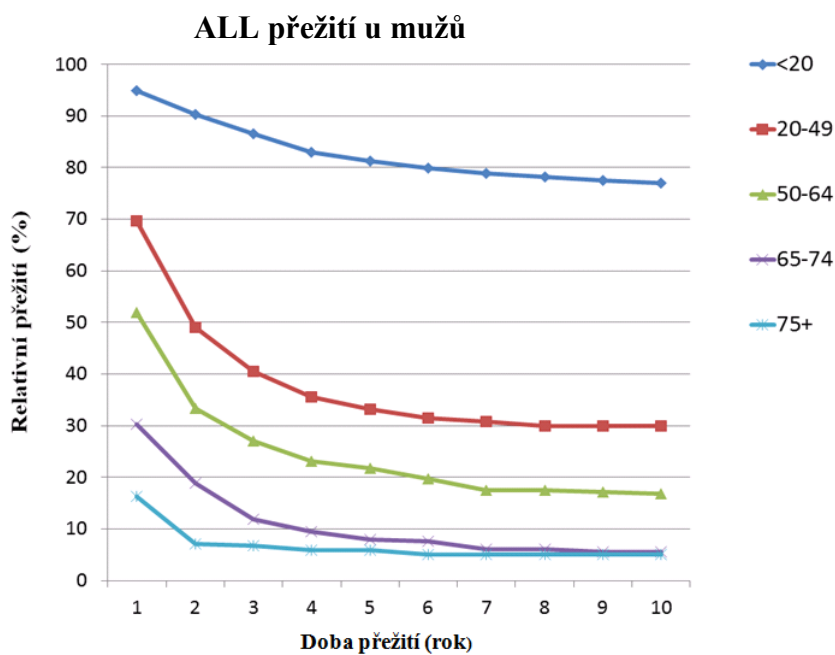


Obr. 1. Vzorek kostní dřeně s leukemickými lymfoblasty klasifikovány dle FAB do skupiny L3 obarven Giemsovým barvivem (Tsao et al., 2003)

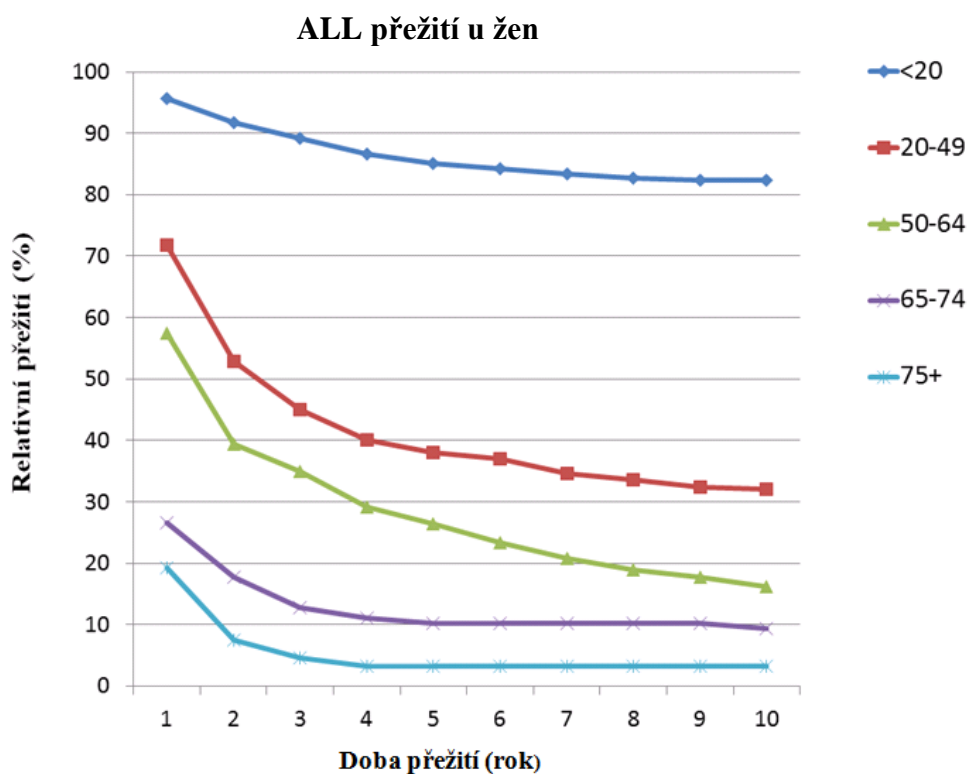
2.2.3. Incidence

ALL pravděpodobně vzniká jako abnormální odpověď organismu náchylného jedince na virovou infekci. Podle Knudsonovy teorie dvojího zásahu doprovází rozvoj nádoru dvě nevyhnutelné genetické události, prenatální – *in utero* a postnatální – v důsledku virové infekce. U dětské ALL postihuje první genetická událost především zralejší lymfatické progenitorové buňky, zatímco u ALL dospělých dochází k první genetické události v multipotentních kmenových buňkách. ALL se u dospělých vyznačuje vyšším počtem leukocytů, zvýšenou incidencí T-fenotypu (20-25 % u dospělé vs. 15 % dětské ALL), Philadelphským chromozomem (20-25 % u dospělé vs. 3-5 % dětské ALL) a také sníženým výskytem hyperdiploidie (5 % u dospělé vs. 25 % u dětské ALL).

Na rozvoji nemoci se podílí řada faktorů vnějšího i vnitřního prostředí. S ALL se spojují některé vrozené genetické choroby a to např. Downův syndrom, Wiskottův-Aldrichův syndrom, Bloomův syndrom, ataxia teleangiektazia nebo Fanconioho syndrom. Faktory vnějšího prostředí ovlivňující vznik onemocnění jsou především ionizující a neionizující záření. Ionizující záření zahrnuje α , β , γ a neutronové záření. Z neionizujícího záření působí negativně na člověka složky elektromagnetického záření a to hlavně ultrafialové záření. K chemickým látkám mající karcinogenní účinek patří benzen, pesticidy, formaldehyd a další. Mezi biologické faktory se řadí některé viry, jako je herpesvirus Epstein-Barrův, retroviry HTLV1 a HIV (Míhal, 2011).



Obr. 2. ALL přežití mužů podle věku a doby přežití v USA v letech 1988-2007 (www.medinfographics.com)



Obr. 3. ALL přežití žen podle věku a doby přežití v USA v letech 1988-2007 (www.medinfographics.com)

2.2.4. Diagnosticky a prognosticky významné geny

Na vývoji ALL se značně podílí chromozomové změny včetně translokací, které způsobují fúzi genů, ale také hyperdiploidie čítající více než 50 chromozomů. Chromozomální numerické nebo strukturní změny se vyskytují u více než 90 % dětí s ALL. Nejčastější chromozomální aberace je u dětí translokace t(12;21). Tento fúzní gen TEL/AML1 patří k prognosticky významným. Aberace vyskytující se u 20-25 % dětí se spojuje s příznivou prognózou (Stiller et al., 2004). Převážně u dospělých s ALL je často detekován Philadelphský chromozom, který vzniká translokací t(9;22). Jejím výsledkem je fúzní gen BCR/ABL. Pacienti s fúzním genem BCR/ABL se řadí do skupiny vysokého rizika a podstupují léčbu chemoterapií. Přestavbou dlouhého raménka chromozomu 11 vzniká fúzní gen MLL/AF4, který se velmi často vyskytuje u kojenců. Jeho přítomnost předpovídá velmi špatnou prognózu (Okamoto et al., 2010).

2.2.5. Diagnostika

Diagnostika ALL se opírá především o změny v krevním obraze a kostní dřeni, o genetické, cytogenetické, imunocytometrické a molekulárně-genetické vyšetření. Dále mohou být přítomné různé biochemické změny vyplývající z postižení tkání a orgánů infiltrací nádorových buněk. Diagnóza ALL v dětském věku ve většině případů nebývá obtížná. Výjimkou ale mohou být tzv. „doutnající leukemie“ nebo diagnostika v preleukemickém stavu, kdy se může vyskytovat řada nespecifických příznaků. Dnes mají své nezastupitelné místo ve stanovení cytogenetických abnormalit molekulárně-biologické metody. Nejvýznamnějším prognostickým znakem je však stále včasná a přesná diagnóza (Míhal et al., 2005).

2.2.6. Léčba

V současné době je léčba ALL výhradně protokolární. Rozdíly v léčebném postupu částečně záleží na rozdílných vlastnostech v jednotlivých podskupinách. Podle stupně rizika jsou pacienti řazeni do skupiny s nízkým, středním nebo vysokým rizikem. Vysoce rizikové podskupiny ALL se ve zvýšené frekvenci vyskytují v dospělé populaci. Výsledky léčby jsou statisticky méně příznivé než u ALL dětí a s kratší dobou přežití až o 30 %. U dětí je prognosticky příznivým faktorem věk 1 až 6 let, počet leukocytů pod 20 000/μl při zahájení léčby, dobrá odpověď na předfázní terapii prednisolonem a nepřítomnost nádorové infiltrace v centrálním nervovém systému (CNS). Naopak špatná prognóza se dá předpokládat u pacientů kojeneckého věku a dětí starších 10 let,

při počtu leukocytů nad 50 000/ μ l, špatné odpovědi na fázi s prednisolonem a leukemickou infiltrací CNS (Míhal, 2011).

Základní průběh je ve všech protokolech stejný. Hlavní součástí léčby je chemoterapie. Léčba začíná indukční chemoterapií, pokračuje několika cykly konsolidační chemoterapie a je ukončena udržovací léčbou, která trvá až několik let. V léčbě se uplatňují kombinace cytostatik běžných pro lymfoidní malignity: alkylační látky (cyklofosfamid), antracykliny (doxorubicin), alkaloidy (vinkristin), purinové analogy (cytarabin) a kortikosteroidy (prednisolon, dexametazon). Kortikoidy jsou důležitou součástí léčby ALL. Podávají se v prefázi za účelem cytoredukce. Pro prevenci leukemické infiltrace do CNS se intratekálně aplikuje např. metotrexát nebo cytarabin a pacienti podstupují radioterapii. U pacientů s vysokým rizikem se volí alogenní transplantace krvetvorných buněk. Zlepšení léčby umožňuje detekce minimální reziduální choroby (MRD), jejíž hladina se sleduje u pacientů po ukončení indukční léčby (Starý, 2010; Doubek et al., 2012).

2.2.7. Prognóza

Na celkové přežití má značný vliv věk pacientů, kdy u dětí přežívá až 90 % pacientů, zatímco u dospělých pacientů se celkové přežití pohybuje pod 50 % (Šálek, 2012). Relaps ALL postihne téměř polovinu pacientů. Jejich prognóza je velmi špatná, pětileté přežití je nižší než 10 % (Fielding et al., 2007). Značné riziko představuje vznik sekundárních malignit po ukončení léčby ALL. Riziko jejich vzniku trvale stoupá s odstupem chemoterapie. Nejčastěji se vyskytují sekundární malignity CNS (Kepák, 2009). Obecně však platí, že ALL dnes patří i přes vysoce toxickou léčbu s velkým množstvím nežádoucích účinků k dobře léčitelné a často vyléčitelné nemoci.

2.3. Sekvenování

2.3.1. Historie sekvenování

Na počátku sedmdesátých let 20. století bylo určení pořadí nukleotidů obtížné. Obvykle se provádělo nepřímo sekvenováním RNA nebo proteinů. První sekvenování provedl roku 1970 Ray Wu. Jednalo se o sekvenci 12 bp okrajových oblastí fága λ a její osekvenování trvalo tři roky.

Významný průlom v sekvenování znamenal rok 1977, kdy byly publikovány hned dvě sekvenační metody a to Sangerova a Maxam-Gilbertova. Obě metody umožňovaly z počátku přečíst 100 bází DNA v jednom běhu. Jejich postupným zdokonalováním se dosáhlo přečtení až 1000 bází. Pro svou jednoduchost a spolehlivost byla v laboratořích běžně používána Sangerova metoda. Pomocí tohoto postupu byl roku 1995 osekvenován první kompletní genom bakterie *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al., 1995). Sangerova metoda se stala také základem pro sekvenování lidského genomu (Lander et al., 2001).

Jelikož je Sangerova metoda časově i finančně nákladná, byla snaha objevit metody levnější, jednodušší a rychlejší. Na počátku 21. století se proto začaly vyvíjet technologie sekvenování nové generace. Jejich základním znakem je masivně paralelní sekvenování až tisíců molekul DNA současně.

2.3.2. Maxam-Gilbertova metoda sekvenování

Maxam-Gilbertova metoda je založena na chemické modifikaci DNA a následném štěpení specifických dNTPs. Krátké sekvence DNA ať už jednořetězcové či dvouřetězcové jsou na 5' nebo 3' konci označeny radioaktivním fosforem ^{32}P . Značené fragmenty DNA se v klasickém případě rozdělí na pět částí a každá z nich je vystavena působení chemikálie, která modifikuje určitý typ báze. Mezi chemikálie, které navozují modifikace bází, patří dimethylsulfát (modifikuje guanin), hydrazin (modifikuje cytosin a thymin), hydrazin za přítomnosti NaCl (modifikuje cytosin), hydroxid sodný (modifikuje adenosin a cytosin) a piperidin (modifikuje adenosin a guanin). Podmínky reakce se nastaví tak, aby byla poškozena jen jedna báze v řetězci. DNA je následně vystavena při vysoké teplotě působení piperidinu, což vede k rozštěpení DNA v modifikovaných místech.

Fragmenty DNA z jednotlivých reakcí jsou rozděleny elektroforézou v denaturujícím polyakrylamidovém gelu. Po ukončení elektroforézy je gel vystaven působení γ -záření, čímž jsou detekovány fragmenty DNA, které byly na začátku označeny radioaktivním

³²P. Podle pozice jednotlivých pruhů se stanoví sekvence DNA (Maxam et Gilbert, 1977).

Metoda má řadu nevýhod, jako je použití radioaktivního značení, ovlivnění reaktivity chemických činidel různými nečistotami nebo nejednoznačnost zjištěných dat.

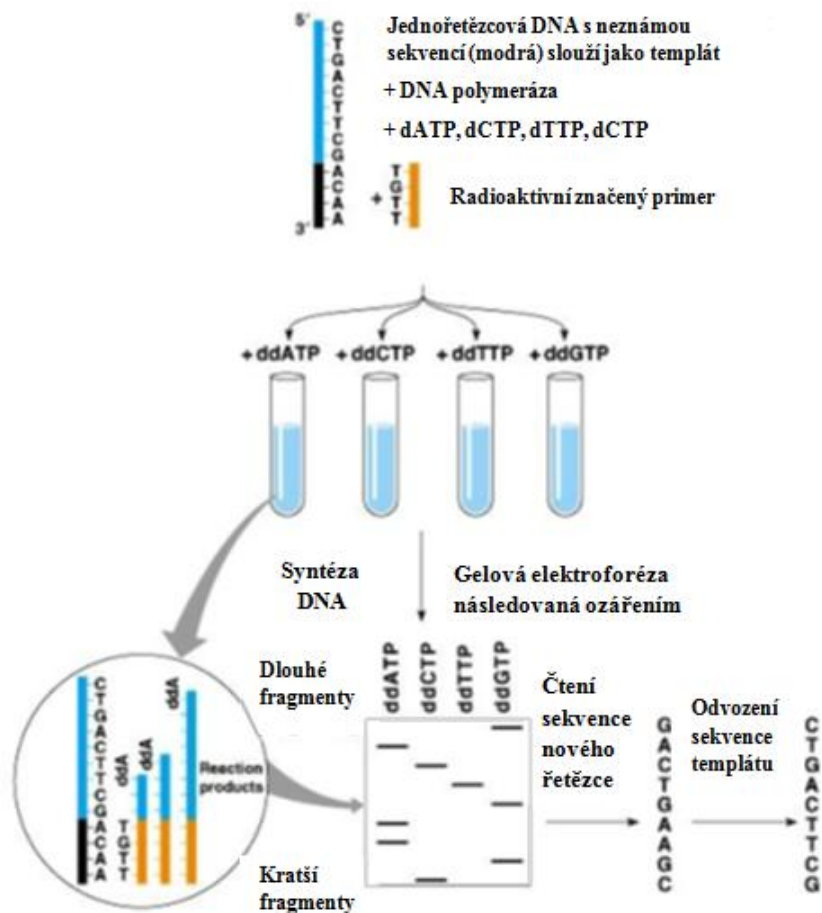
2.3.3. Sangerova metoda sekvenování

Sangerova metoda, označována taky jako enzymová nebo dideoxy metoda, byla vyvinuta z techniky sekvencování +/-, u které bylo poprvé využito prodloužení primeru DNA-polymerázou a její specifické zakončení. Metoda je založena na procesu replikace DNA.

Experiment začíná přípravou tzv. DNA knihovny, kdy je námi studovaná DNA rozštěpená na kratší úseky a ty jsou klonovány do vektorů. Amplifikace vektorů pak probíhá *in vivo* v bakteriálních buňkách. Z nich jsou následně extrahovány plazmidy nesoucí klonované fragmenty.

Sekvence probíhá ve čtyřech oddělených zkumavkách, do kterých je přidána reakční směs obsahující radioaktivně značené primery ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$), templát DNA, DNA-polymerázu, dNTPs a jejich analogy ddNTPs. Do každé reakce je přidán jeden druh ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP nebo ddTTP) v nízké koncentraci (poměr ddNTP:dNTP většinou odpovídá 1:100), aby mohla probíhat i klasická syntéza DNA. Po inkorporaci ddNTP do rostoucího řetězce je ukončena jeho elongace, jelikož ddNTP neobsahuje 3'-OH skupinu a nemůže se tak připojit další nukleotid. Výsledkem reakce jsou fragmenty DNA o různé délce začínající radioaktivně značeným primerem a končící daným ddNTP. Fragmenty jsou následně denaturovány a rozděleny podle velikosti elektroforézou na polyakrylamidovém gelu, kde má každá reakční směs svou dráhu. Po ozáření lze z proužků na gelu odvodit sekvenci DNA (Sanger et al., 1977).

Reakce může taky probíhat pouze v jedné zkumavce a to v případě, kdy jsou jednotlivé ddNTPs značeny různými fluorescenčními barvivy (Prober et al., 1987). Nové metody oproti této nevyžadují klonování DNA do bakteriálních vektorů, při němž dochází k disproporciálnímu zastoupení DNA fragmentů v DNA knihovně. Prakticky jde v jedné reakci určit sekvenci templátového vlákna o délce 400-800 bp.



Obr. č. 4: Postup Sangerovy metody. Do každé ze čtyř zkumavek je přidána templátová DNA, DNA-polymeráza, radioaktivně značený primer, dNTPs a jeden typ ddNTP, který ukončí syntézu DNA. Po seřazení fragmentů na gelu, lze odečíst sekvenci templátu (www.zo.utexas.edu; převzato a upraveno)

2.3.4. Technologie nové generace

Termín MPS (massive parallel sequencing) označuje technologie sekvenování, které se vyznačují vysokou automatizací. Platformy MPS sdílejí společný technologický znak a to masivně paralelní sekvenování klonálně amplifikovaných nebo jednotlivých molekul DNA. Technologie výrazně urychlily některé oblasti genomického výzkumu a umožňují experimenty, které dříve nebyly technicky proveditelné nebo cenově dostupné (Voelkerding et al., 2009).

Metody MPS můžeme rozdělit podle dvou základních kritérií. Podle vstupního materiálu na genomové, RNA a ampikonové sekvenování. Dále je můžeme rozdělit na metody, které jsou založeny na PCR reakci. Mezi ně můžeme zařadit platformy Roche 454 Genome Sequencer (Roche Diagnostics Corp., Branford, CT, USA), HiSeq 2000

(Illumina Inc., San Diego, CA, USA), AB SOLiD™ System (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) a Ion Personal Genome Machine (Life Technologies, South San Francisco, CA, USA). Další skupinu tvoří tzv. ‘single-molecule’ sekvenační (SMS) technologie, do které patří systémy HeliScope (Helicos BioSciences Corp., Cambridge, MA, USA) a PacBio RS SMRT system (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA). Tato druhá skupina nezahrnuje před samotným sekvenováním krok amplifikace (Shokralla et al., 2012).

2.3.4.1. Pyrosekvenování- metoda 454/Roche

Pyrosekvenování patří mezi první sekvenační metody nové generace. Již v roce 1987 popsali P. Nyrén et al. enzymatickou metodu, která detekuje aktivitu DNA-polymerázy. V roce 2000 byla založena společnost 454 Life Sciences. Tato firma vyvinula první komerčně dostupnou platformu MPS. V květnu roku 2005 uzavřela společnost dohodu s Roche Diagnostics, která měla zajistit distribuci sekvenačních přístrojů a činidel (Jarvie, 2005). Ve stejném roce uvedla firma Roche na trh první zařízení pro masivní paralelní sekvenování Genome Sequencer System (GS System). Přístroj byl během několika let nahrazen výkonnějším zařízením Genome Sequencer FLX+ System (GS FLX+ System) a následně se na trhu v roce 2010 objevil sekvenátor Genome Sequencer Junior System (GS Junior System). V současnosti je během jednoho běhu přečteno až 1 milion sekvencí (www.454.com).

Technologie 454 zahrnuje tři hlavní kroky: přípravu „knihovny“ jednořetězcové DNA (sstDNA), PCR amplifikace v emulzi (emPCR) a samotné sekvenování (pyrosekvenování).

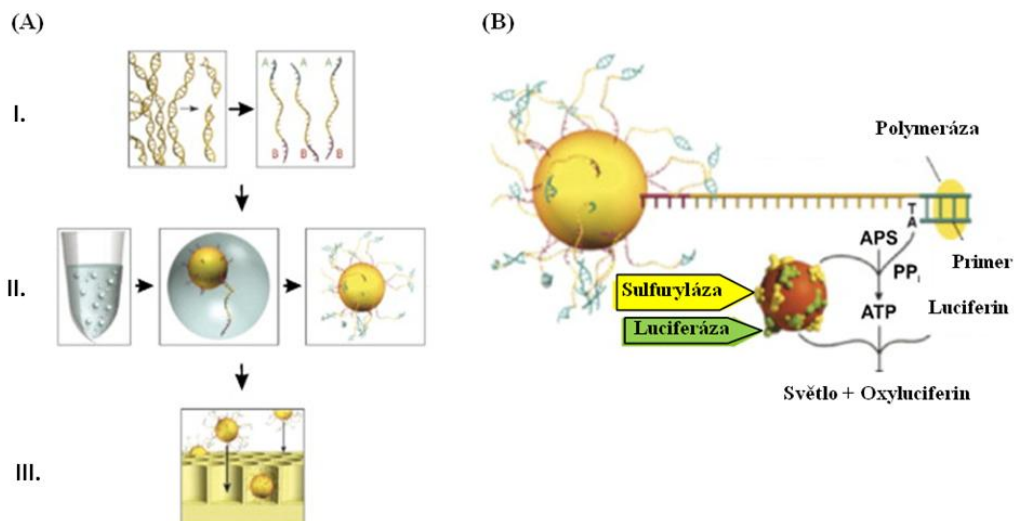
Vzorek genomové DNA, produktů PCR, cDNA nebo krátkých RNA je na začátku rozštěpen na krátké fragmenty o délce 300-800 bp. Štěpení proběhne pomocí vysoce stlačeného dusíku tzv. nebulizací. Na 3' a 5'-konce jsou naligovány adaptory A a B. Fragmenty jsou následně zachyceny na kuličky pokryté streptavidinem. Zachycení umožňuje adaptor B obsahující biotinovou značku. Vyselektují se tak fragmenty, které obsahují na jednom konci A a na druhém konci B adaptor, zbytek vzorku je odmyt. V případě, kdy je vstupní vzorek dvouřetězcová DNA, proběhne krok denaturace. Při ní je nebiotinylovaný řetězec uvolněn a je použit jako jednořetězcová templátová DNA. Tímto způsobem je připravena tzv. sstDNA knihovna (Torres et al., 2008).

Amplifikace probíhá pomocí emulzní PCR. Knihovna sstDNA je navázána na agarózových kuličkách o velikosti 28 µm. Fragmenty jsou připojovány ke kuličkám za

takových podmínek, aby se na jednu kuličku navázal jeden fragment. Ke kuličkám jsou přidány reagenty pro PCR a olej. Následně je vytvořena emulze, kdy je každá kulička s DNA zachycena v kapce reakčního roztoku obklopeného olejem. Každá kapka tvoří tzv. mikroreaktor. Proběhne paralelní amplifikace DNA, jejímž výsledkem je přibližně 10^7 kopií templátu na kuličku. Po ukončení PCR reakce dojde k rozbití mikroreaktorů pomocí detergentu (Margulies et al., 2005).

Masivně paralelní sekvenování probíhá na pikotitrační destičce tvořené optickými vlákny. Jamky jsou konstruovány tak, aby se do jedné jamky o průměru 44 μm vešla právě jedna kulička. Přesto se v 2-5% jamek nachází dvě a více kuliček. Pikotitrační destička je zaplněna pouze z 35 %. Předchází se tak optickým a chemickým interakcím mezi jamkami. K vytvoření jednotlivých sekvenačních reaktorů jsou do jamek přidávány směsi menších kuliček obsahující nadbytek DNA-polymerázy, ATP sulfurylázy a luciferázy. Na jednovláknovou DNA se nahybridizuje primer. Destička je pak postupně promývána jednotlivými druhy nukleotidů (adenin, guanin, cytosin nebo thymin). V případě inkorporace specifické báze je uvolněn pyrofosfát, který je ATP sulfurylázou přeměněn na ATP. ATP je spotřebováno v další reakci, v níž enzym luciferáza přemění luciferin na oxyluciferin a světlo. Před dalším cyklem jsou neinkorporované nukleotidy degradovány pomocí apyrasy (Rothberg et Leamon, 2008). Světelné signály jsou zachyceny CCD (z anglického „the charge-coupled device“) kamerou. Z intenzity signálu lze odečíst, kolik nukleotidů bylo začleněno do řetězce (Margulies et al., 2005). Výstupem je pyrogram, ze kterého se odečítá nukleotidová sekvence dané DNA. Problém nastává při přesném určení sekvence u homopolymerů. Detektor je schopen rozeznat maximálně osminásobek signálu (Becker et al, 2012).

Touto technologií lze provést i paralelní analýzy více vzorků najednou. Kromě adaptoru A je na každý vzorek připojena jedinečná sekvence MID (z anglického Multiplex Identifiers) (Sandberg et al., 2011).



Obr. č. 5: (A) Postup pyrosekvenování: I. Fragmentace vzorku, příprava DNA knihovny; II. Vložení mikrokuliček s navázaným fragmentem do zkušavky s reagensii pro emPCR, amplifikace úseku DNA; III. Vložení mikrokuliček s amplifikovanými úseky na pikotitrační destičku; (B) Sekvenační reakce pyrosekvenování pomocí přístroje Roche Genome Sequencer (www.454.com; převzato a upraveno).

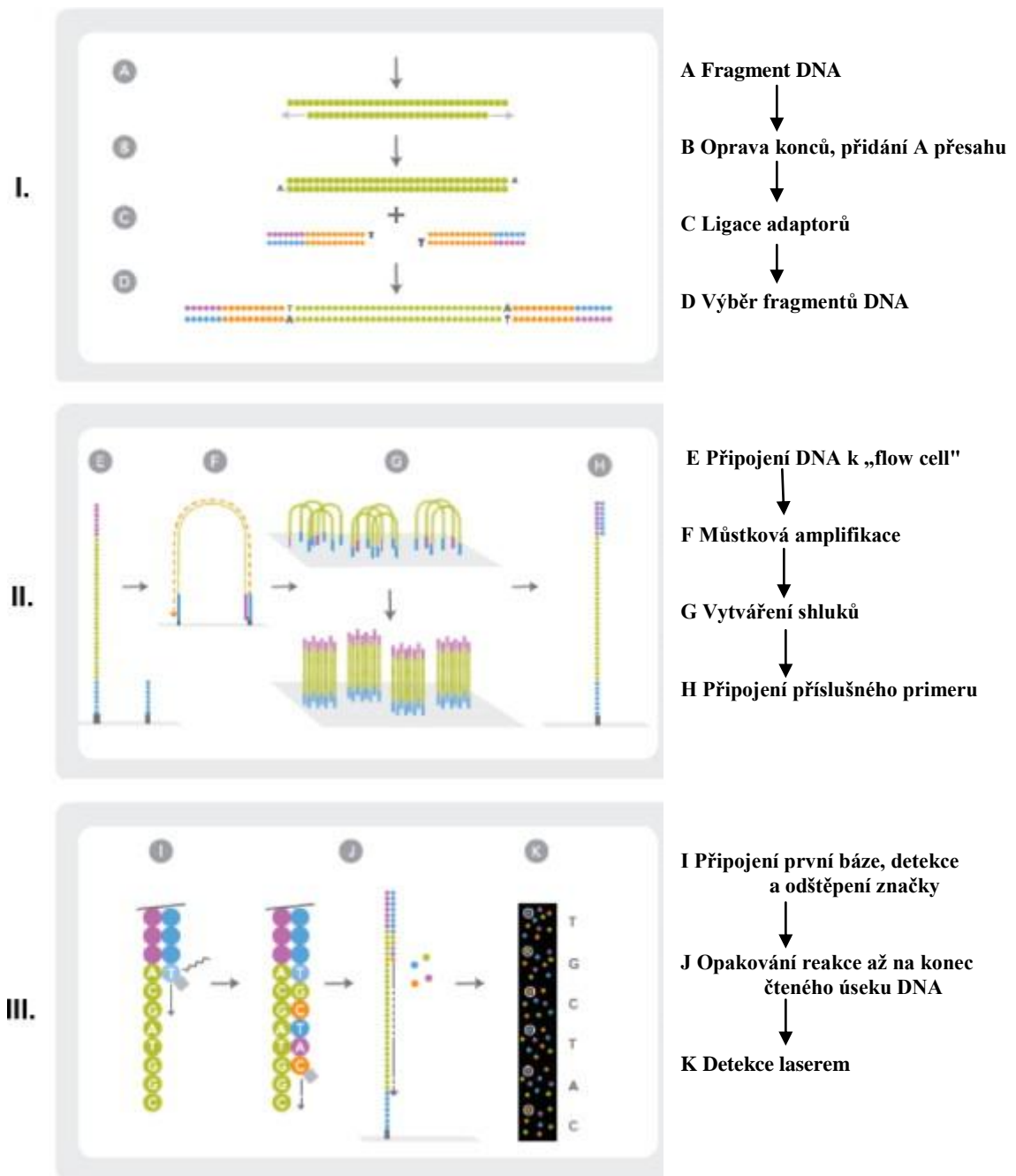
2.3.4.2. Illumina (Solexa) Genome Analyzer

V roce 2006 představila společnost Solexa sekvenační zařízení Genom Analyzer. O rok později odkoupila Solexu firma Illumina. Jedná se o sekvenační platformu, která čte krátké úseky DNA (www.illumina.com¹). Na počátku byla čtecí délka omezena na 35 bp, současné sekvenátory dokážou přečíst 75-150 bp (Chaisson et al., 2009). Původně byla tato technologie určena pro resekvenování genomu. V dnešní době se platformy firmy Illumina používají nejen pro sekvenování celých genomů, ale i pro analýzu transkriptomů, včetně krátkých RNA (www.illumina.com²).

V prvním kroku je připravena DNA knihovna pomocí nebulizace (35 psi, 6 minut). DNA řetězec je vlivem stlačeného vzduchu rozštěpen na kratší fragmenty. K vytvoření tupých konců se používá T4 DNA-polymeráza, Klenowův fragment a polynukleotid kináza T4. Na 3' tupé konce fosforylovaných DNA fragmentů je přidána báze adenin. Využívá se zde 3'-5' exopolymerázová aktivita Klenowova fragmentu. Adeninový přesah umožňuje ligaci dvou rozdílných oligonukleotidových adaptérů, které mají na svém 3'konci thyminový přesah pro zvýšení účinnosti ligace. Prostřednictvím gelové elektroforézy jsou vybrány fragmenty o délce 200-250 bp (Croucher et al., 2009).

Fragmenty dané délky jsou prostřednictvím adaptorů připojeny k oligonukleotidům na pevném povrchu platformy. Dále je dosyntetizováno druhé vlákno a to původní je odmyto. Na povrchu destičky se nacházejí oligonukleotidy komplementární k oběma typům adaptorů a slouží jako primery pro PCR reakci. Následuje izotermická amplifikace fragmentů, která probíhá tzv. můstkovou PCR (z anglického „bridge“ PCR). Přichycený fragment se po přidání enzymů ohne, naváže se svým volným koncem k druhému typu oligonukleotidu na povrch destičky a dojde k dosyntetizování druhého vlákna. Následně proběhne denaturace a ohnutí fragmentů k dalším oligonukleotidům (Voelkerding et al., 2009). Celý proces se několikrát opakuje a dochází při něm k tzv. „vytváření shluků“ (z anglického „cluster generation“). Jednotlivé „shluky“ obsahují až 1000 kopií jednoho fragmentu (Delseny et al., 2010). Amplifikace probíhá proto, aby byl získán dostatečně intenzivní světelný signál pro spolehlivou detekci jednotlivých bází. Platforma je rozdělena na osm oddělených linií, což umožňuje osekvenovat v jednom běhu až osm různých vzorků (Boyle et al., 2012). Reverse vlákna jsou z povrchu destičky odmyta a samotná sekvenace probíhá na forward vláknech. Nejprve je na vlákno nahybridizován primer komplementární k sekvenci adaptéru. Dále je přidávána polymeráza se směsí čtyř fluorescenčně značených nukleotidů. Báze nesou na svých 3' koncích značku, která zároveň slouží jako terminátor polymerace. Během každého sekvenačního cyklu se začlení do řetězce pouze jedna báze. Značka je po detekci laserem enzymaticky odštěpena a odmyta, což umožní zabudování dalšího nukleotidu. Typ začleněné báze je rozpoznán podle fluorescenčního barviva charakteristického pro každou bázi. Proces se opakuje, až je přečtená celá sekvence (Voelkerding et al., 2009).

Sekvenování lze provádět dvěma způsoby. Sekvenci lze přečíst v jednom směru tzv. „single long read“ nebo se postupuje proti sobě z obou konců tzv. „pair end read“ sekvenování. Sekvenování párových konců umožňuje zachytit inserce, delece a je to taky vhodný postup pro sekvenování *de novo* (Sengupta et al., 2011).



Obr. č. 6: I. Příprava DNA knihovny; II. Proces amplifikace fragmentů z DNA knihovny; III. Proces vlastní sekvenace (Ansorge, 2009; převzato a upraveno)

2.3.4.3. Applied Biosystems (AB) SOLiD™ System

Na podzim roku 2007 uvedla společnost Applied Biosystems na trh sekvenční systém SOLiD (z anglického „Sequencing by Oligo Ligation and Detection“). Technologie je založena na principu ligace oligonukleotidů. V současnosti jsou dostupné dva sekvenční systémy této společnosti a to 5500 a 5500xl SOLiD™ System. AB SOLiD™ deklaruje sekvenaci s přesností 99,99% (www.lifetechnologies.com¹).

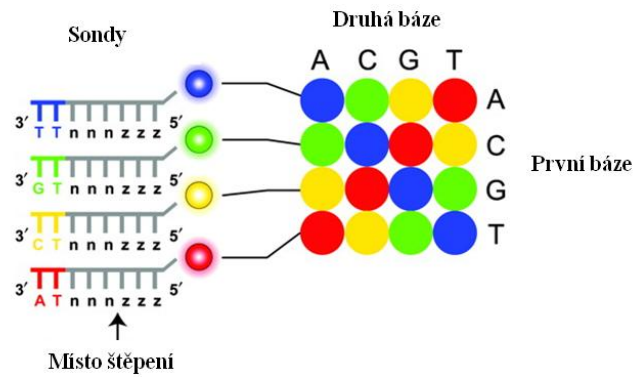
U technologie SOLiD lze připravit DNA knihovnu dvěma způsoby v závislosti na druhu experimentu. První způsob je příprava tzv. fragmentové DNA knihovny, kdy je izolovaná DNA rozštěpena na fragmenty o délce 60-90 bp. Na jejich 5'-konec se naváže adaptor P1 a na 3'-konec se naváže adaptor P2. Oba adaptory mají délku 25 bp. Druhým způsobem se připraví tzv. „mate-paired“ neboli párová DNA knihovna. Fragmenty jsou od sebe odděleny vyjmutím úseku o známé délce a následně dojde pomocí ligace k začlenění interního adaptoru. Dále se na 5'-konec a 3'-konec navážou adaptory P1 a P2 jako v předchozím případě. Tento druhý způsob nám poskytuje informace nejen o sekvenci DNA, ale i o fyzické vzdálenosti mezi dvěma fragmenty v genomu. Zpřesňuje se tak sekvenování repetitivních oblastí a určení strukturních aberací (inverze, inserce, delece) (Ansorge, 2009).

Amplifikace DNA fragmentů probíhá podobně jako u metody 454/Roche. Fragmenty DNA jsou navázány na magnetické kuličky o průměru 1 μ m. Dále proběhne klonální amplifikace pomocí emulzní PCR. Následuje denaturace amplifikovaných fragmentů DNA. U vybraných mikrokuliček proběhne modifikace 3'-konce, aby se kovalentně navázaly na povrch speciálně upraveného sklíčka. Sklíčko obsahující mikrokuličky je pak vloženo do sekvenátoru (Shokralla et al., 2012).

V prvním kroku sekvenování dochází k navázání univerzálních primerů na P1 adaptor. Poté jsou přidány oktamerní oligonukleotidy obsahující specifickou fluorescenční značku a DNA-ligáza. Specificitu oligonukleotidu zajišťují první dvě báze a ty určují také jednu ze čtyř fluorescenčních značek. Zbytek sekvence je degenerovaný. Po navázání oktameru dojde k odštěpení posledních tří bází společně s fluorescenční značkou a je tak umožněn další hybridizační a ligační cyklus. V druhém cyklu se určují báze v pozici 6 a 7 za primerem, ve třetím báze v pozici 11 a 12, atd. Množství cyklů závisí na délce dané sekvence DNA (Ansorge, 2009).

Nasyntetizované vlákno se odstraní a celý cyklus se opakuje, ale tentokrát s primerem o jeden nukleotid kratší než původní primer. Určují se tam báze na pozici 0 a 1, 5 a 6, atd. Sekvenování proběhne celkem pětkrát, pokaždé s jinak dlouhým primerem. Každá báze je tímto opakováním osekvenována dvakrát (www.appliedbiosystems.com).

K vyhodnocení detekovaných signálů využívá SOLiD System tzv. dvoubázového dekódování (anglicky „two base encoding“). Celkem existuje 16 možných kombinací dvojic bází. Pro detekci se používají čtyři fluorescenční barvy např. modrá pro dvojici bází AA, CC, GG a TT (viz. obr. č. 7). A je to právě dvojitá detekce, díky níž vykazuje tato metoda vysokou přesnost (Voelkerding et al., 2009).



Obr. č. 7: Dvoubázové dekódování. V případě záměny jedné barvy oproti referenční sekvenci se jedná o systémovou chybu, záměna dvou barev znamená jednonukleotidový polymorfismus (Voelkerding et al., 2009; převzato a upraveno).

2.3.4.4. Ion Torrent

Na konci roku 2010 představila společnost Life Technologies platformu Ion Personal Genome Machine (PGM). Technologie je založena na elektrochemické detekci vodíkových iontů, které jsou uvolňovány po začlenění nukleotidu do rostoucího řetězce DNA. Jedná se o první sekvenátor DNA, který pro určení bází DNA nevyužívá světelný signál vznikající během sekvenační reakce (Liu et al., 2012).

V současné době se na trhu objevují tři druhy sekvenátorů: Ion PGM Sequencer, Ion Proton System I a Ion Proton System II. První zmíněný sekvenátor se používá při sekvenování malých genomů. Ion Proton System I je vhodný pro zkoumání exomových sekvencí a transkriptomů. Nejnovější typ Ion Proton System II lze využít k sekvenování celého lidského genomu (Shokralla et al., 2012).

Jako u předchozích metod je nejprve nutné připravit DNA knihovnu. Konstrukce knihovny probíhá obdobně jako u technologie 454/Roche. Stejně jsou i naligovány adaptory, pomocí nichž se jednořetězcová DNA naváže na hydrogelové kuličky o velikosti 2 μm . Následně proběhne klonální amplifikace prostřednictvím emulzní PCR. V dalším kroku je vzorek nanesen na polovodičový čip obsahující milión jamek (Bragg et al., 2013). Centrifugací jsou kuličky rozmístěny do jamek, tak aby byla v jednotlivých jamkách nanejvýš jedna kulička (www.lifetechnologies.com²).

Při začlenění dNTP do rostoucího vlákna DNA dojde ke vzniku kovalentní vazby, uvolnění pyrofosfátu a kladně nabitého iontu vodíku. Do jamek s kuličkami, ke kterým je připojeno velké množství jednovláknové templátové DNA, je přidána DNA-polymeráza. Čip je postupně promýván jednotlivými typy nukleotidů. Pokud dojde k začlenění jednoho nukleotidu do rostoucího vlákna a uvolnění vodíkového iontu, tak

tento náboj změní pH roztoku o 0,02 jednotky. Pod jamkami se nachází k iontům citlivá vrstva a senzor, který signál převede do digitální podoby (Bragg et al., 2013). Čipy jsou vyrobeny pomocí tzv. CMOS procesu (z anglického complementary metal-oxide-semiconductor), díky čemuž může být signál snímán a převáděn (Merriman et al., 2012).

Pokud se inkorporují do rostoucího vlákna dvě a více stejných bází, signál se zvětší. Problém nastává u homopolymerů. Sekvenátor dokáže přesně detekovat čtyři až pět po sobě jdoucích stejných bází, při delším homopolymerním úseku se zvyšuje chybovost (Bragg et al., 2013).

Mezi hlavní výhody iontově polovodičového sekvenování patří nízké počáteční a provozní náklady a velká rychlost sekvenování (Jünemann et al., 2012).

2.3.4.5. Sekvenování jednotlivých molekul DNA

Systémy, které jsou popsány výše, využívají k získání dostatečně silného světelného signálu amplifikaci vzorku DNA. Během klonování DNA pomocí PCR reakce může dojít k záměně některých bází nebo k upřednostnění určitých sekvencí před jinými. Ve výsledku se tak změní relativní četnost a množství různých fragmentů DNA, které se vyskytovaly ve vzorku před amplifikací. Těmto nepřesnostem lze předcházet, pokud se stanoví sekvence přímo z jedné molekuly DNA. Metody sekvenace jednotlivých molekul DNA vyžadují velmi citlivý systém pro zachycení světelného signálu (Ansorge, 2009).

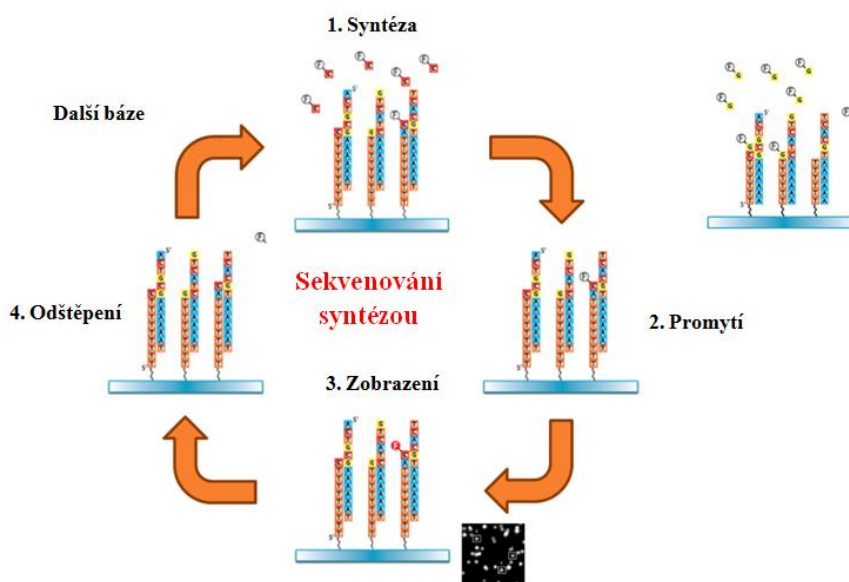
2.3.4.5.1. Helicos Biosciences HeliScope™

Braslavsky et al. popsali v roce 2003 postup pro sekvenování jednotlivých molekul DNA. V roce 2007 uvedla společnost Helicos Biosciences na trh první sekvenátor pod názvem HeliScope, který pracuje na základě této metody.

Vzorek DNA je rozštěpen na fragmenty o délce 100-200 bp a 3' konce jednotlivých fragmentů jsou polyadenylovány. Poslední adenosin nese fluorescenční značku. Denaturované polyadenylované vlákna hybridizují k poly(dT) oligonukleotidům imobilizovaných na povrchu sklíčka v průtokové cele (anglicky „flow-cell“). Na sklíčku je možno zachytit až 100×10^6 templátových vláken na centimetr čtvereční. Umístění zachycených řetězců zaznamenává CCD kamera (Voelkerding et al., 2009). Po detekci je fluorescenční značení odštěpeno. Aby mohlo proběhnout samotné sekvenování, přidá se na destičku DNA-polymeráza a jeden ze čtyř dNTP označený cyaninovým barvivem

Cy5. Pokud dojde k inkorporaci do řetězce, CCD kamera zaznamená v dané poloze fluorescenci Cy5. Následně dojde k promytí průtokové cely a odštěpení koncového značení. Celý proces se znova opakuje přidáním dalšího značeného dNTP (Thompson et Steinmann, 2010).

Brzy po svém zavedení byla technologie použita k resekvenování genomu viru M13 (Harris et al., 2008).



Obr. č. 8: Postup sekvenace pomocí platformy firmy HeliScope™ má následující kroky: syntéza (1), promytí (2), zobrazení (3) a odštěpení (4). Po odštěpení je přidána další báze a celý proces se opakuje (www.seqll.com; převzato a upraveno).

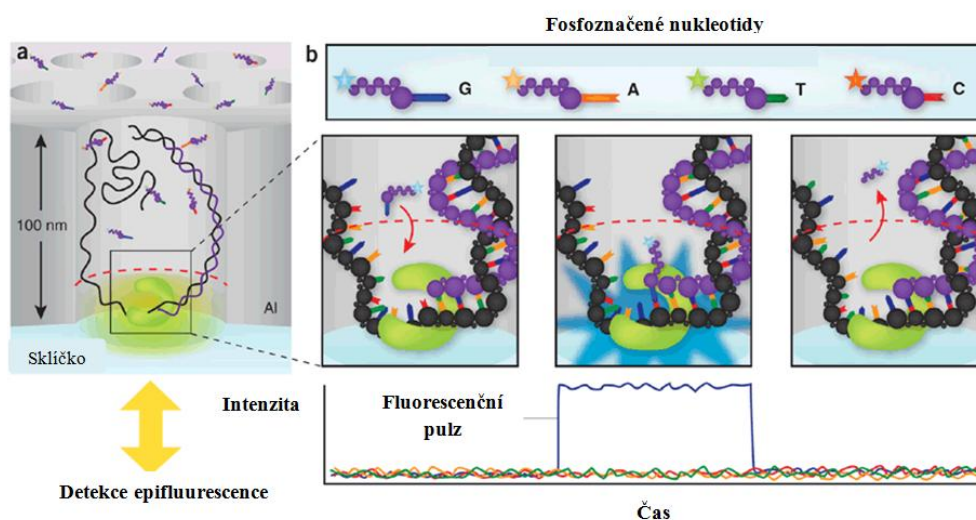
2.3.4.5.2. Pacific Biosciences SMRT™

Firma Pacific Biosciences vyvinula v roce 2009 technologii sekvenování jednotlivých molekul DNA v reálném čase (SMRT, z anglického „Single Molecule Real-Time sequencing“) (Eid et al., 2009). První komerční platforma byla uvedena na trh v roce 2010 a v dubnu roku 2013 představila společnost nový produkt PacBio RS II. V září 2013 uzavřela firma partnerství s Roche Diagnostics za účelem vývoje diagnostických *in vitro* produktů (www.pacificbiosciences.com).

Technologie je založena na tzv. „zero mode waveguides“ (ZMWs). Jedná se o fotonickou strukturu složenou z kruhového otvoru a hliníkové fólie na čířém křemenném podkladu. Otvor má průměr 70 nm a hloubku 100 nm (Metzker, 2010). Velmi nízký objem (20×10^{-21} l) umožňuje detekci fluorescence inkorporovaného nukleotidu do řetězce rostoucího vlákna DNA v reálném čase. ZMWs také tlumí

fluorescenční pozadí, díky čemuž lze přidávat vysoké koncentrace značených dNTPs potřebných k rychlému průběhu sekvenování (Voelkerding et al., 2009).

Na dně ZMWs je imobilizována jedna DNA-polymerázy, ke které je přidán fragment DNA a specificky značené dNTPs. Pokud dojde k začlenění fosfoznačeného nukleotidu, odštěpí se fluorofor od fosfátu nukleotidu. Signál je detekován a barvivo pak difunduje z detekčního objemu. Poté může být připojen další nukleotid. Tento postup umožňuje čtení až 10 bází za sekundu a také pozorovat sekvenci až v několika tisících ZMWs najednou (Korlach et al., 2010).



Obř. ř. 9: a: ZMW s imobilizovanou DNA-polymerázou, fragmentem DNA a fosfoznačenými nukleotidy; b: Průběh sekvenační reakce (Metzker, 2009; převzato a upraveno).

2.3.5. Transkriptomové sekvenování

Technologie MPS poskytly širší škálu možností ve vyšetření buněčných transkriptomů a zlepšily jejich pokrytí. MPS umožňují přímo určit identitu a množství transkriptů. Ostatní metody jako Northern blot nebo microarraye odvozují množství nepřímo z intenzity hybridizace. Sekvenování transkriptomů může být použito k detekci všech typů genomových přestaveb a odlišností v subpopulacích buněk. Tento bod je zvláště důležitý u nádorové heterogenity, kde buňky nádoru mohou být geneticky neidentické. Vyzolovaná mRNA je reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Ta je následně rozštěpena a dále sekvenována dle zvolené metody. Sekvenační technologie měly velký vliv na výzkum malých nekódujících RNA (ncRNAs). Pomocí MPS byly objeveny nové miRNA a siRNA a detekovány varianty už známých miRNA (Morozova et al., 2009).

2.4. Využití sekvenování v genové analýze ALL

Podle běžně klinicky používaných prognostických faktorů nelze přesně predikovat vývoj onemocnění a jeho odpověď na léčbu. Genová analýza umožňuje určení přesnější diagnózy, prognózy, včasné odhalení progresu onemocnění a návrhy nových terapeutických strategií (Iacobucci et al., 2010).

Pre-B ALL představuje až 80 % případů dětské ALL. Cytogenetické analýzy odhalily primární chromozomové abnormality v 75 % případů pre-B ALL. Busche et al. studovali 46 párů vzorků pre-B ALL dětí v čase diagnózy a po remisi onemocnění. U všech byl hodnocen jejich metylační status. Profily DNA metylace umožňuje rozdělit pre-B ALL na hlavní podtypy a mapovat epigenetické biomarkery specifické pro t(12;21). U vzorků nesoucí fúzi ETV6-RUNX1, oba geny patří mezi regulátory krvetvorby, identifikovali 119 subtypů specifických markerů CpG lokusů. Také zjistili vliv metylace na proces leukemogeneze. Detekovali gen SPSB1, který byl u vzorků nesoucí t(12;21) hypermetylovaný a downregulovaný. Tento gen se stal novým biomarkerem translokace (12;21) (Busche et al., 2013).

Ve studii Robert et al. provedli sekvenování 15 případů ALL s Philadelphským chromozomem. Identifikovali dva případy s přestavbou NUP214-ABL1, jeden případ s inzercí genu receptoru erythropoetinu (EPOR) do imunoglobulinového těžkého řetězce (IGH@-EPOR) a vždy jeden případ s fúzemi EBF1-PDGFRB, BCR-JAK2, STRN3-JAK2, PAX5-JAK2, ETV6-ABL1, RANBP2-ABL1 a RCSD1-ABL1. Dále detekovali inverzi PAX5 a přilehlého genu ZCCHC7, což vede k vzájemné fúzi, která narušuje otevřený čtecí rámec PAX5. Gen PAX5 je důležitý pro diferenciaci B-buněk. Delece, translokace a sekvenční mutace PAX5 se nachází přibližně u 30 % pacientů (Roberts et al., 2012).

U podtypu ALL nazvaném BCR-ABL1 se často vyskytuje poškození aktivace tyrozin kinázy a přestavby IKZF1. Ztráta funkce IKZF1 se spojuje s agresivním typem B-ALL a se špatnou prognózou pokud jde o celkové přežití a četnost recidivy. Přibližně polovina pacientů s tímto podtypem má genomové léze, což vede k nadměrné expresi CRLF2. Zvýšená exprese CRLF2 vede ke zvýšenému přežití a množení B-lymfoidních buněk. Polovina těchto případů nese somatické mutace v Janus kinázách JAK1 a JAK2. Většina JAK mutací ALL se nachází v JAK2 pseudokinázové doméně (nejčastěji v blízkosti p.Arg683). Studie Loh et al. se zaměřila na sekvenaci tyrozin kináz u 45 pediatrických případů ALL s podtypem BCR-ABL1. Kromě JAK mutací a 1 FLT3 mutace nebyly ve studii nalezeny somatické mutace jiných tyrozin kináz. Toto zjištění

naznačuje, že dané alternativní mechanismy jsou zodpovědné za aktivaci kinázové signalizace u vysoce rizikových případů ALL (Loh et al., 2013).

Mezi nejčastější mutované dráhy B-ALL patří NT5C2, CREBBP, WHSC1, TP53, USH2A, NRAS a v případě relapsu mezi tyto dráhy lze přiřadit IKZF1 mutace. Ve studii Ma et al. sledovali vývoj 20 dětských případů B-ALL od stanovení diagnózy až po relaps. Polovina vzorků v čase stanovení diagnózy měla více mutací v genových drahách. Specifická mutace relapsu v NT5C2 byla zjištěna v devíti případech. Celkem 75 % relabujících nádorů má původ v menších subklonech vyskytujících se již při diagnóze. Tato práce zdůrazňuje, že převládající klony přítomné při diagnóze nejsou ve většině případů odstraněny chemoterapií (Ma et al., 2015).

2.5. Technologie DNA čipů

Technologie DNA čipů byla uvedena na trh v polovině 90. let 20. století (Zhu et al., 2011). Microarrays umožňují v rámci jednoho experimentu a v poměrně krátkém čase analyzovat tisíce genů. Díky tomu našly využití v molekulárním profilování, identifikaci nových léčebných postupů, objevu biomarkerů nebo v hledání genů a určování jejich funkce. Výsledné vzory genové exprese umožňují rozdělení pacientů podle molekulárních vlastností jejich nádorů (Jayapal et Melendez, 2006).

Čip představuje pevný nosič (sklíčko, plast, nylon), na kterém jsou přichyceny stovky až tisíce cDNA nebo oligonukleotidových sond. Vzorek zkoumaných nukleových kyselin s danými sondami hybridizuje. Na čipu lze najít více míst se stejnou sekvencí. Soubor identických sond je označován jako tzv. spot. Nejprve je cílová DNA nebo RNA izolována a amplifikována. Aby mohlo dojít k posthybridizační detekci, musí být vzorky označeny fluorescenčními nebo chemiluminiscenčními značkami (Cretic et al., 2012). Nukleové kyseliny po aplikaci na čip kvantitativně hybridizují s próbami komplementární sekvence. Následně je změřena intenzita signálů, která znázorňuje míru hybridizace a nepřímo určuje množství sekvencí daného vzorku (Tjong et al., 2013).

3. Cíl práce

1. Provést rešerši na dané téma, zorientovat se v problematice transkriptomového sekvenování, získání teoretické a praktické znalosti NGS, naučit se pracovat s příčnými databázemi a softwarem.
2. Zoptimalizovat metodiky izolace RNA z archivovaného materiálu, práce s platformou Illumina.
3. Stanovit transkriptomové profily u pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií.

4. Materiál a metodika

4.1. Izolace RNA a DNA

Metoda profilování genové exprese pomocí mikročipů vyžaduje práci s izolovanou RNA o vysoké čistotě a kvalitě. Zatímco pro účely sekvenování může být použita i RNA s nižší kvalitou.

Pro izolaci celkové RNA z buněčného lyzátu byla použita fenol-chloroformová metoda, komerční chemikálie TRI reagent (MCR), což je směs fenolu a guanidinu thiokyanátu. Ke směsi vzorku a TRI reagentu se přidá chloroform. Následnou centrifugací se směs rozdělí do tří fází. Horní vodná fáze obsahuje RNA, interfáze obsahuje DNA a ve spodní organické fázi jsou obsaženy proteiny. Rozpuštěná RNA ve vodné fázi se precipituje izopropanolem a rozpustí se ve vodě. Tento postup je vhodný pro izolaci všech typů RNA o délce 0,1-1,5 kb. DNA je z interfáze vysrážena působením etanolu, separována centrifugací a případně rozpuštěna. Pro zvýšení efektivity srážení se přidává citrát sodný.

Vzorky s nižším počtem buněk byly izolovány miRNease Mini Kitem (QIAGEN). Pomocí tohoto kitu lze získat frakce miRNA a celkové RNA (>200 nt) o vysoké čistotě.

4.1.1. Materiál a reagentie

TRI reagent (Molecular Research Center), RiboPure Kit (Ambion) popřípadě miRNease Kit (QIAGEN), isopropanol (Sigma), chloroform a ethanol (Serva), DEPC (diethylpyrocarbonate) Treated Water (Ambion), citrát sodný (Sigma), zkumavky typu Eppendorf 1,5 ml, 2 ml, LoBind zkumavky (Eppendorf), epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf), Random primers, RNAsin ribonuclease inhibitor, Deoxyribonucleotide triphosphates (vše Promega) (pozn.: připraveno jako 10 mM dNTPs ze 100 mM dCTP, dGTP, dTTP, dATP; příprava: 4 x 0,1 ml jednotlivých zásobních nukleotidů doplněno DEPC vodou do 1 ml), RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), 0,2 ml Thermo-Tube (ABgene)

4.1.2. Přístroje a zařízení

laminární box (BioAir), kombinovaná chladnička (Gorenje), vortex (Scientific Industries, Genie), minicentrifuga (Eppendorf), termocykler TProfessional Basic (Biometra), chlazená centrifuga (Hermle), termoblok (Major Science), vakuový

koncentrátor SpeedVac Eppendorf 5031 (Eppendorf), 1ml, 200 μ l, 10 μ l automatické pipety (Eppendorf)

4.1.3. Příprava roztoků

75% ethanol (31 ml 96% ethanolu + 9 ml DEPC vody)

4.1.4. Postup

A. Fenol-chloroformová metoda

Separace fází

1. Vzorky TRI lyzátů (připraveny izolací leukocytů osmotickou lýzou) v 1,7ml zkumavkách byly rozmrazeny na ledu cca 15 minut. Zkumavky se vzorky byly ponechány 5 minut při laboratorní teplotě, aby proběhla disociace nukleoproteinu. Poté bylo do zkumavky přidáno 200 μ l chloroformu. Vzorky byly následně silně zvortexovány cca 30 sekund a nechány 10 minut při pokojové teplotě.
2. Vzorky byly zcentrifugovány 15 minut při otáčkách 12 000 g a při teplotě 4 °C.
3. Po centrifugaci byly vzorky rozděleny do tří fází. Vrchní vrstva obsahující RNA byla přenesena do čisté 1,7ml zkumavky tak, aby nebyl porušen mléčný prstenec, který obsahuje DNA. V případě izolace DNA byl prstenec DNA odpipetován do čisté 1,5ml zkumavky.

Izolace RNA

Precipitace RNA

4. Ke vzorku bylo přidáno stejné množství isopropanolu, jaké bylo odebráno v předešlém kroku, tedy 400-500 μ l. Vzorky byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě.
5. Zkumavky se vzorky byly centrifugovány 10 minut při otáčkách 12 000 g při teplotě 4 °C. Na dně zkumavky se objevila bílá popřípadě průhledná peletka RNA.

Promývání RNA

6. Supernatant byl odstraněn a k RNA peletce bylo přidáno 1,5 ml 75% ethanolu. Převrácením zkumavky byla peletka jemně odlepena.
7. Opět byla provedena centrifugace 5 minut při otáčkách 12 000 g a teplotě 4 °C.

Rozpuštění RNA

8. Supernatant byl odstraněn a peletka RNA byla vysušena na vzduchu ve flow-boxu dokud nedošlu k jejímu zprůhlednění (3-10 minut).
9. K RNA peletě bylo přidáno 25 μ l DEPC treated vody.
10. Koncentrace a čistota RNA byla změřena na přístroji Nanodrop ND 1000.
11. RNA byla uchována při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Izolace DNA

4. K odebrané DNA bylo přidáno 300 μ l (na 1 ml původního roztoku trizolu) absolutního etanolu.
5. Směs byla jemně zvortexována a poté inkubována 2 až 3 minuty při pokojové teplotě.
6. Následně proběhla centrifugace při 2000 g po dobu 5 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pak byl odstraněn supernatant.
7. Do zkumavky byl přidán 1 ml 0,1M citrátu sodného v 10 % etanolu. Směs byla jemně vortexována a inkubována při pokojové teplotě v termomixéru po dobu 30 minut při 300-400 rpm.
8. Vzorek byl centrifugován při 2000 g po dobu 5 minut, pak byl odstraněn supernatant a znova byl proveden krok č. 7.
9. Vzorek byl centrifugován při 2000 g po dobu 5 minut, pak byl odstraněn supernatant a peletka byla resuspendována v 1 ml 75 % etanolu.
10. Směs byla inkubována 20 minut v termomixéru při pokojové teplotě a 300-400 rpm.
11. Opět proběhla centrifugace při 2000 g po dobu 5 minut, pak byl odstraněn supernatant a peletka byla vysušena při pokojové teplotě.
12. DNA byla rozpuštěna ve 100 - 300 μ l vody (DEPCw) a vortexována.

V případě špatného rozpuštění DNA, byla směs zahřívána na $50\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud se v roztoku stále nacházela bílá sraženina a roztok byl značně viskózní, byla provedena centrifugace při 12000 g po dobu 10 minut a při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byl supernatant přepipetován do čisté zkumavky a mohl být dále ředěn.

B. Izolace celkové RNA pomocí miRneasy Mini Kit (QIAGEN)

1. Vzorky byly ponořeny v 1 ml TriReagentu (sterilní RNase-free 1,5ml ependorfka). Po rozmražení byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Poté byly zvortexovány na maximální výkon po dobu 30 sekund a opět inkubovány 5 minut při pokojové teplotě.
2. Ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l chloroformu a následně byly 15 sekund vortexovány při maximálním výkonu. Následně byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě.
3. Vzorky byly centrifugovány při 12 000 g 15 minut při 4 °C. Dále byla odebrána svrchní vodná fáze do 2ml „collection tube“ v množství okolo 400 - 800 μ l. Následně bylo přidáno 1,5 objemu absolutního EtOH a směs byla několikrát propipetována.
4. 700 μ l směsi bylo přeneseno na kolonku se zkumavkou. Byla provedena centrifugace při 8 100 g po dobu 15 sekund. Poté byl odstraněn filtrát a zbytek směsi prošel stejným procesem na stejné kolonce.
5. Na kolonku bylo přidáno 700 μ l pufru RWT a opět proběhla centrifugace při 8 100 g 15 sekund. Filtrát byl odstraněn.
6. Na kolonku bylo přidáno 500 μ l pufru RPE a proběhla centrifugace při 8 100 g po dobu 15 sekund. Filtrát byl odstraněn. Dále bylo přidáno dalších 500 μ l pufru RPE a kolonka byla centrifugována při 8 100 g 2 minuty. Filtrát byl opět vylit.
7. Kolonka byla přenesena na novou 2ml „collection tube“ a byla centrifugována na maximální rychlost po dobu 1 minuty.
8. Kolonka byla přenesena na novou 1,5ml „collection tube“ a bylo na ni přidáno 30 μ l RNase-free vody. Proběhla centrifugace při 8 100 g 1 minutu. Kolonka byla vyhozena a filtrát s RNA uschován v dané zkumavce.

4.2. Měření koncentrace a čistoty RNA spektrofotometricky

Po izolaci RNA byla měřena koncentrace spektrofotometricky přístrojem NanoDrop ND 1000 UV-VIS Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Z každého vzorku total RNA byl použit 1 μ l. Jako standard byla použita DEPC treated voda. Koncentrace RNA byla měřena při vlnové délce 260 nm a byla uvedena v jednotkách ng/ μ l. Pro ověření čistoty byla přístrojem změřena také vlnová délka při 230 a 280 nm. Čistota RNA byla hodnocena dle poměrů absorbcí $A(260)/A(230)$ a $A(260)/A(280)$. Pokud byl poměr $A(260)/A(280)$ nižší než hodnota 2, jedná se o znečištěnou RNA

proteiny. Pro běžné použití stačí, když se čistota vzorku vyjádřená poměrem A260/A280 pohybuje v rozmezí 1,8 až 2,0. Vysoká absorbance v oblasti 230 nm nebo nízká hodnota poměru absorbancí A(260)/A(230) napovídá o znečištění nízkomolekulárními látkami (fenol, EDTA, chaotropní soli).

4.3. Kontroly kvality RNA prostřednictvím Agilent 2100 Bioanalyzer

RNA Nano LabChip firmy Agilent slouží k ověření kvality RNA. Malé množství RNA bylo v kanálcích čipu rozděleno podle její molekulové hmotnosti a následně byla použitím laseru detekována její fluorescence. Výsledek separace byl vizualizovaný elektroforetogramem. Tzv. RNA integrity number (RIN) algoritmem byla vzorkům přiřazena hodnota integrity RNA v rozsahu 1-10. Příslušná hodnota vyjadřuje kvalitu RNA, kdy hodnota 1 poukazuje na to, že RNA byla degradována, a hodnota 10 svědčí o nedegradované RNA vysoké kvality. Kontrola kvality RNA byla provedena na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) s využitím kitu Agilent RNA 600 Nano Kit.

4.3.1. Materiál a reagentie

RNA 6000 Nano Kit (Agilent): RNaseZAP, RNase free voda, Ladder, čip RNA 6000 Nano chip, 600 Nano gel matrix, RNase-free 0,5ml mikrozkušavek, RNA 6000 Nano dye concentrate, Agilent RNA 6000 Nano Marker, RNase-free zkušavky

4.3.2. Přístroje a zařízení

Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.), vortex (Scientific Industries, Genie), minicentrifuga (Eppendorf), přípravná stanice (Agilent Technologies, Inc.), 1ml, 200µl, 10µl automatické pipety (Eppendorf)

4.3.3. Postup

Dekontaminace elektrod

Tento krok byl prováděn před každým použitím čipu.

1. Byly připraveny dva čističe elektrod, z nichž jeden byl naplněn 350 µl RNaseZAP a druhý 350 µl RNase free vodou.
2. Do přístroje byl vložen čistič elektrod s RNaseZAP. Poklop byl zavřen po dobu minimálně 10 sekund. Po vyjmutí prvního čističe elektrod byl postup opakován s druhým čističem naplněným RNase free vodou.

Příprava ladderu

Ladder byl zahřát na 70 °C po dobu 2 minut. Pak byl okamžitě zchlazen a rozdělen po menších množstvích do RNase-free zkumavek.

Příprava vzorků

1. Pro ověření kvality byla použita RNA o koncentraci 25-500 ng/μl. V případě vyšší koncentrace byla RNA zředěná RNase-free vodou.
2. Před aplikací vzorku na čip RNA 6000 byly vzorky zahřáty na teplotu 70 °C po dobu 2 minut.

Příprava gelu

1. Na filtr s kolonkou bylo napipetováno 550 μl RNA 600 Nano gel matrix.
2. Zkumavka byla centrifugována při otáčkách 1500 g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.
3. Přefiltrovaný gel byl rozdělen po 65 μl do RNase-free 0,5ml mikrozkušavek.

Příprava směsi gel-barva

1. Barva RNA 6000 Nano dye concentrate byla ponechána půl hodiny při laboratorní teplotě. Následně byla vortexována 10 sekund při laboratorní teplotě. Do 65 μl předem přichystaného gelu byl přidán 1 μl barvy.
2. Roztok byl vortexován a pak centrifugován při otáčkách 13 000 g po dobu 10 minut za laboratorní teploty.

Nanášení směsi gel-barva

1. Nový čip RNA 6000 Nano chip byl vložen do přípravné stanice.
2. Do jamky označené symbolem G v černém kruhu bylo napipetováno 9 μl gel-dye mix.
3. Píst byl nastaven na polohu 1 ml, přípravná stanice byla uzavřena tlakem na píst, až byl přichycen úchytkou. Po 30 sekundách byla úchytku uvolněna.
4. Po 5 sekundách byl píst pomalu vytáhnout do pozice 1 ml.
5. Přípravná stanice byla otevřena. Do jamek označených symbolem G bylo napipetováno 9 μl směsi gel-barva.

Plnění Agilent RNA 6000 Nano Marker

1. Agilent RNA 6000 Nano Marker byl pipetován po 5 μ l do 12 jamek, které byly určeny pro vzorky, a do jamky označené symbolem „žebřík“.

Plnění vzorků a ladderu

1. Do jamky označené symbolem „žebřík“ byl napipetován 1 μ l předem připraveného ladderu.
2. Do každé z 12 jamek určených pro vzorky byl napipetován 1 μ l RNA. Do každé jamky určené pro RNA, která nebyla využita, byl napipetován 1 μ l RNA 6000 Nano Marker.
3. Čip byl horizontálně položen na nádstavec vortexu a byl vortexován 1 minutu při otáčkách 2 400 g.
4. Čip byl do 5 minut vložen do přístroje Agilent 2100 bioanalyzer a byla spuštěna analýza.

4.4. Expresní čipy GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix)

Vyizolovaná RNA s ověřenou kvalitou byla použita pro syntézu prvního vlákna cDNA s použitím T7 promotoru. Následně proběhla syntéza druhého vlákna cDNA. Během této reakce bylo prostřednictvím RNasy H degradováno původní vlákno RNA. Po přidání T7 RNA polymerázy proběhla podle druhého vlákna cDNA *in vitro* transkripce (IVT) „antisence“ cRNA. Následně bylo provedeno přečištění cRNA a spektrofotometrické ověření výtěžnosti a distribuce. V dalším kroku proběhla syntéza cDNA s použitím „random“ primerů a směsi dNTP s dUTP. Do vlákna cDNA tak byla vnesena báze uracilu, která se v DNA běžně nevyskytuje. Pro degradaci cRNA byla opět použita RNasa H. Vzniklá cDNA byla přečištěna a její výtěžnost a distribuce byla opět ověřena spektrofotometricky. Po přidání enzymu UDG (uracil DNA glykosylasa) byl z jednovláknové molekuly DNA odstraněn uracil. Enzymem APE 1 byly štěpeny fosfodiesterové vazby v místech, kde se nacházel uracil. Vzniklé fragmenty DNA na svých 3' koncích nesly hydroxylovou skupinu, která byla značena biotinem (biotin allonamid trifosfát). Fragmenty poté byly aplikovány na čip, kde hybridizovaly se svými próbami. Po hybridizaci byl čip promyt a nahybridizované fragmenty nesoucí biotin byly značeny fluorescenčními molekulami vázajícími se na biotin. Následně proběhlo skenování fluorescenčních signálů a nakonec analýza obrazu (www.affymetrix.com).

Analýza profilů genové exprese byla provedena podle tří denního protokolu doporučeného výrobcem následujícím postupem.

4.4.1. Příprava Poly-A RNA kontrol

Použití kitu Affymetrix GeneChip Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, CA, USA)

1. Poly-A RNA kontrola byla naředěna v poměru 1:20, kdy 2 μ l Poly-A RNA Control Stock byly přidány do 38 μ l Poly-A control Dil Buffer. Roztok byl promíchán a krátce centrifugován.
2. Bylo provedeno druhé ředění v poměru 1:50, kdy 2 μ l roztoku, který vznikl v prvním kroku, byly přidány do 98 μ l Poly-A Dil Buffer. Roztok byl promíchán a krátce centrifugován.
3. Pro třetí ředění v poměru 1:25 byly 2 μ l druhého ředění přidány do 48 μ l Poly-A Control Dil Buffer. Roztok byl promíchán a krátce centrifugován.
4. Ke 2 μ l roztoku ze třetího ředění Poly-A RNA kontrol bylo přidáno 18 μ l Poly-A Control Dil Buffer (1:10). Roztok byl promíchán a krátce centrifugován.
5. Ke 2 μ l čtvrtého ředění bylo přidáno 100 ng total RNA.

4.4.2. Syntéza prvního vlákna cDNA

Použití kitu The Ambion WT expression Kit (Ambion, TX, USA)

1. Při laboratorní teplotě byl připraven First-Strand Master Mix o objemu 5 μ l smícháním 4 μ l First-Strand Buffer Mix a 1 μ l First-Strand Enzyme Mix. Roztok byl krátce zvortexován a centrifugován.
2. Do každé zkušavky s 5 μ l First-Strand Master Mix bylo přidáno 5 μ l směsi RNA a Poly-A RNA kontrol. Roztok byl krátce zvortexován a centrifugován.
3. Následně byla směs inkubována v termocykléru 1 hodinu při teplotě 25 °C, 1 hodinu při 42 °C a 2 minuty při 4 °C. Po inkubaci byly okamžitě provedeny kroky syntézy druhého vlákna cDNA.

4.4.3. Syntéza druhého vlákna cDNA

Použití kitu Tre Ambion WT expression Kit (Ambion, TX, USA)

1. Na ledě byl připraven Second-Strand Master Mix smícháním:
 - 32,5 μ l Nuclease-free vody
 - 12,5 μ Second-Strand Buffer Mix
 - 5 μ l Second-Strand Enzyme Mix.

Roztok byl krátce zvortexován a centrifugován.

2. Do 10 μl cDNA z předchozího kroku bylo přidáno 50 μl připraveného Second-Strand Master Mix. Roztok byl krátce zvortexován a centrifugován.
3. Roztok byl inkubován v termocykléru 1 hodinu při 16 °C, 10 minut při 65 °C a 2 minuty při 4 °C. Po inkubaci byly okamžitě provedeny další kroky.

4.4.4. Syntéza cRNA *In Vitro* Transkripcí (IVT)

Použití kitu The Ambion WT expression Kit (Ambion, TX, USA)

1. Při laboratorní teplotě byl připraven IVT Master Mix smícháním:

- 24 μl IVT Buffer Mix
- 6 μl IVT Enzyme Mix.

Roztok byl krátce zvortexován a centrifugován.

2. Do 60 μl vzorku druhého vlákna cDNA připraveného v předešlém kroku bylo přidáno 30 μl připraveného IVT Master Mix.
3. Roztok byl inkubován v termocykléru 16 hodin při teplotě 40 °C a následně přes noc při 4 °C.

4.4.5. Purifikace cRNA

Použití kitu The Ambion WT expression Kit (Ambion, TX, USA)

1. cRNA Binding Mix byl připraven smícháním:

- 10 μl Nucleic Acid Binding Beads
- 50 μl Nucleic Acid Binding Buffer Concentrate.

Roztok 60 μl cRNA Binding Mix byl přidán do každého vzorku cRNA a celá směs byla přenesena na destičku s jamkami ve tvaru U.

2. Ke každému vzorku bylo přidáno 60 μl isopropanolu. Destička byla překryta ochrannou fólií a mírně třepána 2 minuty.
3. Destička byla přesunuta na magnetickou podložku, aby došlo k zachycení nukleových kyselin navázaných na magnetických kuličkách. Následně byla odstraněna fólie a byl odstraněn supernatant nad kuličkami.
4. Do jamek bylo přidáno 100 μl Nucleic Acid Wash Solution, opět byla destička překryta ochrannou fólií a byla třepána při střední rychlosti (5 000 g) po dobu 1 minuty. Destička pak byla položena na magnetickou podložku a byl odstraněn

supernatant nad kuličkami. Do jamek bylo opět přidáno 100 μ l Nucleic Acid Wash Solution a celý postup byl znova opakován.

5. Destička byla položena na třepáčku a při vysoké rychlosti (12 000 g) byla třepána 1 minutu bez ochranné fólie.
6. Přečištěná cRNA byla eluována s 40 μ l Elution Solution zahřátého na teplotu 55 °C. Po 2 minutách po přidání Elution Solution byla destička přelepena ochrannou fólií a byla třepána při vysoké rychlosti po dobu 3 minut, dokud úplně nezmizel prstenec vytvořený kuličkami.
7. Po umístění na magnetickou podložku byl supernatant obsahující cRNA přenesen na novou nukleasa-free destičku.

Následně byla kvalita a čistota získané cRNA ověřena spektrofotometricky přístrojem Nanodrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer. Podle výsledku měření byla cRNA zředěna na koncentraci 455 ng/ μ l, což odpovídalo 10 ng cRNA v objemu 22 μ l.

4.4.6. Syntéza druhého vlákna cDNA

Použití kitu The Ambion WT expression Kit (Ambion, TX, USA)

1. K 22 μ l cRNA byly přidány 2 μ l Random primerů. Roztok byl krátce zvortexován a centrifugován.
2. Při laboratorní teplotě byl připraven 2nd-Cycle Master mix smícháním:
 - 8 μ l 2nd-Cycle Buffer Mix
 - 8 μ l 2nd-Cycle Enzyme Mix.

Po krátkém zvortexování a centrifugování bylo 16 μ l 2nd-Cycle Master Mix přidáno ke směsi 24 μ l cRNA a Random primerů.

Roztok byl inkubován 10 minut při teplotě 25 °C, 90 minut při 42 °C, 10 minut při 70 °C a 2 minuty při 4 °C. Po inkubaci byl roztok krátce zvortexován a centrifugován.

4.4.7. Hydrolýza RNA s použitím RNasy H

Použití kitu The Ambion WT expression Kit (Ambion, TX, USA)

1. K syntetizovanému druhému vláknu cDNA byly přidány 2 μ l RNasy H, roztok byl jemně zvortexován, krátce centrifugován a následně inkubován 45 minut při 37 °C, 5 minut při 95 °C a 2 minuty při 4 °C. Po inkubaci byl roztok krátce vortexován a centrifugován.

4.4.8. Purifikace druhého vlákna cDNA

Použití kitu The Ambion WT expression Kit (Ambion, TX, USA)

1. cDNA Binding Mix byl připraven smícháním:
 - 10 μ l Nucleic Acid Binding Beads
 - 50 μ l Nucleic Acid Binding Buffer Concentrate.Roztok 60 μ l cDNA byl společně s 18 μ l nuklease-free vodou přidán ke každému vzorku. Jednotlivé směsi byly přeneseny na destičku s jamkami ve tvaru U.
2. Ke směsi bylo přidáno 120 μ l 100% ethanolu, destička byla přelepena ochrannou fólií a byla jemně třepána po dobu 2 minut.
3. Při odstraňování supernatantu bylo postupováno stejně jako v případě purifikace cRNA.
4. Pak byla cDNA dvakrát promyta 100 μ l Nucleic Acid Wash Solution stejně jako u kroku purifikace cRNA.
5. Přečištěná cDNA byla eluována 30 μ l Elution Solution zahřátého na teplotu 55 °C a následoval stejný postup jako v kroku purifikaci cRNA.

Čistota a množství purifikované cDNA byly ověřeny spektrofotometricky přístrojem Nanodrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer.

4.4.9. Fragmentace jednovláknové DNA

Použití GeneChip WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix, CA, USA)

Jednovláknová DNA získána v předešlém kroku byla naředěna RNase-free vodou, aby v objemu 31,2 μ l bylo 5,5 μ g této DNA.

1. Fragmentační Master Mix byl připraven smícháním:
 - 10 μ l RNase-free vody
 - 4,8 μ l 10x cDNA Fragmentation Buffer
 - 1 μ l UDG 10 U/ μ l
 - 1 μ l APE 1, 1 000 U/ μ l

Fragmentační Master Mix byl přidán ke vzorku ssDNA, následně byl krátce vortexován a centrifugován a inkubován 60 minut při teplotě 37 °C a 2 minuty při teplotě 4 °C. Po inkubaci byl roztok promíchán, centrifugován. Pokud se dále s fragmentovanou ssDNA nepokračuje, může být skladována při teplotě – 20 °C.

4.4.10. Značení fragmentované jednovláknové DNA

Použití GeneChip WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix, CA, USA)

1. K 45 μ l fragmentované ssDNA získané v předešlém kroku bylo přidáno:
 - 12 μ l 5x TdT Buffer
 - 2 μ l TdT
 - 1 μ l DNA Labeling Reagent, 5 nM.

Po přidání byl roztok krátce zvortexován a centrifugován.

2. Roztok byl inkubován 60 minut při teplotě 37 °C, 10 minut při 70 °C a 2 minuty při 4 °C.

4.4.11. Hybridizace

Použití GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix, CA, USA)

1. Tři bloky byly zahřáty, jeden na 65 °C, druhý na 99 °C a třetí na 45 °C.
2. Roztok 20x Eukaryotic Hybridization Controls byl před přidáním do hybridizační směsi 5 minut inkubován při teplotě 65 °C.
3. Hybridizační koktejl pro formát 169 byl připraven smícháním:
 - 27 μ l fragmentované značené DNA
 - 1,7 μ l Control Oligonucleotide B2
 - 5 μ l 20x Eukaryotic Hybridization Controls
 - 50 μ l 2x Hybridization Mix
 - 7 μ l DMSO
 - doplnění na objem 100 μ l Nuclease-free vodou.

Hybridizační směs byla po krátkém zvortexování a centrifugování inkubována po dobu 5 minut při teplotě 99 °C, pak byla ochlazená na teplotu 45 °C a inkubována 5 minut. Nakonec byla centrifugována při maximálních otáčkách 1 minutu.

4. Mikročipy byly před použitím stabilizovány při laboratorní teplotě. Do horního otvoru byla vsunutá čistá špička pipety a do dolního otvoru bylo napipetováno 80 μ l vzorku.

Čipy byly vloženy do GeneChip Hybridization Oven 640 firmy Affymetrix, kde následujících 16 hodin probíhala hybridizace při 45 °C a při otáčkách 16 rpm.

Promývání a barvení vzorků proběhlo na přístroji GeneChip Fluidic Station 450 firmy Affymetrix. Následné skenování bylo provedeno prostřednictvím přístroje GeneChip Scanner 3000 7G formy Affymetrix. Výsledkem skenování byl obraz hybridizační plochy čipu, na které jednotlivé spoty odpovídaly daným proubám a jejich zbarvení míře hybridizace.

5. Výsledky

5.1. Izolace RNA a DNA

Izolace RNA a DNA byla provedena z buněčných lyzátů získaných z periferní krve. Jednalo se o vzácné vzorky TRI lyzátů různé buněčnosti. Byla snaha získat ze vzorků maximum včetně RNA a DNA. Pro izolaci byla použita fenol-chloroformová metoda (postup viz kapitola 4.1.4. A) a v případě izolace RNA také miRNease Mini Kit (QIAGEN) (postup viz kapitola 4.1.4. B). Čistota vyizolovaných nukleových kyselin byla stanovena na základě absorbancí A260/A280.

Tabulka č.1: Koncentrace a čistoty RNA jednotlivých vzorků po izolaci fenol-chloroformovou metodou, změřeno na přístroji NanoDrop ND 1000 UV-VIS Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA)

Vzorek	Koncentrace vzorku [µg/ml]	260/280
1	502,25	1,87
2	141,81	1,82
3	179,86	1,77
4	438,25	1,86
5	96,61	1,49
6	1474,61	1,93
7	154,86	1,81
8	201,96	1,82
9	148,00	1,74
10	78,47	1,62
11	213,86	1,78
12	443,88	1,67
13	105,87	1,53
14	175,03	1,74
15	138,84	1,70
16	112,10	1,71
17	44,72	1,52
18	978,47	1,96
19	285,41	1,77
20	188,58	1,79
21	343,26	1,85
22	201,64	1,86

23	84,04	1,75
24	80,92	1,58
25	97,89	1,56
26	51,09	1,79
27	78,39	1,54
28	878,43	1,90
29	62,55	1,61
30	732,80	1,80
31	88,21	1,58
32	283,82	1,79
33	146,93	1,60
34	67,15	1,81
35	318,04	1,85
36	19,26	1,72

Průměrná koncentrace: $\bar{c} = \Sigma(c1-c36)/36 = 267,72 \mu\text{g/ml}$

Průměrná čistota: $\overline{A260/A280} = \Sigma[(A260/A280)1 - (A260/A280)36]/36 = 1,74$

Tabulka č.2: Koncentrace a čistoty DNA jednotlivých vzorků po izolaci fenol-chloroformovou metodou, změřeno na přístroji NanoDrop ND 1000 UV-VIS Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA)

Vzorek	Koncentrace vzorku [$\mu\text{g/ml}$]	260/280
17	99,82	1,47
18	1927,95	1,86
19	303,99	1,74
20	216,83	1,76
21	141,10	1,66
22	284,79	1,67
35a	44,77	1,82
35b	3,96	2,21
36a	4,96	1,49
36b	196,91	1,37

Čísla vzorků odpovídají stejně označeným vzorkům v případě izolace RNA fenol-chloroformovou metodou. Symbol a označuje měření ihned po izolaci a symbol b označuje měření po zahřívání, vortexování a stáčení DNA.

Průměrná koncentrace: $\bar{c} = \Sigma(c17-c36b)/10 = 322,51 \mu\text{g/ml}$

Průměrná čistota: $\overline{A260/A280} = \Sigma[(A260/A280)17 - (A260/A280)36b]/10 = 1,71$

Tabulka č.3: Koncentrace a čistoty RNA po izolaci miRNease Mini Kit (QIAGEN) u vzorků s nižším počtem buněk, změřeno na přístroji NanoDrop ND 1000 UV-VIS Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA)

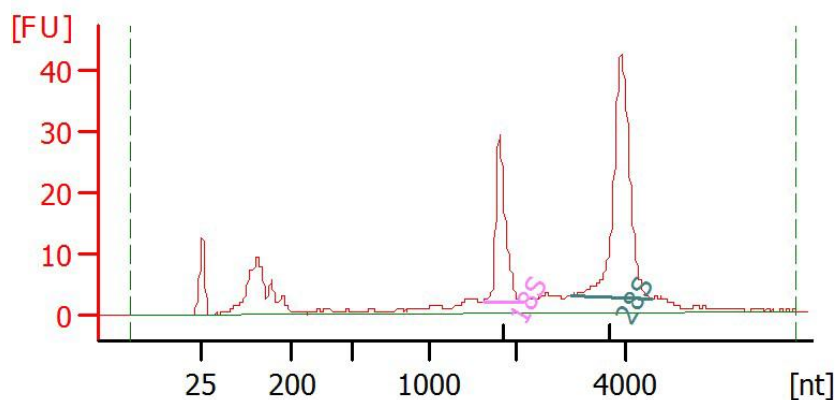
Vzorek	Koncentrace vzorku [μg/ml]	260/280
1	51,44	1,73
2	92,64	1,80
3	53,23	1,75
4	53,99	1,92
5	73,04	1,54
6	20,26	1,93
7	81,25	1,73
8	41,60	1,89

Průměrná koncentrace: $\bar{c} = \Sigma(c1-c8)/8 = 58,43 \mu\text{g/ml}$

Průměrná čistota: $\overline{A260/A280} = \Sigma[(A260/A280)1 - (A260/A280)8]/8 = 1,78$

5.2. Kontrola kvality RNA přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer

Kontrola kvality vyizolované RNA byla provedena přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA).



Obr. 6. Příklad elektroforetogramu RNA. Na ose x je zaznamenána délka fragmentu RNA a na ose y intenzita fluorescence RNA. Pík v oblasti 25 nukleotidů představuje RNA marker, v oblasti 1900 nukleotidů podjednotku 18S rRNA a v oblasti 4000 nukleotidů 28S rRNA. Hodnota RIN daného vzorku byla 9,5.

Tabulka č. 2. Kvalita vzorků RNA vyizolovaných fenol-chloroformovou metodou hodnocena dle RIN (RNA integrity number), měřeno na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer

Vzorek	RIN
1	8,6
2	8,1
3	8,9
4	8,6
5	8,3
6	7,9
7	8,5
8	8,4
9	7,4
10	9,4
11	9,5
12	9,1
13	1,6
14	9,0
15	9,4
16	8,4
17	1,0
18	1,0
19	9,2
20	9,5
21	9,4
22	9,5
23	7,7
24	6,8
25	6,9
26	7,2
27	7,7
28	7,6
29	7,7
30	4,2
31	4,1
32	2,4
33	7,0

34	8,7
35	9,4
36	1,0

Průměrná hodnota RIN: $\overline{RIN} = \Sigma(RIN1-RIN36)/36 = 7,19$

5.3. Human Exon 1.0 ST Array

V experimentu byly použity DNA microarrays Human Exon 1.0 ST Array firmy Affymetrix. Pro analýzu byly použity vzorky vyizolované RNA z lymfoblastů kostní dřeně. Celkem bylo provedeno 30 DNA čipů u 30 vybraných pacientů bez treatmentu dexametasonem nebo prednisolonem (10 pacientů s poklesem blastů po osmidenní prednisolonové indukci menším než 95 % a 20 pacientů s blast clearance vyšší než 95 %). Vzorky byly vybrány na základě dostatečné kvality a koncentrace vyizolované celkové RNA.

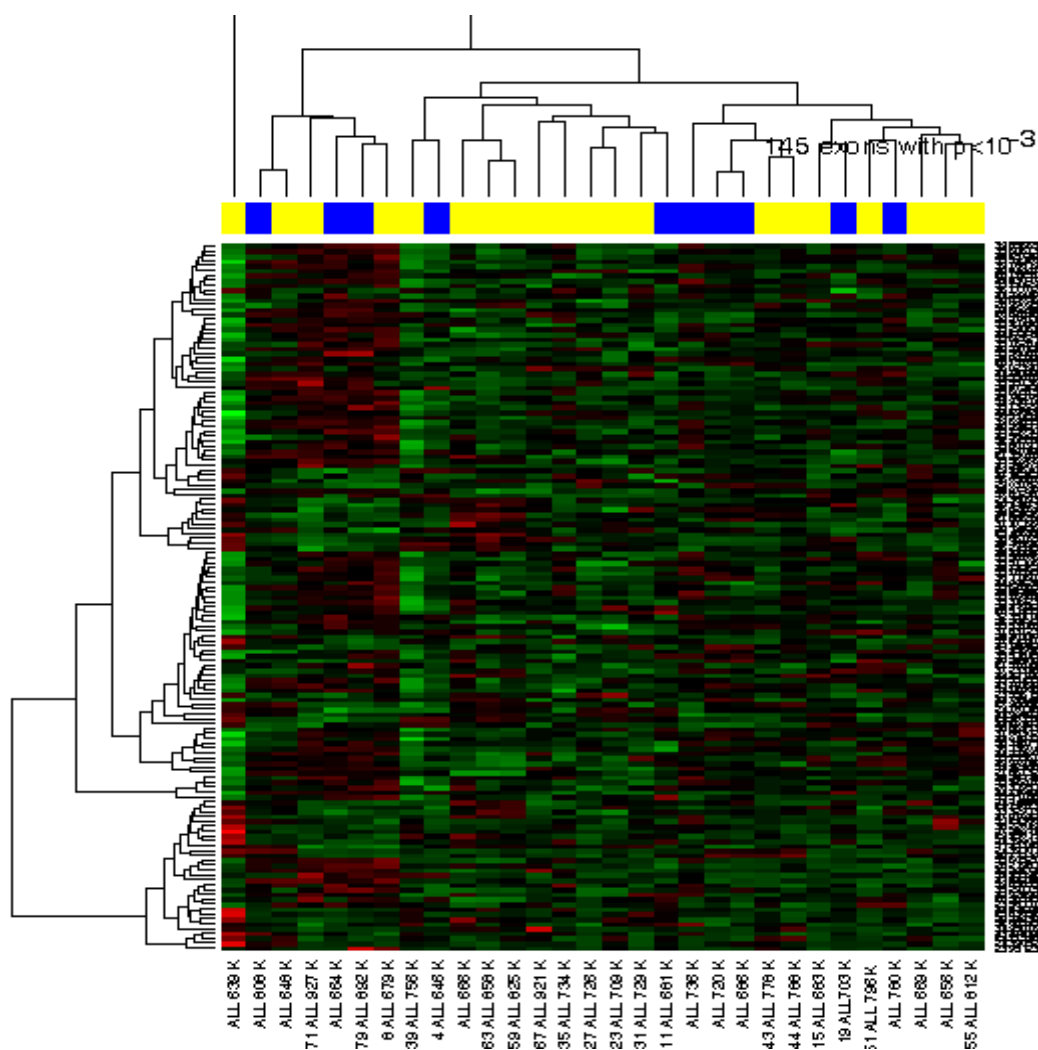
Průměrná koncentrace vyizolované RNA byla 147,75 μ l/ml a průměrná kvalita vyjádřena hodnotou RIN byla 8,84. Izolaci i kontrolu kvality vzorků použitých v této analýze jsem provedla ve své bakalářské práci.

Samotnému zpracování dat předcházelo ověření kvality microarrays. Intenzity signálů všech setů prób a jejich maximální a minimální hodnoty byly porovnány krabicovými grafy. Normalizací na těchto diagramech byly odhaleny redundantní položky, které byly vyřazeny z dalších analýz. Kontrola kvality proběhla pomocí programu Affymetrix GeneChp Command Console (AGCC).

Hlavní komponenty (PCA) byly analyzovány programem Partek. Program převádí pozorovaná data matematickým postupem do souboru hodnot lineárně nekoleovaných proměnných. Výsledná data vizualizují podobnosti a odlehlosti ve zkoumaném souboru dat.

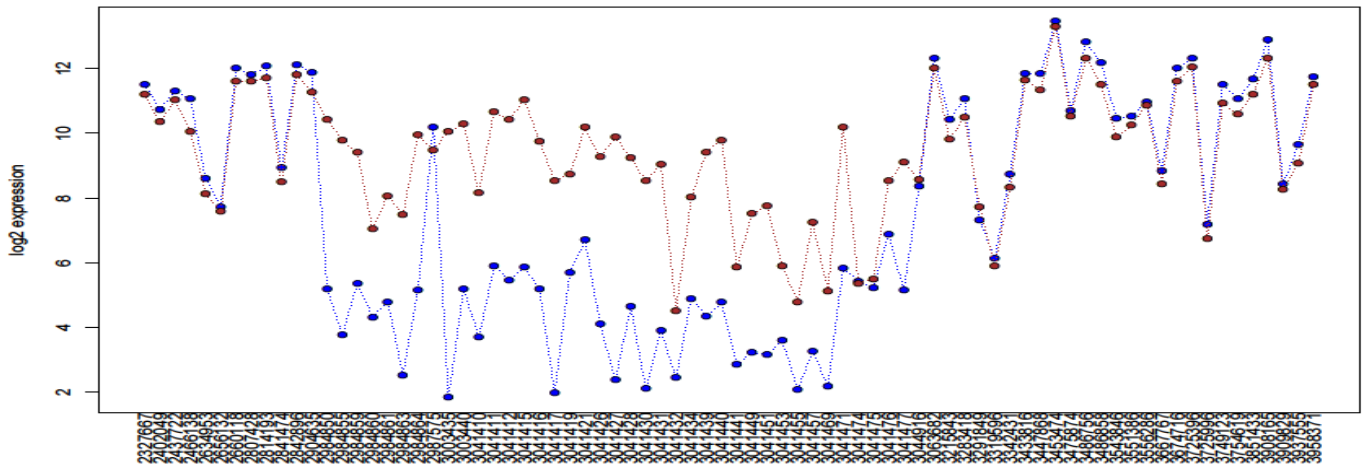
Zpracování a vyhodnocení dat z microarray bylo provedeno softwarem R/Bioconductor a jeho přídatnými balíky Heatplus (vizualizace skupin významně odlišných genů), oligo (práce s CFD soubory, které popisují rozložení čipu) a limma (nalezení nejvýznamnějších exonů/genů ve sledovaných skupinách). Daná data byla zpracována biostatistikem ve Statistice.

Porovnáním profilů genové exprese bylo identifikováno 145 rozdílně exprimovaných exonů mezi pacienty s blast clearance vyšší než 95 % mezi dny 0 a 8 a pacienty s nižší eliminací blastů.

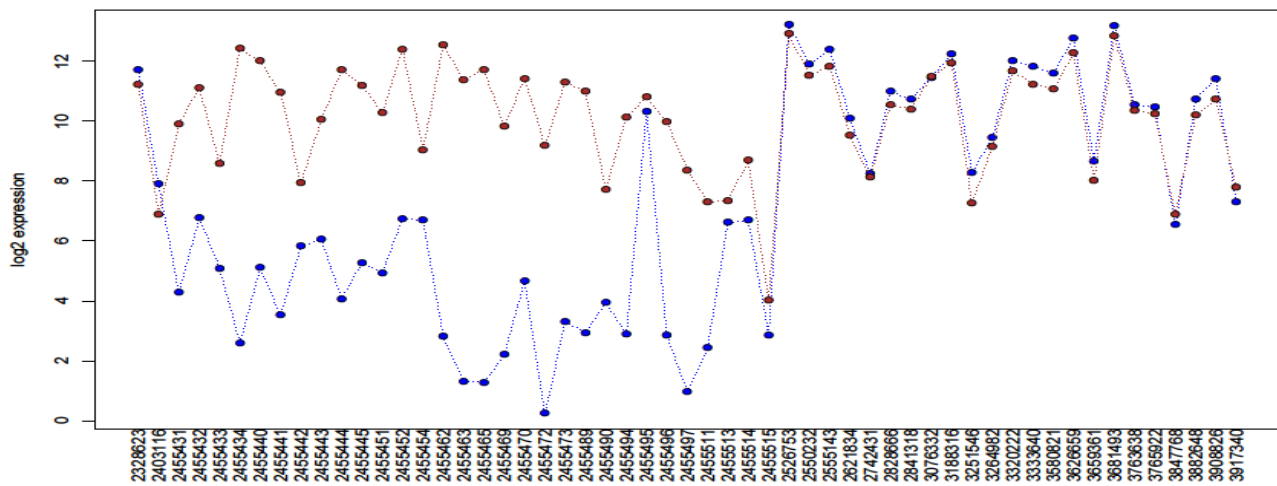


Obr. 10. Supervised clustering analysis. Rozdílné profily genové exprese 145 exonů mezi pacienty s více než 95% poklesem lymfoblastů po prednisolonové předřazi (žlutá) a pacienty s menším poklesem (modrá). Podmínky statistické analýzy $<0,001$; $\log_{2}FC < -2$ nebo > 2 .

Ve statistické analýze byly detekovány různé splicingové varianty genů IGF2BP3 (Insuline-like growth factor 2, binding protein 3; NM_006547) a PTPN14 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14; NM_005401). U pacientů s nižším poklesem blastů (pod 95 %) po prednisolonové indukci byly detekovány krátké varianty genů.



Obr. 11. Rozdílná exprese exonů v genu IGF2BP3.



Obr. 12. Rozdílná exprese exonů v genu PTPN14.

6. Diskuze

Izolace RNA a DNA z buněčných lyzátů získaných z periferní krve byla poměrně složitá. Pravděpodobně z důvodu špatného rozpuštění buněčné suspenze v trizolu. Jednalo se o vzorky dlouhodobě archivovány, s různým počtem a biologii buněk. Jelikož šlo o velmi vzácné vzorky, byla snaha vytěžit z nich maximum. Proběhla tedy izolace RNA i DNA.

Výtěžky RNA získané fenol-chloroformovou metodou se mezi jednotlivými vzorky značně lišily. Výsledná koncentrace RNA by se měla pohybovat v rozmezí 200 – 1000 $\mu\text{g/ml}$. U většiny vzorků byla ale nižší než 200 $\mu\text{g/ml}$. Poměr absorbancí A260/A280 u žádného vzorku RNA nepřesáhla hodnotu 2. Nejnižší poměr této absorbance byl u vzorku č. 5 a to 1,49. V případě nižšího poměru absorbance A260/A280 je vzorek znečištěn proteiny, které díky přítomnosti aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu více absorbují při 280 nm.

Koncentrace vyizolovaných RNA miRNease mini kitem (QIAGEN) nepřesahovaly 100 $\mu\text{g/ml}$. Nejnižší poměr absorbancí A260/A280 byl změřen u vzorku č. 5 a to 1,54. Kit byl použit u vzorků s nižším počtem buněk. Výtěžek těchto vzorků byl přesto poměrně nízký.

Očekávaný poměr absorbance A260/A280 u izolované DNA je 1,8. V případě nižší hodnoty než 1,8 je DNA kontaminována proteiny. Naopak vyšší hodnota než 2 svědčí o kontaminaci organickými sloučeninami (chloroform, fenol). Vzorek č. 35b s poměrem absorbancí 2,21 byl znečištěn organickými sloučeninami. Vzorky č. 17, 21, 22 36a a 36b byly znečištěny proteiny.

U intaktní total RNA převažuje 28S rRNA v poměru k 18S rRNA přibližně 2:1. Snížený poměr znamená degradaci. U vzorků č. 13, 17, 31, 32 a 36 byla změřená nízká hodnota.

Microarrays analýzy byly provedeny u vzorků s dobrou koncentrací, čistotou a kvalitou vyizolované RNA.

Citlivost a rezistence nádorových buněk ALL se u dětských pacientů liší. Účinnost léčiv závisí na řadě farmakokinetických a farmakogenetických faktorech. Společně s řadou biologických vlastností organismů určují výsledný terapeutický efekt. Ve skupině dětí s ALL se stále nachází přibližně 10 % pacientů, kteří neodpovídají na iniciační terapii

kortikoidy. Současné studie se zaměřují na stanovení účinné terapie s minimálními nežádoucími účinky agresivní cytotoxické léčby.

Rezistenci k terapii glukokortikoidy může způsobit snížená permeabilita buněčné membrány, snížený výskyt glukokortikoidních receptorů (GR) v cytoplazmě, abnormální glukokortikoidní receptor se sníženou kapacitou vázání glukokortikoidů, mutace ve vazebných oblastech pro GR-GK komplex nebo také míra exprese genů např. v drahách NT5C2, CREBBP, WHSC1, TP53, USH2A, NRAS nebo IKZF1.

Stanovením profilů genové exprese technologií DNA microarrays lze predikovat odpověď dětí s ALL na léčbu glukokortikoidy. Geny s rozdílnou expresí mezi chemosenzitivními a chemorezistentními pacienty mohou být využity v rutinní diagnostice k určení cílenější terapie. Identifikace těchto genů může být dále prováděna běžnými molekulárními metodami (například PCR).

Profilováním genové exprese byly detekovány různé splicingové varianty exonů v genu IGF2BP3 a PTPN14. Protein kódovaný genem IGF2BP3 se primárně nachází v jadérku, kde se může vázat na 5'UTR inzulin-like růstový faktor II, vedoucí mRNA a může potlačovat translaci inzulin-like růstového faktoru II. Nachází se na 7p11. O tomto proteinu je známo, že je vysoce exprimován v mnoha epiteliálních malignitách. Knockdown genu IGF2BP3 u myši způsobil potlačení růstu leukocytů v B-ALL buněčných liniích. Zda je gen IGF2BP3 onkogenní nebo zda působí ve vývoji B-buněk, není dosud známo. Gen PTPN14 kóduje enzym tyrozin fosfatázu typu non-receptor 14, který pravděpodobně reguluje lymfatický vývoj u savců. Předpokládá se, že se gen PTPN14 účastní angiogeneze. Jeho přesná funkce ale není známa. Nachází se na 1q32. Značná variabilita odpovědi ALL na terapii glukokortikoidy ve studii ukázala, že léčba prednisolonem nebo dexametasonem by se měla stanovit na základě nových prediktivních markerů.

7. Závěr

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše popisující současnou problematikou akutní lymfoblastické leukemie a dále moderní metody MPS. Byly ukázány možnosti využití technologií sekvenování nové generace ve stanovení prognózy a léčby ALL.

V experimentální části byla provedena izolace RNA a DNA z kostní dřeně dětských pacientů s ALL. U izolované RNA byla stanovena její koncentrace, čistota a kvalita. U vzorků RNA o dostatečné kvalitě byly stanoveny profily genové exprese.

Následně byly identifikovány různé varianty splicingových genů IGF2BP3 a PTPN14 s potenciálem prediktivních faktorů

Profilování genové exprese umožňuje detekovat markery, díky kterým by mohly být určeny cílenější terapie s menšími vedlejšími účinky.

8. Literatura

Ansorge, W. J. (2009): Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology* 25: 195-203

Becker, E. A., Burns, C. M., León E. J., Rajabojan, S., Friedman, R., Friedrich, T. C., O'Connor S. L., Hughes A. L. (2012): Experimental analysis of source of error in evolutionary studies based on Roche/454 pyrosequencing of viral genomes. *Genome Biol Evol.* 4(4): 457-465

Boyle, P., Clement, K., Gu, H., Smith, Z. D, Ziller, M., Fostel, J. L, Holmes, L., Meldrim, J., Kelley, F., Gnirke, A., Meissner, A. (2012): Gel-free multiplexed reduced representation bisulfite sequencing for large-scale DNA methylation profiling. *Genome Biology* 13(10): R92

Bragg, L. M., Stone, G., Butler, M. K., Hugenholtz, P., Tyson, G. W. (2013): Shining a Light on Dark Sequencing: Characterising Errors in Ion Torrent PGM Data. *PLoS Comput Biology* 9 (4): e1003031

Braslavsky I., Hebert, B., Kartalov, E., Quake, S. R. (2003): Sequence informatik can be obtained from single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 3960-3964

Busche, S., Ge, B., Vidal, R., Spinella, J.-F., Saillour, V., Richer, Ch., Healy, J., Chen, S.-H., Droit, A., Sinnott, D., Pastinen, T. (2013): Integration of High-Resolution Methylome and Transcriptome Analyses to Dissect Epigenomic Changes in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Research* 73(14): 4323-4336

Cretich, M., Monroe, M.R., Reddington, A., Zhang, X., Daaboul, G.G., Damin, F., Sola, L., Unlu, M.S., Chiari, M. (2012): Interferometric silicon biochips for label and label-free DNA and protein microarrays. *Proteomics* 12: 2963-2977

Croucher, N. J., Fookes, M. C., Perkins, T. T., Turner, D. J., Marguerat, S. B., Keane, T., Quail, M. A., He, M., Assefa, S., Bähler, J., Kingsley, R. A., Parkhill, J., Bentley, S. D., Dougan, G., Thomson, N. R. (2009): A simple method for directional transcriptome sequencing using Illumina technology. *Nucleic Acids Research* 37 (22): e148

Delseny, M., Han, B., Hsing, Y. I. (2010): High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Science* 179: 407-422

Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., Dewinter, A., Dixon, J., Foquet, M., Gaertner, A., Hardenbol, P., Heiner, C., Hester, K., Holden, D., Kearns, G., Kong, X., Kuse, R., Lacroix, Y., Lin, S., Lundquist, P., Ma, C., Marks, P., Maxham, M., Marphy, D., Park, I., Pham, T., Phillips,

M., Roy, J., Sebra, R., Shen, G., Sorenson, J., Tomaney, A., Travers, K., Trulson, M., Vieceli, J. et al. (2009): De novo fragment assembly with short mate-paired Real: Does the read length matter?. *Science* 323 (2910): 133-138

Fielding, A.K., Richards, S.M., Chopra, R., Lazarus, H.M., Litzow, M.R., Buck, G., Durrant, I.L., Luger, S.M., Marks, D.I., Franklin, I.M., Tallman, M.S., Rowe J.M., Goldstone, A.H. (2007): Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood* 109: 944-95

Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L. I., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., et al. (1995): Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496-512

Gökbuget, N., Kneba, M., Raff, T., Trautmann, H., Bartram, C.-R., Arnold, R., Fietkau, R., Freund, M., Ganser, A., Ludwig, W.-D., Maschmeyer, G., Rieder, H., Schwartz, S., Serve, H., Thiel, E., Brüggemann, M., Hoelzer, D. (2012): Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood* 120(9): 1868-1876

Harris, T. D., Buzby, P. R., Babcock, H., Beer, E., Bowers, J., Braslavsky, I., Causey, M., Colonell, J., Dimeo, J., Efcavitch, J. W., Giladi, E., Gill, J., Healy, J., Jarosz, M., Lapen, D., Moulton, K., Quake, S. R., Steinmann, K., Thayer, E., Tyurina, A., Ward, R., Weiss, H., Xie, Z. (2008): Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science* 320(5872): 106-109

Chaisson, M. J., Brinza, D., Pevzner, P. A. (2009): De novo fragment assembly with short mate-paired Real: Does the read length matter? *Genome research* 19: 336-346

Iacobucci, I., Lonetti, A., Paoloni, F., Papayannidis, C., Ferrari, A., Storlazzi, C. T., Vignetti, M., Cilloni, D., Messa, F., Guadagnuolo, V., Paolini, S., Ella, L., Messina, M., Vitale, A., Meloni, G., Soverini, S., Pane, F., Baccarani, M., Foà, R., Martinelli, G. (2010): The PAX5 gene is frequently rearranged in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. A report on behalf of the GIMEMA Acute Leukemia Working Party. *Haematologica* 95: 1683–1690

Inaba, H., Greaves, M., Mullighan, Ch. G (2013): Acute lymphoblastic leukaemia. *ScienceDirect* 381: 1943-1955

Jarvie, T. (2005): Next generation sequencing technologies. *Drug Discov Today Technol.* 2(3): 255-260

Jayapal, M., Melendez, A.J. (2006): DNA microarray technology for target identification and validation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33: 496-503

Jünemann, S., Prior, K., Szczepaniwski, R., Harks, I., Ehmke, B., Goesmann, A., Stoye, J., Harmsen, D. (2012): Bacterial Community Shift in Treated Periodontitis Patients Revealed by Ion Torrent 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing. *PLoS One* 7(8): e41606

Kepák, T. (2009): Pozdní následky onkologické léčby v dětském věku- potřeba multidisciplinární spolupráce. *Postraduální medicína* 3: 334-340

Korlach, J., Bjornson, K. P., Chaudhuri, B. P., Cicero, R. L., Flusberg, B. A., Gray, J. J., Holden, D., Saxena, R., Wegener, J., Turner, S. W. (2010): Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Methods Enzymol.* 472: 431-455

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921

Liu, L., Yinhu, L., Siliang, L., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. (2012): Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 251364

Loh, L. M., Zhang, J., Harvey, R. C., Roberts, K., Payne-Turner, D., Kang, H., Wu, G., Chen, X., Becksfort, J., Edmonson, M., Buetow, K. H., Carroll, W. L., Chen, I-M., Wood, B., Borowitz, M. J., Devidas, M., Gerhard, D. S., Bowman, P., Larsen, E., Winick, N., Raetz, E., Smith, M., Downing, J. R., Willman, Ch. L., Mullighan, Ch. G., Hunger, S. P. (2013): Tyrosine binome sequencing of pediatric acute lymphoblastic leukemia: a report from Children's Oncology Group TARGET Project. *Blood* 121(3): 485-488

lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 89: 801-808

Ma, X., Edmonson, M., Yergeau, D., Muzny, D. M., Hampton, O. A., Rusch, M., Song, G., Easton, J., Harvey R. C., Wheeler, D. A., Ma, J., Doddapaneni H., Vadodaria, B., Wu, G., Nagahawatte, P., Carroll, W. L., Chen, I-M., Gastier-Foster, J. M., Relling, M. V., Smith, M. A., Devidas, M., Auvil, J. M. G., Downing J. R., Loh, M. L., Willman, Ch. L., Gerhard, D. S., Mullighan, Ch. G., Hunger, S. P., Zhang, J. (2015): Rise and fall

of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Communications* 6: 6604

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Said, A., Bader, J. S., Bembien, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Yi-Ju, Ch., Chen, Z., Dewel, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Xavier, V. G., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, Ch. H., Irzyk G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L. I., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J.-B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W. et al. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380

Maxam, A. M., Gilbert, W. (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(2): 560–564

Merriman, B., Ion Torrent R&D Team, Rothberg J. M. (2012): Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis* 33: 3397-3417

Metzker, M. L. (2009): Sequencing in real time. *Nature Biotechnology* 27: 150-151

Metzker, M. L. (2010): Sequencing technologies- the next generation. *Nature Reviews* 11: 31-46

Míhal, V. (2011): Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) In: Bajčiová, V., Štěrba, J., Tomášek, J. (ed.): *Nádory adolescentů a mladých dospělých*. pp. 43-53, Praha: Grada Publishing. 371 s. ISBN 978-80-247-3554-2

Mihál, V., Horák, D., Pospíšilová, D., Bučil, J., Tichý, M., Michálková, K., Novák, Z., Mathonová, J., Jorošová, M. (2005): Strukturní změny kostní dřeně prokázané pomocí celotělové magnetické rezonance jako časný projev akutní leukemie. *Pediatric pro praxi* 3: 163-165

Morozova, O., Hirst, M., Marra, M. A. (2009): Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10: 135-151

Nyrén, P. (1987): Enzymatic method of continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Analytical Biochemistry* 167: 235–238

Okamoto, R., Ogawa, S., Nowak, D., Kawamata, N., Akagi, T., Kato, M., Sanada, M., Weiss, T., Haferlach, C., Dugas, M., Ruckert, Ch., Haferlach, T., Koeffler, H.P. (2010): Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 95: 1481–1488

Papajík, T., Raida, L., Indrák, K. (2005): REAL/WHO klasifikace nádorů lymfatické tkáně: 10 let fungování společného jazyka z pohledu klinické praxe. *Vnitřní lékařství* 51: 690-698

Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zaursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., Baumeister, K. (1987): A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 16: 336-341

Roberts, K. G., Morin, R. D., Zhang, J., Hirst, M., Zhao, Y., Su, X., Chen, S.-Ch., Payne-Turner, D., Churchman, M., Harvey, R. C., Chen, X., Kasap, C., Yan, Ch., Becksfort, J., Finney, R. P., Teachey, D. T., Maude, S. L., Tse, K., Moore, R., Jones, S., Mungall, K., Birol, I., Edmonson, M. N., Hu, Y., Buetow, K. E., Chen, I-M., Carroll, W. L., Wei, L., Ma, J., Kleppe, M., Levine, R. L., Garcia-Manero, G., Larsen, E. et al. (2012): Genetic alterations activating kinase and cytosine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 22(2): 153-166

Rothberg, J. M., Leamon, J. H. (2008): The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 1117-1124

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(12): 5463–5467

Sandberg, J., Werne, B., Dessing, M., Lundeberg, J. (2011): Rapid flow-sorting to simultaneously resolve multiplex massively parallel sequencing products. *Scientific Reports* 1: 108

Sengupta, S., Bolin, J. M., Ruotti, V., Nguyen, B. K., Thomson, J. A., Elwell, A. L., Stewart, R. (2011): Single Read and Paired End mRNA-Seq Illumina Libraries from 10 Nanograms Total RNA. *J Vis Exp*. 56: 3340

Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., Hajibabaei, M. (2012): Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology* 21: 1794-1805

Starý, J. (2010): Akutní leukemie u dětí. *Onkologie* 4: 120-124

Stillier CA. (2004): Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 23: 6429–6444

Szczepanek, J., Styczyński, J., Haus, O., Tretyn, A., Wysocki, M. (2011): Relapse of acute lymphoblastic leukemia in children in the context of microarray analyses. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 59: 61-68

Šálek, C. (2012): Diagnostika a léčba akutních leukemií. *Interní medicína* 14: 366-372

Teuffel, O., Dettling, M., Cario, G., Stanulla, M., Schrappe, M., B_hlmann, P., Niggli, N.K., Schäfer, B.W. (2004): Gene expression profiles and risk stratification in childhood acute

Tjong, V., Yu, H., Hucknall, A., Chilkoti, A. (2013): Direct fluorescence detection of RNA on microarrays by surface-initiated enzymatic polymerization. *Analytical Chemistry* 85: 426-433

Thompson J. F., Steinmann, K. E. (2010): Single Molecule Sequencing with a HeliScope Genetic Analysis System. *Curr Protoc Mol Biol.* 7: Unit 7.10.

Torres, T. T., Metta, M., Ottenwälder, Schlötterer (2008): Gene expression profiling by massively parallel sequencing. *Genome research* 18: 172-177

Tsao, A. S., Kantarjian, H., Cortes, J., O'Brien, S., Talpaz, M. (2003): Imatinib mesylate causes hypopigmentation in the skin. *Cancer* 98: 2483-2487

Voelkerding, K. V., Dames, A. S., Durtschi, J. D. (2009): Next-Generation Sequencing: From Basic Reserch to Diagnostics. *Clinical Chemistry* 55: 4641-4658

Yeo, K. K., Murnick, J. G., Miller, M. M., Angiolillo, A. L. (2015): The Use of Diffusion Weighted Imaging in the Diagnosis of Intraocular Relapse of Acute Lymphoblastic Leukemia: A Case Report. *Blood Research and Disorders* 2: 1

Zhu, Y. X., Braggio, E., Shi, CH.-X., Bruins, L. A., Schmidt, J. E., Wier, S. V., Chang, X.-B., Bjorklund, Ch. C., Fonseca, R., Bergsagel, P. L., Orłowski, R. Z., Stewart, A. K. (2011): Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood* 118: 4771-4779

Knižní zdroje:

Doubek, M., Folber, F., Janíková, A., Panovská, A., Šálek, D., Tošková, M. (2012): *Hematologická onkologie – leukemie a lymfomy v humánní medicíne*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. 128 s. ISBN 978-80-7305-621-6.

Míhal, V. (2011): Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) In: Bajciová, V., Šterba, J., Tomášek, J. (ed.): *Nádory adolescentu a mladých dospělých*. pp. 43-53, Praha: Grada Publishing. 371 s. ISBN 978-80-247-3554-2

Internetové zdroje:

URL: <<http://454.com/products/technology.asp>> [cit.2015-4-3]

URL:<[http:// www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)> [cit.2015-3-25]

URL:<<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems/solid-sequencing-chemistry.html>> [cit.2015-4-10]

www.illumina.com¹

URL:<<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/solexa-technology.html>> [cit.2015-4-6]

www.illumina.com²

URL: <<http://www.illumina.com/applications/sequencing/rna.html>> [cit.2015-4-6]

URL: <<http://ioncommunity.lifetechnologies.com/community/intro>> [cit.2015-4-9]

www.lifetechnologies.com²

URL:<<http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow.html>> [cit.2015-4-9]

www.lifetechnologies.com¹

URL:<<http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/solid-next-generation-sequencing.html>> [cit.2015-4-11]

URL: <<http://www.linkos.cz>> [cit.2015-3-20]

URL: <<http://www.medinfographics.com>> [cit.2015-3-21]

URL:<http://www.pacificbiosciences.com/news_and_events/press_releases/index.html?targetYear=2013> [cit.2015-4-11]

URL:<<http://seqll.com/the-evolution-and-future-of-small-molecule-sequencing-technology/>> [cit.2015-4-5]

URL: <<http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/images/20.12.gif>> [cit.2015-3-25]

9. Seznam použitých zkratk

³² P	radioaktivní fosfor
A	adenin
A230	absorbance při 230 nm
A260	absorbance při 260 nm
A280	absorbance při 280 nm
AB SOLiD	Applied Biosystems Sequencing by Oligo Ligation and Detection
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene
ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 gene
AF4	ALL1-fused gene from chromosome 4
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
APE1	Apurinic/aprimidinic endonuclease
APS	adenosin fosfosulfát
ATP	adenosintrifosfát
B-ALL	akutní lymfoblastická leukémie B buněčné řady
BCR	B-buněčný receptor
BCR/ABL	breakpoint cluster region/ c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase (Abelson murine leukemia)
bp	base pair
C	cytosin
CCD	charge-coupled device
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CMOS	complementary metal-oxide-semiconductor
CNS	centrální nervová soustava
CREBBP	CREB binding protein
CRLF2	cytokine receptor-like factor 2
cRNA	komplementární ribonukleová kyselina
Cy5	barvivo odvozené od cyaninu (dye cyanine 5)
dATP	deoxyadenintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
ddATP	dideoxyadenin trifosfát
ddCTP	dideoxycytosin trifosfát

ddGTP	dideoxyguanin trifosfát
ddNTP	dideoxynukleotid trifosfát
ddTTP	dideoxythymín trifosfát
DEPC	derthypyrocarbonate
dGTP	deoxyguanintrifosfát
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
dTTP	deoxythymintrifosfát
dUTP	deoxyuridin trifosfát
EBF1	early B-cell factor 1
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGIL	European Group for Immunological Classification of Leukemia
emPCR	emulzní PCR
EPOR	erytropoetin
EtOH	etanol
ETV6	ets variant 6
FAB	French-American-British
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
G	guanin
GK	glukokortikoidy
GR	glukokortikoidní receptor
GS System	Genome Sequencer System
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTLV1	Human T-lymphotropic virus 1
IGF2BP3	Insuline-like growth factor 2, binding protein 3; NM_006547
IGH@	immunoglobulin heavy locus @
IKZF1	Ikaros family zinc finger 1 gene
IVT	<i>in vitro</i> transkripce
JAK	Janus kinase
log	logaritmus
MID	Multiplex Identifiers
miRNA	mikroribonukleová kyselina
MLL	lineární leukemický gen

MPS	masivní paralelní sekvenování
MRD	minimální reziduální choroba
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NaCl	chlorid sodný
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncRNA	nekódující RNA
NGS	Next generation sequencing
NRAS	neuroblastoma RNA viral (v-ras) oncogene homolog
nt	nukleotid
NT5C2	5'-nucleotidase, cytosolic II
NUP214	Nucleoporin 214 kDa
p	krátké raménko chromozomu
PacBio	Pacific Biosciences
PAX5	paired box 5
PCA	analýza hlavních komponent
PCR	polymerázová řetězcová reakce (polymerase chain reaction)
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor beta polypeptide
PGM	Personal Genome Machine
poly(dT)	polydeoxy thymín
PP _i	anorganický difosfát
pre-B ALL	precursor B acute lymphoblastic leukemia
PTPN14	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14; NM_005401
q	dlouhé raménko chromozomu
RANBP2	RNA binding protein 2
RCSD1	RCSD domain containing 1
RIN	RNA integrity number
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální RNA
RUNX1	runt-related transcription factor 1
siRNA	small interfering RNA
SMRT	Single Molecule Real-Time sequencing
SMS	single-molecule sequencing
SNP	single nucleotide polymorphism
SPSB1	spA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1

ssDNA	single-stranded DNA (jednovláknová DNA)
sstDNA	single-stranded template DNA
STRN3	striatin, kalmodulin binding protein 3
t	translokace
T	thymin
T-ALL	akutní lymfoblastická leukémie T buněčné řady
TEL/AML 1	ETV6/RUNX1
TP 53	tumor protein p53
UDG	uracil DNA glykosylasa
USA	United States of America
USH2A	usher syndrome 2A
UV-VIS	Ultraviolet–visible
WHO	World Health Organization
WHSC1	Wolf-Horschhorn syndrome candidate 1
ZMWs	zero mode waveguides