Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013 **Zuzana Bačová**

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky

Profilování genové exprese u pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií

Bakalářská práce

Zuzana Bačová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013 **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 2013 .....

podpis

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Zuzana Bačová
Název práce: Profilování genové exprese u pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií
Typ práce: bakalářská
Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP Olomouc
Vedoucí práce: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt

Technologie microarray je v současnosti jedna z nejrychleji se rozvíjejících technologií. DNA microarray s velkým množstvím prób (jako Affymetrix GeneChip) umožňuje studium globálních vzorů genové exprese.

Akutní lymfoblastická leukemie je nejčastější maligní onemocnění dětí. V současné době celkové procento přežití u dětí dosahuje 90 %. Podle stanovených profilů genové exprese je možné stanovit molekulárně-genetické vlastnosti jejich onemocnění a navrhnout tak cílenější terapii s menšími vedlejšími účinky.

Metodou DNA microarray byly v experimentální části identifikovány různé splicingové varianty genu PBX1 mezi pacienty, kteří vykazovali dobrou a špatnou odpověď na prednisone.

Klíčová slova:

akutní lymfoblastická leukemie, DNA microarray, glukokortikoidy

Bibliographical Identification:

Author´s first and sure name: Zuzana Bačová
Title: Gene expression profiling in acute lymphoblastic leukemia patients
Type of thesis: bachelor
Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
The year of presentation: 2013

Abstract

DNA microarray analysis is one of the fastest-growing technologies. High-density DNA microarrays (such Affymetrix GeneChip) provide an important tool to study the global patterns of gene expression.

Acute lymphoblastic leukemia is the most common children malignant disease. At present, the overall survival rate in childern is 90 %. According to established gene expression profiles can be determined molecular-genetic characteristics of their disease and suggested targeted therapy with less side effects.

In experimental part, the different splicing variations of PBX1 gene were by DNA microarray identidied in the groups of patients who had good and poor response to prednisone.

Keywords:

acute lymphoblastic leukemia, DNA microarray, glucocorticoids

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D. za odborné vedení a konzultace. A dále Mgr. Andree Benedíkové a Bc. Michaele Sedláčkové za seznámení s laboratorními technikami.

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. Technologie DNA čipů 15
      2.3.1. Rozdělení DNA čipů 16
      2.3.2. Affymetrix GeneChip technologie 18
      2.3.3. Čip použitý v experimentu 19
      2.3.4. Zpracování mikročipových dat 20
   2.4. Využití mikročipu v genové analýze ALL 23
3. Cíl práce 26
4. Materiál a metodika 27
   4.1 Izolace RNA 27
      4.1.1. Materiál a reagencie 27
      4.1.2. Přístroje a zařízení 27
      4.1.3. Příprava roztoků 27
      4.1.4. Postup 28
   4.2 Měření koncentrace a čistoty RNA spektrofotometricky 29
   4.3 Kontrola kvality RNA prostřednictvím Agilent 2100 Bioanalyzer 29
      4.3.1. Materiál a reagencie 29
      4.3.2. Přístroje a zařízení 29
      4.3.3. Postup 30
   4.4 Expresní čipy GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) 31
      4.4.1. Příprava Poly-A RNA kontrol 32

4.4.2. Syntéza prvního vlákna cDNA 32
4.4.3. Syntéza druhého vlákna cDNA 33
4.4.4. Syntéza cRNA *In Vitro* Transkripcí (IVT) 33
4.4.5. Purifikace cRNA 33
4.4.6. Syntéza druhého vlákna cDNA 34
4.4.7. Hydrolýza RNA s použitím RNasy 35
4.4.8. Purifikace druhého vlákna cDNA 35
4.4.9. Fragmentace jednovláknové DNA 35
4.4.10. Značení fragmentované jednovláknové DNA 36
4.4.11. Hybridizace 36
5. Výsledky 38
5.1. Izolace RNA 38
5.2. Kontrola kvality přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer 39
5.3. Human Exon 1.0 ST Array 41
6. Diskuze 47
7. Závěr 49
8. Literatura 50
9. Seznam použitých zkratek 55

1. Úvod

DNA microarray je stále se rozvíjející technologie, která umožňuje molekulárně-biologickou analýzu. Profilování genové exprese může identifikovat a měřit tisíce genů v jednom experimentu, čímž se značně urychlí několik druhů vyšetření. Komplexní genetickou analýzu organismu nebo daného vzorku umožňují sondy, které jsou imobilizované na povrchu čipu. Sondy jsou navrženy tak, aby byly specifické pro daný organismus, gen nebo genetické abnormality (mutace nebo polymorfismus) (Bilitewski et al., 2009).

Akutní lymfoblastická leukemie je nejčastěji se vyskytující maligní onemocnění dětského věku, nejvíce pak u dětí mezi 2. a 5. rokem života. Současná diagnóza je založena na morfologických, imunofenotypických a genetických prvcích, které umožňují odlišení normálních kmenových buněk od buněk nádorových. Přežití dětské akutní lymfoblastické leukemie se zvýšilo zhruba na 90 % (Inaba et al., 2013). U dospělých dosahuje celkového vyléčení 40-50 % pacientů (Onciu et al., 2009). Zlepšení celkových výsledků souvisí s rozdělením pacientů do rizikových skupin na základě prognostických faktorů, které zahrnují věk, imunofenotyp, počet bílých krvinek, postižení centrální nervové soustavy, odpověď na léčbu a nálezy genetických abnormalit. Nicméně u 20-25 % pacientů dochází následně k relapsu nemoci.

Stanovení genových profilů leukemických blastů, pomocí technologie DNA microarray, umožňuje identifikaci více znaků, které se podílejí na rozvoji akutní leukemie. Dále slouží ke stanovení prognózy a cílenější terapie (Szczepanek et al., 2010). Porovnáváním genetických profilů buněk pacientů v čase diagnózy a relapsu bylo zjištěno, že nejvýznamnější změny se vyskytují na úrovni exprese genů, které jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu, DNA opravy, apoptózy, onkogeneze, lékové rezistence a metastázy (Bhojwani et al., 2006).

2. Současný stav řešené problematiky

2.1. Leukemie

Leukemie, zastarale nazývána jako hemoblastóza, je krevní nádorové onemocnění. Představuje nejčastější nádorové onemocnění dětského věku. Leukemie tvoří 30 % zhoubných nádorů dětí (www.linkos.cz). Jedná se o následek genetických změn v hematopoetické kmenové buňce, případně liniových progenitorů. Genetické změny znemožní normální diferenciaci buněk, odstranění mutované buňky apoptózou a podpoří proliferaci a sebeobnovu. Dle klinického průběhu se leukemie klasifikuje na akutní a chronickou. Leukemii dále můžeme dělit na myeloidní nebo 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 je velmi heterogenní onemocnění. Podle charakteristických genetických změn rozdělujeme ALL na několik genetických podtypů, které se liší svou prognózou a také léčebným přístupem (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 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).

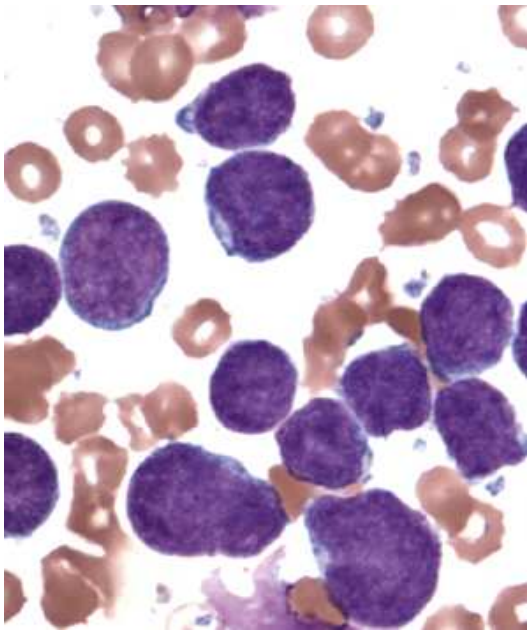
Toto rozdělení se v dnešní době považuje za zastaralé a prakticky se už nevyužívá. Ke stanovení léčby a následné prognózy se využívá základní rozdělení dle WHO, která klasifikuje ALL na dvě skupiny:

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 („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 v jednotlivých věkových skupinách neliší. Objevuje se maligní bujení nádorových buněk, tzv. blastů, a útlak normální hematopoézy. Hyperleukocytóza není vždy zjištěna v čase diagnózy z periferní krve. Důsledek útlaku 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 nejčastěji se manifestuje 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. Následkem lymfadenopatie může dojít až k obstrukci dýchacích a útlaku velkých cév. Dále se až u 65 % pacientů objevují bolesti kloubů. U některých nemocných se prokáže v čase diagnózy leukemická infiltrace centrální nervová soustava (CNS), projevující se neurologickými symptomy, jako je bolest hlavy, zvracení, nauzea, změna chování nebo paréza hlavových nervů (Míhal, 2011).



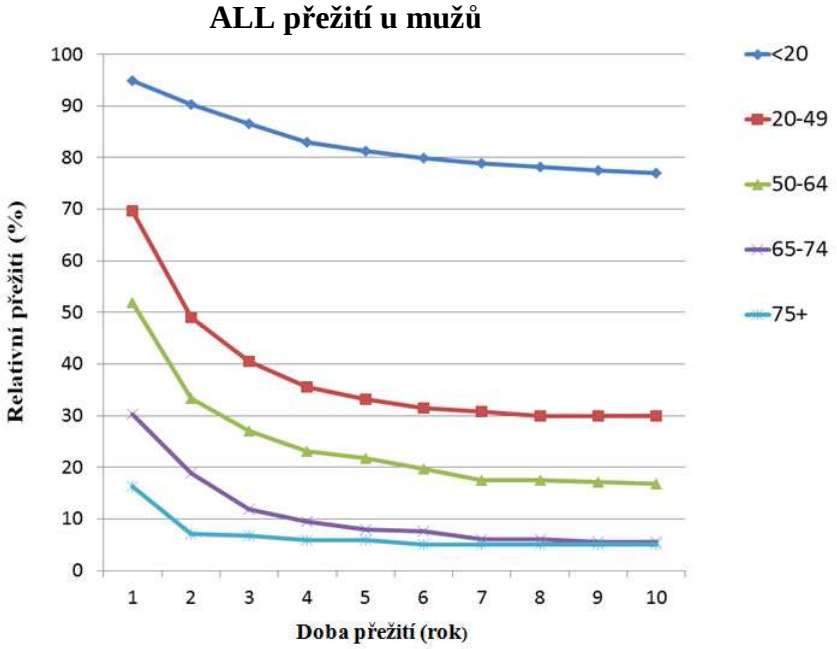
Obr. 1. Vzorek kostní dřeně s leukemickými lymfoblasty klasifikovány dle FAB do skupiny L3 obarven Giemsovým barvivem (Tsao et al., 2003)

2.2.3. Incidence

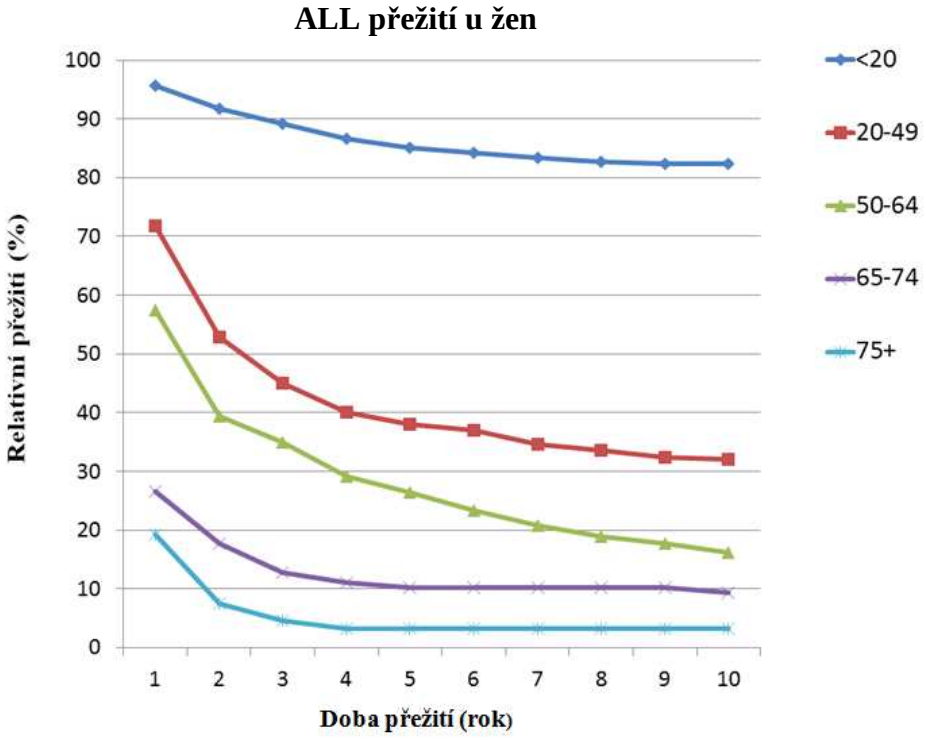
ALL pravděpodobně vzniká jako abnormální odpověď organizmu náchylného jedince na virovou infekci. Podle Knudsonovy teorie dvojího zásahu doprovází rozvoj nádoru dvě nevyhnutelné genetické události, prenatální – *in utero* a postnatální – v důsledku virové infekce. U dětské ALL postihuje první genetická událost především zralejší lymfatické progenitorové buňky, zatímco u ALL dospělých dochází k první genetické události v multipotentních kmenových buňkách. U dospělých nemocných s ALL se vyskytuje vyšší počet leukocytů, zvýšená incidence T-fenotypu (20-25 % u dospělé vs. 15 % dětské ALL), Philadelphský chromozom (20-25 % u dospělé vs. 3-5 % dětské ALL) a také snížený výskyt 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 teleangiektazie nebo Fanconiho 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 Epsteina-Barrové, 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 podílejí chromozomové změny včetně translokací, které způsobují fúzi genů, ale také hyperdiploidii čítající více než 50 chromozomů. Chromozomální numerické nebo strukturní změny se vyskytují u více než 90 % dětských ALL. Nejčastější chromozomální aberace u dětí je translokace t(12;21) a tento fúzní gen TEL/AML1 patří k prognosticky významným. Tato aberace vyskytující se u 20-25 % dětí se spojuje s příznivou prognózou (Stiller et al., 2004). Převážně u dospělé ALL je často detekován Philadelphský chromozom, který vzniká translokací t(9;22), jejímž 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 a dále pak 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 (Mihál et al., 2005).

2.2.6. Léčba

V současné době je léčba ALL výhradně protokolární. Rozdíly v léčbě 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 a výsledky léčby jsou statisticky méně příznivé než u dětské ALL 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 prednisonem 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/µl, špatné odpovědi na fázi s prednisonem 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 (prednison, dexametazon). Kortikoidy jsou důležitou součástí léčby ALL a 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 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). 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. Technologie DNA čipů

V současnosti se medicína stále více zaměřuje na molekulární a genetické mechanismy, které jsou zapojeny do chorobných procesů. Microarrayas byly poprvé uvedeny na trh v polovině 90. letech 20. století (Zhu et al., 2011). Technologie genových čipů umožňuje v krátkém čase a v rámci jednoho experimentu monitorování tisíce genů. Analýzou mohou být identifikovány polymorfismy, mutace nebo chromozómové aberace. Výsledné profily zobrazují down a overexprimované geny v době odběru vzorku a odrážejí tak jejich činnost (Thomson, 2005). Měření tisíce RNA transkriptů najednou umožňuje ve větší míře charakterizovat buňky a tkáně (Zilliox et al., 2007). Vzory genové exprese, získané pomocí DNA microarrays, mohou sloužit ke stratifikaci pacientů podle molekulárních vlastností jejich nádorů. Metoda může pomoci objasnit mechanismus transformace normální buňky v buňku rakovinnou, ale také lze dle jejich výsledků navrhnout cílenější individuální léčbu s větší účinností a menšími vedlejšími účinky (Henrickson et al., 2007). Microarrays jsou tedy používány pro molekulární profilování, identifikaci nových léčebných postupů, objev biomarkerů i pro hledání genů a určování jejich funkce (Jayapal et Melendez, 2006).

Široké komerční využití DNA microarrays klade větší nároky jak na jejich výrobu, stabilitu při skladování, tak i na jejich reprodukovatelnost (Shlyapnikov et al., 2009). Ve studii zabývající se určitým problémem lze pomocí složitých biostatických postupů kombinovat data z různých typů platforem, čímž se dá zvýšit přesnost výsledků a vytvoření komplexnějšího a širšího obrazu (Cahan et al., 2007).

Technologie se vyvinula z metody southern blotting, která umožňuje detekci sekvencí DNA v restrikčních fragmentech separovaných gelovou elektroforézou (Croning et al., 2010). Na pevném nosiči čipu (sklíčko, plast, nylon) jsou přichyceny stovky až tisíce cDNA nebo oligonukleotidových sond, se kterými hybridizuje vzorek testovaných nukleových kyselin (Park et al., 2005). Na čipu se nachází více míst se stejnou sekvencí. Soubor identických sond se označuje jako tzv. spoty. Prvním krokem microarray je izolace a amplifikace cílové DNA nebo RNA (Jakoubek et al., 2012). K posthybridizační detekci musí být vzorky zkoumaných nukleových kyselin značeny fluorescenčními nebo chemiluminiscenčními značkami (Cretic et al., 2012). Po aplikaci na čip kvantitativně hybridizují s próbou

komplementární sekvence. Intenzita signálu znázorňuje míru hybridizace a ukazuje tak množství určitých sekvencí daného vzorku (Tjong et al., 2013).

Při návrhu a následném provedení experimentu microarray by měly být brány v úvahu všechny potencionální zdroje variability, aby se zabránilo případnému zkreslení dat (Zakharkin et al., 2005).

K hodnocení výsledků microarray analýz lze přistupovat různými způsoby. Exprese genů může být stanovena na základě posouzení množství RNA transkriptů, komplementárních k daným sondám, podle nichž se stanovují charakteristické rysy genové exprese u jednotlivých podtypů nemoci (Brentani et al., 2005). Data se běžně interpretují pomocí Gene Ontology (GO) kategorií, jejíchž smyslem je vytvořit jednotnou terminologii pro popis funkce genových produktů (Yang et al., 2007). Pro určení podtypů se také využívá mikro-RNA (miRNA), která má funkci negativního regulátoru genové exprese v důležitých buněčných procesech zahrnujících apoptózu, buněčnou proliferaci a diferenciaci. Další způsob hodnocení genové exprese může být prováděn na úrovni genomové DNA. Technologie umožňuje posoudit stovky tisíc jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide polymorphisms, SNPs) (Bacher et al., 2010). Metodou SNP microarray se mohou u daného vzorku vyšetřit změny v počtu kopií (copy number variations = CNV) a ztráta heterozygotnosti (lost of heterogenity = LOH) (Bernardini et al., 2010). Tyto jevy se často vyskytují u nádorových onemocnění.

2.3.1. Rozdělení DNA čipů

DNA čipy se podle druhu prób dělí na komplementární (cDNA) a oligonukleotidové. Próby cDNA čipů mají délku větší než 200 bp a získávají se prostřednictvím PCR reakce z knihoven DNA (Yuen et al., 2002). Extrahovaná mRNA ze vzorku je pomocí reverzní transkripce přepsána do cDNA, která je následně fluorescenčně značena. (Margalit et al., 2005). Vzorky cDNA jsou aplikovány na čip, kde se komplementárně vážou k próbám. Stupeň hybridizace se dříve hodnotil fluorescenčním mikroskopem, dnes už softwarově (Aldrich-Wright et al., 2011). Získané výsledky nemusí být přesné, jelikož u vzorků může dojít ke crosshybridizaci a mohou tak zhybridizovat s próbami, které představují geny jedné genové rodiny. Oligonukleotidové microarray využívají sadu krátkých oligonukleotidových prób. Próby pro tyto čipy se rozlišují na krátké (do 25 nukleotidů) a dlouhé (50-100 nukleotidů). Oligonukleotidové čipy se vyznačují vysokou specificitou a umožňují

identifikaci malých oblastí genomu (Henrickson et al., 2007) Krátké 20-25mery jsou syntetizovány *in situ* fotolitograficky na křemíkových destičkách (array od firmy Affymetrix) nebo metodou in-jet (technologie Agilent) (Schulze et Downward, 2001). Alternativní microarray technologie BeadArray od firmy Illumina představuje destičku pokrytou křemičitými mikrokuličkami, které pokrývají oligonukleotidové sondy (Dunning et al., 2007). V současné době neexistuje způsob, jak navrhnout sondy, aby se zcela shodovaly se zkoumanou sekvencí. Jedna z možností řešení tohoto problému je použití většího množství sond pro jeden cíl. Výsledný průměr z těchto signálů může být spolehlivější (Pozhitkov et al., 2007).

Agilent na výrobu čipů používá dva odlišné postupy. Pokud jsou presyntetizované oligonukleotidy nebo cDNA vtisknuty přímo na povrch sklíčka, pak se jedná o depozitní array (www.agilent.com). Při druhém postupu se na povrch microarray nanáší přesný objem (pl) nukleotidů. Společně se 4 bázemi se aplikuje i katalyzátor, který slouží k odstranění chránící skupiny. Tento krok se několikrát opakuje, až se dosáhne požadované délky oligonukleotidových sond (Miller et Tang, 2009). Povrch sklíčka je pokryt hydrofobními polymery (poly-A lysin, aminosilan, epoxysilan), které poskytují reakční skupiny ($-NH_2$, -OH, =O) pro navázání oligonukleotidů. Hlavní výhodou tištěných microarray je jejich flexibilita, což umožňuje získávat aktualizované informace o nových, vznikajících patogenech nebo se využívá v klinické mikrobiologii při studiu mechanismu rezistence (Cleven et al., 2006).

Při metodě *in situ* jsou oligonukleotidy syntetizovány přímo na povrchu mikročipu, který je většinou tvořen křemíkovou destičkou o obsahu 1,2 cm^2 (Miller et Tang, 2009). Oblasti genu pro návrh sond jsou zvoleny tak, aby se co nejméně podobaly ostatním genům. Nejvhodnější jsou oligonukleotidy dlouhé 25 nukleotidů, u nichž se předpokládá, že nahradí všechny ostatní typy sond, které se dosud používají (Knudsen et al., 2006).

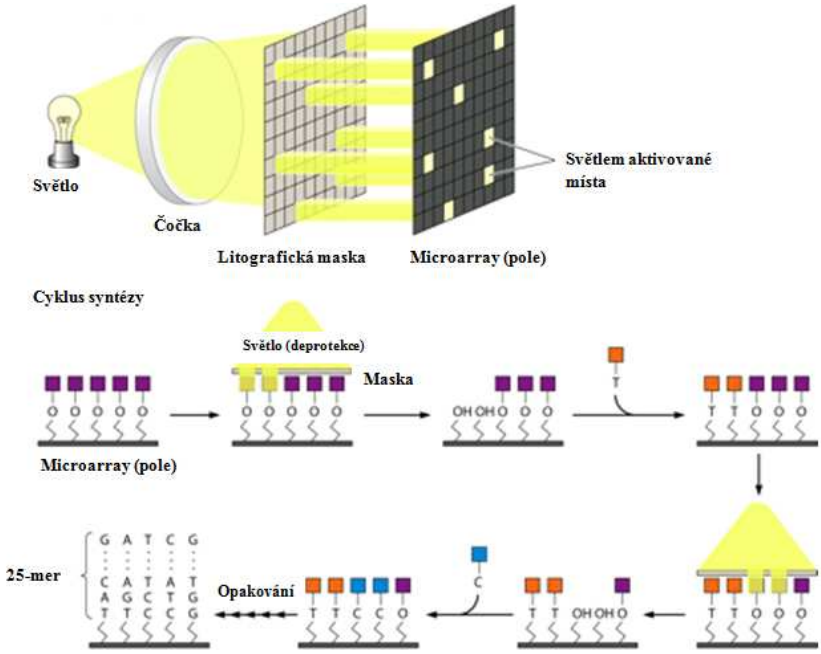
Na rozdíl od předchozích postupů výroby, které spoléhají na pasivní transport vzorku určeného k hybridizaci nukleových kyselin, elektronické čipy využívají aktivní hybridizaci pomocí elektrických polí (Miller et Tang, 2009).

Podle způsobu barvení a zpracování vzorků rozlišujeme dva typy DNA microarrays. U jednobarevné DNA microarray se zkoumaný vzorek obarvuje jedním druhem fluoroforu (př. fykoerytrin, Cy3 nebo Cy5) a následně je vyhodnocován. Výsledkem analýzy je absolutní hodnota jasu každé sondy. Pro srovnání intenzity jednotlivých hodnot, je nutné celý postup zopakovat s kontrolním vzorkem. Značnou výhodou

jednobarevné metody je její jednoduchost a flexibilita. Umožňuje srovnání mezi mikročipy a skupinami vzorků. Potencionální chyby mohou být sníženy provedením testu ve dvou opakováních (Patterson et al., 2006). V případě dvoubarevné DNA microarray jsou dva vzorky (nejčastěji experimentální a kontrolní) označeny různými fluorofory (obvykle Cy3 a Cy5). Vzorky společně hybridizují na jednom čipu a kompetitivně se navazují na přítomné sondy (Oberthuer et al., 2010). Dvoubarevné zpracování umožňuje přímé porovnání vzorků na jednom čipu, což teoreticky vede ke zvýšení citlivosti a přesnosti určování rozdílů v expresi jednotlivých genů. Dvoubarevná metoda se původně vyvinula za účelem snížení chyb, které se spojovaly s variabilitou ve výrobě čipů. V dnešní době se variabilita jednobarevných mikročipů snížila a tím se zlepšily i výsledky (Lu et al., 2008).

2.3.2. Affymetrix GeneChip technologie

Na výrobu čipů Affymetrix se používá fotolitografická metoda, při níž kroky syntézy oligonukleotidů probíhají na základě fotochemické reakce. Ultrafialové světlo prochází maskou, která obsahuje otvory. Jejich velikost a umístění určují, kde na povrchu křemíkové destičky proběhne chemická syntéza sond. Světlo v daných místech odstraní z povrchu ochrannou skupinu. Následně je na čip nanesen určitý typ nukleotidů, který se naváže na odkryté místo. Postup se několikrát opakuje, až dojde k nasyntetizování různých kombinací sond po celém povrchu destičky a ta je pak vložena do plastového obalu (Dalma-Weiszhausz et al., 2006).



Obr. 4. Schéma fotolitografické metody (Miller et Tang, 2009)

Affymetrix GeneChip tvoří několik zcela shodných sond (PM, perfect match) a odpovídající sondy nesouladné (MM, mismatch). Operační systém nám dokáže ukázat, zda je sada sond v daném vzorku přítomná (P), okrajově přítomná (M) nebo nepřítomná (A). PM je komplementární k cílové sekvenci. Odpovídající MM sonda má stejnou sekvenci až na 13. pozici, ve které se liší. Tyto mírné odlišnosti slouží jako negativní kontrola pro identifikaci možných nespecifických cross-hybridizací (Carter et al., 2005). Sondy PM/MM pro konkrétní gen se označují jako sada sond. Obvykle je studovaná molekula mRNA (většinou související s genem) reprezentována sadou sond o 11-20 párech daných oligonukleotidů (Irizarry et al., 2003). Originální detekce pomocí algoritmu stanovuje počet, kolikrát PM intenzita překročila MM intenzitu pro danou sadu sond a průměrný signál log (PM/MM). Dle dat ze softwaru Microarray Suite Affymetrix verze 5 se předpokládá, že MM intenzita sond znázorňuje specifické genové pozadí, což je důležité pro kvantifikaci slabě exprimované mRNA. Algoritmus vyřazuje páry sond, které jsou nasyceny MMs nebo kde PM a MM tvoří páry. Pokud jsou všechny páry sond pro dané sady nasyceny, je P-hodnota rovna 0. Geny v malém množství jsou běžně označeny jako chybějící. Pokud se tedy předpokládá, že se zkoumaný gen vyskytuje ve vzorku v nízké koncentraci, upravují se parametry experimentu pro kvalitativní detekci (Archer et Reese, 2009).

2.3.3. Čip použitý v experimentu

V experimentu se používal celogenomový expresní čip GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array firmy Affymetrix. Byl navržen tak, aby dokázal posoudit genovou expresi v lidských vzorcích (Pradervand et al., 2008). Celkově obsahuje 764 885 samostatných prób dlouhých 25 nukleotidů. Ty pokrývají 28 869 genů. Próby se vyrábějí fotolitografickou metodou. Čip obsahuje dobře charakteristické geny založené na referenční sekvenci (RefSeq) a předpokládané kompletní nekódující sekvence od GenBank. Při hybridizaci se generují duplexy DNA-DNA, které jsou konkrétnější než předešlé duplexy RNA-DNA.

Eukaryotické GeneChip mikročipy obsahují sadu prób pro několik genů z genomu bakterie *Bacillus subtilis*. Vybrané geny se nenacházejí v genomu eukaryotických organismů. Jsou to například geny pro některé aminokyseliny. Jejich próby slouží jako exogenní pozitivní kontrola a monitoruje tak správné značení vzorků v experimentu. Ještě před procesem reverzní transkripce se k nim totiž přidává

polyadenylovaná RNA genů dané bakterie. Kontroly jsou tak amplifikované a značené spolu se vzorkem (www.affymetrix.com).

Obr. 5. GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array firmy Affymetrix (www. affymetrix.com)

2.3.4. Zpracování mikročipových dat

Výsledkem experimentu microarray jsou data bodových intenzit a jejich vzájemné poměry. Získávají se párovým srovnáním nebo porovnáním několika vzorků se společnou kontrolou. Variability ve výsledcích mohou být významné a to hlavně pro geny s nízkou hladinou exprese a replikace, u kterých je potřeba značná spolehlivost údaje (McCall et al., 2011). S daty, které vyhodnotí geny jako nezměněné, musí být zacházeno zvláštním přístupem. Může nastat situace, kdy molekuly DNA nezhybridizují se správným druhovým transkriptem příčinou cross-hybridizace nebo nevhodné sekundární struktury. DNA microarray slouží k ověření podmnožiny výsledků alternativních metod northen hybridizace, real-time PCR nebo RT-PCR. Na základě těchto metod dokážeme odhadnout variabilitu daného experimentálního systému (Schulze et Downward, 2001).

Složitost generovaných dat vyžaduje použití analytického softwaru. Existuje řada softwarových systémů, které se zaměřují na různé aspekty vyhodnocování dat, jako jsou databáze a aplikace pro shlukování a vizualizaci dat z microarray (Lao H Saal et al., 2002).

Výsledná data mohou být ovlivněna signály nebiologického původu vnesených v průběhu experimentu, které modifikují kvalitu a interpretaci dat. Obecně lze nežádoucí vlivy vyloučit biologickým a technologickým opakováním a standardizací. Rozptyl od zdroje lze odhadnout na základě údajů modelování microarrays

využívající metodu analýzy rozptylu (ANOVA – Analysis of variance) (Yin et al., 2008).

Všechny GeneChips jsou do jisté míry ovlivněné prostorově ucelenými vadami. Zpracování obrazu má řadu možných dopadů na následnou datovou analýzu. Existuje řada algoritmů, které identifikují nejzávažnější vady. Jedna ze skupin algoritmů transformuje původní DAT obraz na reprezentativní soubor CEL. Soubor ve formátu DAT představuje fotografii hybridizační plochy čipu. Pokud není jasné, který pixel odpovídá daným próbám, provede se manuální úprava mřížky (grid alignment) pomocí střídající mozaiky tmavých a světlých spotů v každém rohu hybridizačního povrchu (Arteaga-Salas et al., 2007). Po skenování proběhne kontrola kvality. Při ní se kontroluje poškození vzniklé přítomností vzduchových bublin nebo jiných artefaktů. Intenzita fluorescence každé próby je prostřednictvím dostupného nebo komerčního programu převedena na číselné údaje, které ukazují úroveň genové exprese.

Velká rozmanitost výsledných formátů dat vedla ke vzniku Gene Expression Microarray Database Society (MGED) v roce 1999. Roku 2001 MGED vytvořila Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME). MIAME obsahuje protokoly pro vědce k zaznamenání postupů prováděných experimentů microarray z důvodu následné standardizace (Brazma et al., 2009). Hodně dat získaných metodou microarray je nyní uloženo na veřejně přístupných zdrojích jako je např. Gene Expression Omnibus (GEO) v Národním centru pro biotechnologické informace (NCBI). Z GEO si můžeme stáhnout CEL soubory, které jsou označeny čísly GSM, obsahující experimenty značené čísly GSE. Přes schopnost měření většího množství genů se většina publikovaných studií zabývá relativně malým počtem podmínek. Není zcela jasné, jak nejlépe vyhodnotit statisticky významné změny. Dostupnost velkých sbírek GeneChip umožňuje studovat daleko více podmínek, než jsou jednotlivé geny (Barrett et al., 2007).

Při vzájemném pozorování dat získaných z různých experimentů lze identifikovat množství odchylek biologické nebo skryté povahy (Sidorov et al., 2002). Pro srovnání hodnot získaných jednotlivými čipy je nutné odstranit případné nesrovnalosti a chyby normalizací. Normalizace zahrnuje porovnání intenzity čipu vzhledem k standardním hodnotám intenzity.

Extrémní hodnoty vnesené v průběhu experimentu jsou odstraněny logaritmováním (převedením na hodnoty log2). Změna genové exprese je vyjádřená hodnotou fold

change (FC). Hodnota FC nebo její logaritmus se využívá k porovnání exprese genů mezi dvěma skupinami (Gohlman et Talloen, 2009).

Data pocházející z experimentu microarray jsou zobrazena ve dvou hlavních typech. První typ zobrazení využívá několika seskupovacích algoritmů. Clusterová analýza shlukuje geny na základě jejich podobnosti. Výsledkem je skupina (klastr) podobných objektů. Po shlukování se určuje vzájemná podobnost vzorků. Cílem analýzy je sdružit vzorky s malou variabilitou v rámci jednotlivé skupiny a stanovit rozdíly mezi skupinami navzájem. Druhý typ třídí expresní profily vzorků podle biologických znaků (Brentani et al., 2005). Mezi nejrozšířenější metodu patří hierarchické shlukování v grafické podobě „stromů“ tzv. dendrogram. Každá větev zobrazená v určité výšce představuje míru rozdílnosti mezi skupinami, které spojuje. Metoda tzv. heatmap je oblíbený způsob vizualizace dat. Souhrnně zobrazuje velké množství dat v jednom formátu, což usnadňuje detekci skrytých struktur a vztahů v datech (Rajaram et Oono, 2010).

Při metodě „supervised“ se zadávají informace o genech nebo podmínkách, které informují o pre-existující klasifikaci. „Unsupervised“ metody nevyžadují žádné další informace. Tyto metody se zaměřují na objevení vzorů v datech, které nejsou ovlivněny žádnými dalšími okolnostmi (Tajunisha N et Saravanan V, 2011).

2.4. Využití mikročipu v genové analýze ALL

Mnoho leukemických podtypů lze diagnostikovat pomocí charakteristických vzorů genové exprese. Využití microarray v klinické praxi je značně pomalé, i přes veškeré pokroky vycházející ze stále nových poznatků.

Podle běžně klinicky používaných prognostických faktorů onemocnění nelze přesně predikovat jeho vývoj a jeho odpověď na léčbu (Iacobucci et al., 2010). Metoda microarray je klinicky důležitá pro přesnější diagnózu, prognózu, včasné odhalení progrese onemocnění, identifikaci příslušného genu a návrhy nových terapeutických strategií (Pitta et al., 2005).

Analýza genomů pomocí SNP-array ukázala, že ze 75 vzorků ALL u dospělých se v 92 % vyskytuje jedna a více genomových abnormalit. SNP-array díky své senzitivitě identifikuje změny i v jinak cytogeneticky normálně hodnocených vzorcích. Studie Okamoto et al. objevila nejčastější abnormality na chromozomu 9. CNN-LOH (copy number neutral loss of heterozygosity) na 9q se často nacházely u dětské i dospělé ALL. Vysoký výskyt CNN-LOH abnormality ukazuje, že tato oblast zahrnuje pravděpodobně tumor supresorový gen (TSG) nebo onkogen se ztrátou své normální alely. Ve vzorcích byly prokázány opakující se regiony CNN-LOH, které obsahují geny kódující tyrosin kinázu. U dětské ALL se často vyskytuje delece CDKN2A na 9q CNN-LOH (23 případů z 30, tj. 77 %). Gen PAX5, který je důležitý pro vývoj B-buněk, se rovněž nachází na chromozomu 9q. CNN-LOH a dysfunkce CDKN2A/B, PTPRD a PAX5 na chromozomu 9q se tedy mohou podílet na vývoji ALL. Méně časté delece byly nalezeny na chromozomu 6q, které zahrnovaly FOXO3 gen nebo na chromozomu 12 obsahující gen BTG1. Úroveň exprese FOXO3 byla výrazně nižší u testovaných vzorků ALL než u kontrolních vzorků. Mutace genů sousedící s genem FOXO3, a to ARMC2 a SESN1, se mohou objevovat v relabující případech dětské ALL (Okamoto et al., 2010).

PAX5 je součástí rodiny transkripčních faktorů, jehož exprese je specifická pro určité fáze B-buněčné diferenciace. Delece PAX5 se často vyskytují u dospělé BCR-ABL1-pozitivní ALL a jsou často spojeny se ztrátou IKZF1. Detailnější pochopení úlohy těchto genů v BCR-ABL1-pozitivní ALL, mohou vést k cílenější terapii (Iacobucci et al., 2010). Faktor Ikaros má také zásadní význam v krvetvorbě. Ztráta funkce IKZF1 se spojuje s agresivním typem B-ALL a se špatnou prognózou pokud jde o celkové přežití a četnost recidivy. IKZF1 mutace převládají u ALL

s aktivní JAK/STAT signalizaci, což předpokládá, že Ikaros může potlačit činnost této dráhy (Kastner et al., 2013).

Při nálezu mutačního stavu JAK a deleci IKZF1 byly zároveň pozorovány změny v genové expresi CRLF2 (cytokine receptor-like faktor 2) také nazýván jako TSLPR (thymic stromal lymphopoietin receptor). Zvýšená exprese CRLF2 vede ke zvýšenému přežití a množení B-lymfoidních buněk (Harvey et al., 2010).

Translokace BCR-ABL je obvykle spojena s B-fenotypem ALL, zatímco s T-linii ALL jen vzácně. V T-ALL se vyskytuje vzácný fúzní přepis e6-a2 BCR-ABL a dále také přestavby zahrnující ABL1 gen a to NUP214-ABL1 a EML1-ABL1. Studie Chiaretti et al. identifikovala nové mechanismy transformace u dospělé T-ALL. Přestavba NUP214-ABL1 pochází z formování epizomů, které vedou k fúzi NUP214 a ABL1 na chromozomu 9q34. Transformace EML-ABL1 je generována t(9;14)(q34;q32). V experimentu bylo ze 128 vzorků identifikováno 33 s T-ALL a u tří případů byla prokázána vysoká úroveň ABL1 stejná jako v B-linii a v jednom případě byl stupeň amplifikace ABL1 vyšší než hodnota uváděná u BCR/ABL+ B-linii ALL. První tři případy ukázaly značnou podobnost mezi sebou s charakteristickou vysokou expresi souboru genů, které jsou zapojeny do replikace DNA a přestaveb chromatinu (TOPBP1, RFC4, REV3L), regulace transkripce (BAF53, EZH2, ATRX) a v menší míře DNA oprav. Tyto případy mají špatnou prognózu a odpověď na chemoterapii (Chiaretti et al., 2007).

Další experiment stanovil zvýšenou plazmatickou expresi IL-8 u pacientů s T-ALL, kteří špatně odpovídali na léčbu. Porucha exprese nebo funkce TTK může přispívat k agresivnějšímu fenotypu T-ALL. Zvýšená exprese AHNAK genu předpovídá delší dobu remise. Kombinací upregulace genové exprese AHNAK a downregulace TTK se může u T-ALL dosáhnout udržení relativně klidového stavu s následnou odolností vůči intenzivní kombinované chemoterapii. Vysoká exprese antigenu CD2 předpovídá lepší výsledky léčby u dětských pacientů s T-ALL (Chiaretti et al., 2004).

Nejméně příznivý pediatrický typ ALL zahrnuje translokaci smíšeného lineárního leukemického genu (MLL) a nejčastěji se vyskytuje u kojenců. Microarray ukázaly, že ALL s translokací tohoto genu mají velmi charakteristický a výrazný profil genové exprese, avšak tyto podtypy jsou spojeny se špatnými klinickými výsledky. Nejvíce se u dětské ALL vyskytují translokace MLL t (4;11), t(11;19) a t(9;11), což vede k syntéze proteinů MLL-AF4, MLL-ENL a MLL-AF9. Při vyskytující se t(4;11) se následně mohou rozlišit dvě skupiny, které se liší ve výskytu relapsu.

Skupiny se dělí podle exprese genů HOXA9, HOXA7, HOXA10, HOXA5 a HOXA3. Absence skupiny HOXA genů je u pacientů spojena s vysokým rizikem relapsu a špatnou prognózou. Exprese HOXA9 chybí u pacientů s agresivním typem leukemie a s vysokým rizikem časného relapsu (Stam et al., 2009).

Ve studii Holleman et al. se zabývali souvislostí mezi genovou expresí a rezistenci vůči vybraným léčivům. U pacientů s rezistencí k prednisolonu byla zvýšená exprese genu MCL1 a snížená exprese několika genů, které jsou zapojeny v transkripci např. SMARCB1, PRPF18 a CTCF. Genový profil pacientů s rezistencí vůči asparagináze má zvýšenou expresi několika ribozomálních proteinových genů (např. RPL3, RPL4, RPL5, RPL6 a RPL11). ALL s rezistencí vůči vinsristinu je charakteristická změnou exprese genů cytoskeletu a extracelulárního matrix (např. TMSB10, PDLIM1 a DSC3) (Holleman et al., 2004).

Další biomarker, který může sloužit k cílenější terapii, je transkripční faktor regulační glykolýzy MondoA (MLXIP). Jeho zvýšená exprese podporuje katabolismus glukózy, což umožňuje delší dobu přežití leukemických buněk (Wernicke et al., 2012).

U pacientů s recidivou ALL je často zvýšená exprese genu BAX, který zaujímá významnou roli v apoptóze, cyklinu D1, amplifikace genu DHFR (dihydrofolate reductase) a delece INK4A/ARF a TEL oblasti chromozomu. Relaps u dětí s ALL se často spojuje s poklesem poměru BAX/BCL-2 a ztrátou kaspázy 3 (Szczepanek et al., 2010).

3. Cíl práce

1. Provést rešerši na dané téma, zorientovat se v problematice profilování genové exprese u pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií, získat teoretické a praktické znalosti technologie DNA microarrays, naučit se pracovat s patřičnými databázemi a softwarem.

2. Izolovat RNA z krve, vyzkoušet si práci s platformou Affymetrix.

3. Stanovit profily genové exprese u pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií.

4. Materiál a metodika

4.1. Izolace RNA

Pro metodu profilování genové exprese pomocí mikročipů je nutné pracovat s izolovanou RNA o vysoké čistotě a kvalitě.

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. V horní vodné fázi je obsažena RNA, interfáze obsahuje DNA a spodní organická fáze obsahuje 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.

4.1.1. Materiál a reagencie

TRI reagent (Molecular Research Center), RiboPure Kit (Ambion), isopropanol (Sigma), chloroform a ethanol (Serva), DEPC (diethylpyrocarbonate) Treated Water (Ambion), 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, 200µl, 10µl automatické pipety (Eppendorf)

4.1.3. Příprava roztoků

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

4.1.4. Postup

Leukocyty pro izolaci RNA byly získány z periferní krve v počtu 10 miliónů osmotickou lýzou a následně byly lyzovány v 1ml TRI reagentu.

Separace fází

1. Vzorky TRI lyzátu v 1,7ml zkumavkách bylo rozmraženy na ledu cca 15 minut. Pro proběhnutí disociace nukleoproteinu byly zkumavky se vzorky ponechány 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo do zkumavky přidáno 200 µl chroloformu a silně zvortexovány cca 30 sekund. Vzorky byly nechány stát 10 minut při pokojové teplotě.
2. Vzorky byly zcenrifugovány 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.

Precipitace RNA

4. Ke vzorku bylo přidáno stejné množství isopropanolu, jaké bylo odepráno v předešlém kroku, tedy 400-500 µl. 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 a teplotě 4 °C.

Rozpuštění RNA

8. Supernatant byl odstraněn a peletka RNA byla usušena na vzduchu ve flow-boxu dokud nedošlu k jejímu zprůhlednění (3-10 minut).
9. K RNA peletě bylo přidáno 25 µl DEPC treated vody.
10. Koncentrace a čistota RNA byla změřena na Nanodrop ND 1000.
11. RNA byla uchována při teplotě -70 °C až -80 °C.

4.2. Měření koncentrace a čistoty RNA spektrofotometricky

Po izolaci RNA byla koncentrace měřená spektrofotometricky přístrojem NanoDrop ND 1000 UV-VIS Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmignton, DE, USA). Z každého vzorku total RNA byl použit 1 µl. Jako standard byla použita DEPC treated voda. Koncentrace RNA byla měřena při vlnové délce 260 nm a byla uvedena v jednotkách ng/µl. Aby mohlo dojít k ověření čistoty, byla přístrojem změřena také vlnová délka při 230 a 280 nm. Čistota RNA byla hodnocena dle poměrů absorbancí 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. 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

Pro profilování genové exprese je nutno použít intaktní RNA o vysoké kvalitě. K ověření její kvality slouží RNA Nano LabChip firmy Agilent. 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 přirazena 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 reagencie

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

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

Postup 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 minimálně 10 sekund. Po vyjmutí první čističe elektrod byl postup opakován s druhým naplněným RNase free vodou.

Příprava ladderu

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

Příprava vzorků

1. 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 na 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 a při laboratorní teplotě.
3. Přefiltrovaný gel byl rozdělen po 65 µl do RNase-free 0,5ml mikrozkumavek.

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 zvortexován 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 položen do přípravné stanice.

2. Do jamky označené symbolem G v černém kruhu bylo napipetováno 9 µl gel-dye mix.
3. Píst byl nastaven v poloze 1 ml, přípravná stanice byla uzavřená tlakem na píst, až byl přichycen úchytkou. Po 30 sekundách byla úchytka uvolněna.
4. Po 5 sekundách byl píst pomalu vytáhnut do pozice 1 ml.
5. Přípravná stanice byla otevřena. Do jamek označených symbolem G bylo pipetováno 9 µl směsi gel-barva.

Plnění Agilent RNA 6000 Nano Marker

1. Agilent RNA 6000 Nano Marker byl pipetován po 5 µl 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 µl předem připraveného ladderu.
2. Do každé z 12 jamek určených pro vzorky byl napipetován 1 µl RNA. Do každé jamky určené pro RNA, která nebyla využita, byl napipetován 1 µl 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)

Po ověření kvality izolované RNA na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer byla tato RNA použita na 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. Pak 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 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, které se vázaly na biotin. Následně proběhlo skenování fluorescenčních signálů a nakonec analýza obrazu (www.affymetrix.com).

Analýza profilů genové exprese byla provedena podle třídenního 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 µl Poly-A RNA Control Stock byly přidány do 38 µl Poly-A control Dil Buffer. Roztok byl promíchán a krátce centrifugován.
2. Bylo provedeno druhé ředění v poměru 1:50, kdy 2 µl roztoku, který vznikl v prvním kroku, byly přidány do 98 µl Poly-A Dil Buffer. Roztok byl promíchán a krátce centrifugován.
3. Pro třetí ředění v poměru 1:25 byly 2 µl druhého ředění přidány do 48 µl Poly-A Control Dil Buffer. Roztok byl promíchán a krátce centrifugován.
4. Ke 2 µl roztoku ze třetího ředění Poly-A RNA kontrol bylo přidáno 18 µl Poly-A Control Dil Buffer (1:10). Roztok byl promíchán a krátce centrifugován.
5. Ke 2 µl 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 µl smícháním 4 µl First-Strand Buffer Mix a 1 µl First-Strand Enzyme Mix. Roztok byl krátce zvortexován a centrifugován.
2. Do každé zkumavky s 5 µl First-Strand Master Mix bylo přidáno 5 µl 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 µl Nuclease-free vody
    - 12,5 µ Second-Strand Buffer Mix
    - 5 µl 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 termycykléru 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 přikryta ochrannou fólii 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 Slution, opět byla destička překrytá 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 µl Nucleic Acid Wash Solution a celý postup byl znova opakován.
5. Destička byla položena na třepačku a při vysoké rychlosti (12 000 g) byla třepána 1 minutu bez ochranné fólie.
6. Přečištěná cRNA byla eluována s 40 µl Elution Solution zahřatého na teplotu 55 °C. Po 2 minutách po přidáno 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 přenesena 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/µl, což odpovídalo 10 ng cRNA v objemu 22 µl.

4.4.6. Syntéza druhého vlákna cDNA

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

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

Po krátkém zvortexování a centrifugování bylo 16 µl 2nd-Cycle Master Mix přidáno ke směsi 24 µl 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 µl 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 µl Nucleic Acid Binding Beads
   - 50 µl Nucleic Acid Binding Buffer Concentrate.

   Roztok 60 µl cDNA byl společně s 18 µl nuklease-free vodou přidán ke každému vzorku. Jednotlivé směsi byly přeneseny na destičku s jamkami ve tvaru U.
2. Ke směsi bylo přidáno 120 µl 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 µl Nucleic Acid Wash Solution stejně jako u kroku purifikace cRNA.
5. Přečištěná cDNA byla eluována 30 µl 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 µl bylo 5,5 µg.

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

   Fragmentační Master Mix byl přidán ke vzorku ssDNA, následně byl krátce vortexován a centrifugován a inkubován 60 minut při teplotě 37 °C, 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 µl fragmentované ssDNA získané v předešlém kroky bylo přidáno:
   - 12 µl 5x TdT Buffer
   - 2 µl TdT
   - 1 µl 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 µl fragmentované značené DNA
   - 1,7 µl Control Oligonucleotide B2
   - 5 µl 20x Eukaryotic Hybridization Controls
   - 50 µl 2x Hybridization Mix

- 7 µl DMSO
- doplnění na objem 100 µl Nuclease-free vodou.

Hybridizační směs byla po krátkém zvortexování a centrifugování inkubována po dobu 5 minut při teplotě 99 °C, pak byl ochlazen na teplotu 45 °C a inkubován 5 minut. Nakonec byl centrifugován 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 µl 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 jednotlivým próbám a jejich zbarvení míře hybridizace.

5. Výsledky

5.1. Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena z buněčných lyzátů získaných z periferní krve. Pro izolaci byla použita fenol-chloroformová metoda (postup viz kapitola 4.1.). Pro stanovení čistoty byl zjišťován pouze poměr absorbancí A260/A280.

Tabulka č.1: Výsledky izolace RNA změřeny na přístroji NanoDrop ND 1000 UV-VIS Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA)

Vzorek	Koncentrace vzorku [µl/ml]	260/280
1	229,28	1,70
2	137,93	1,67
3	150,45	1,78
4	338,63	2,07
5	156,45	1,75
6	131,22	1,65
7	97,29	1,82
8	147,68	1,79
9	162,68	1,62
10	161,70	1,89
11	171,83	1,76
12	189,47	1,69
13	289,59	2,05
14	274,87	1,87
15	226,28	2,15
16	153,16	1,78
17	229,46	2,23
18	393,81	1,92
19	266,62	1,68
20	211,60	1,57
21	227,18	1,80
22	288,62	1,94
23	209,90	1,65
24	146,53	1,70
25	94,00	1,76
26	114,71	1,83
27	137,12	1,96

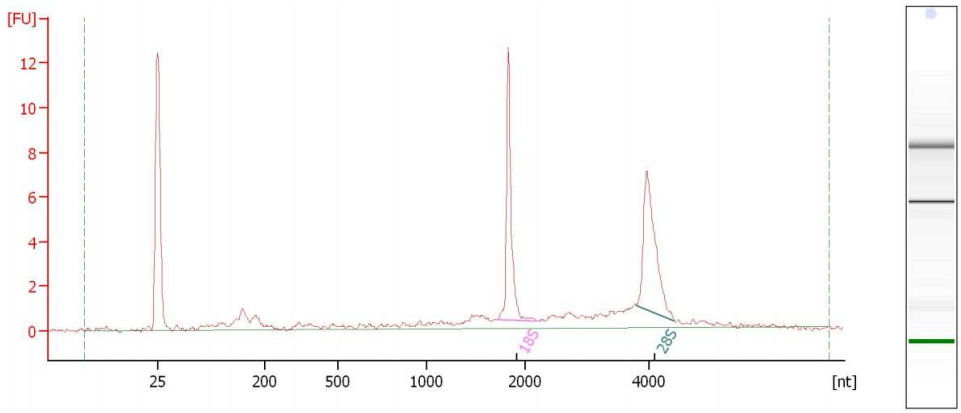
28	158,54	1,59
29	213,46	1,70
30	179,31	1,96
31	241,40	1,94
32	152,92	1,75
33	130,97	1,66
34	149,23	1,70
35	125,45	1,84
36	157,14	1,68
37	110,40	1,57
38	198,45	1,81
39	201,29	1,91
40	172,14	1,79
41	115,95	1,65
42	122,31	1,76
43	125,31	1,73
44	101,35	1,76
Trizol	378,79	1,95

Průměrná koncentrace: $\overline{c} = \Sigma(c1\text{-}c44)/44 = 147{,}75$ µl/ml

Průměrná čistota: $\overline{A260/A280} = \Sigma[(A260/A280)1\text{-} (A260/A280)44]/44 = 1{,}77$

5.2. Kontrola kvality přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer

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



Obr. 6. Ukázka elektroforetogramu RNA, ve kterém je na ose x zaznamenána délka fragmentu a na ose y intenzita fluorescence. V oblasti 25 nukleotidů se nachází pík RNA markeru, v oblasti 1900 nukleotidů podjednotka 18S rRNA a v oblasti 4000 nukleotidů 28S rRNA. Hodnota RIN tohoto vzorku byla 8,6.

Tabulka č. 2. Hodnoty RIN analyzovaných vzorků

Vzorek	RIN
1	9,1
2	9,6
3	9,4
4	7,9
5	9,2
6	9,5
7	8,9
8	6,1
9	8,1
10	9,9
11	10,0
12	10,00
13	9,8
14	9,6
15	7,2
16	7,4
17	10,0
18	9,8
19	9,4
20	9,8
21	8,4
22	7,6
23	7,8
24	8,6
25	8,2
26	8,9
27	8,7
28	8,7
29	8,6
30	8,9
31	8,5
32	8,5
33	9,7
34	8,5
35	9,6

36	9,8
37	9,2
38	8,9
39	9,3
40	8,1
41	9,4
42	9,8
43	8,3
44	8,0

Průměrná RIN hodnota: $\overline{RIN} = \Sigma(RIN1\text{-}RIN44)/44 = 8,84$

5.3. Human Exon 1.0 ST Array

DNA microarray analýza byla provedena použitím Human Exon 1.0 ST Array firmy Affymetrix. Pro analýzu byly použity vzorky vyizolované RNA z lymfoblastů kostní dřeně po 6-hodinové *in vitro* inkubaci s glukokortikoidy (kontrola, prednisolon, dexamethason, prednisolon + dexamethason). U 11 pacientů (6 PGR (prednisone good response) a 5 PPR (poor prednisone response)) byly provedeny microarray ve čtyřech opakování, celkem tedy proběhlo 44 microarray analýz. Ve skupině pacientů se nacházelo 6 mužů a 5 žen ve věku 1,8 – 17,8 let (průměrný věk 8,2 let). Imunofenotyp BCP-ALL byl diagnostikován v 7 případech, proB-ALL a T-ALL ve dvou případech.

Průměrná koncentrace vyizolované RNA byla 147,75 µl/ml a průměrná kvalita vyjádřena hodnotou RIN byla 8,84.

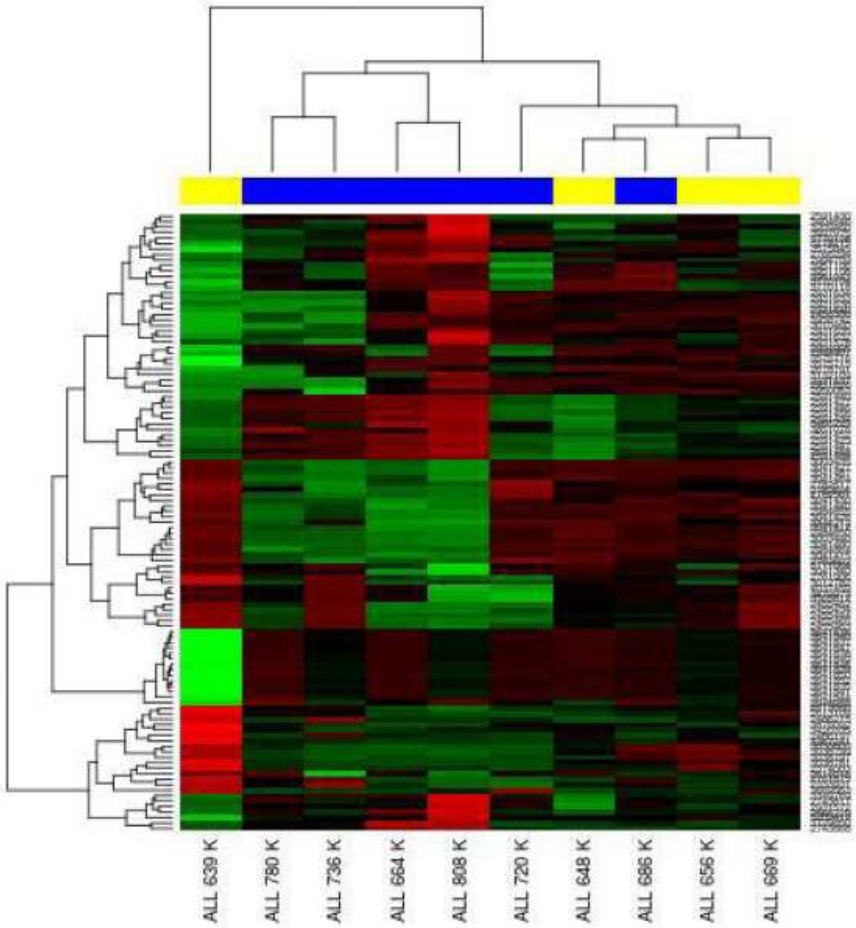
Před samotným zpracováním dat byla ověřena jejich kvalita. Intenzity signálu všech setů prób a jejich maximální a minimální hodnoty byly porovnány krabicovými grafy. Na těchto diagramech byla provedena normalizace, aby se odhalily redundantní položky a byly vyřazeny z dalších analýz. Kontrola kvality byla provedena na Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC). Program umožňuje sdílení dat CEL generovaných souborů. Pět naskenovaných čipů muselo být z důvodu špatné kvality vyřazeno z následujících statistických analýz.

Analýza hlavních komponent (PCA) byla vykonána programem Partek. Tento matematický postup převádí pozorovaná data do souboru hodnot lineárně nekolerovaných proměnných. Takto zobrazená dala vizualizují podobnosti

a odlehlosti ve zkoumaném souboru dat. Naučila jsem se pracovat v prostředí programu AGCC a Partek.

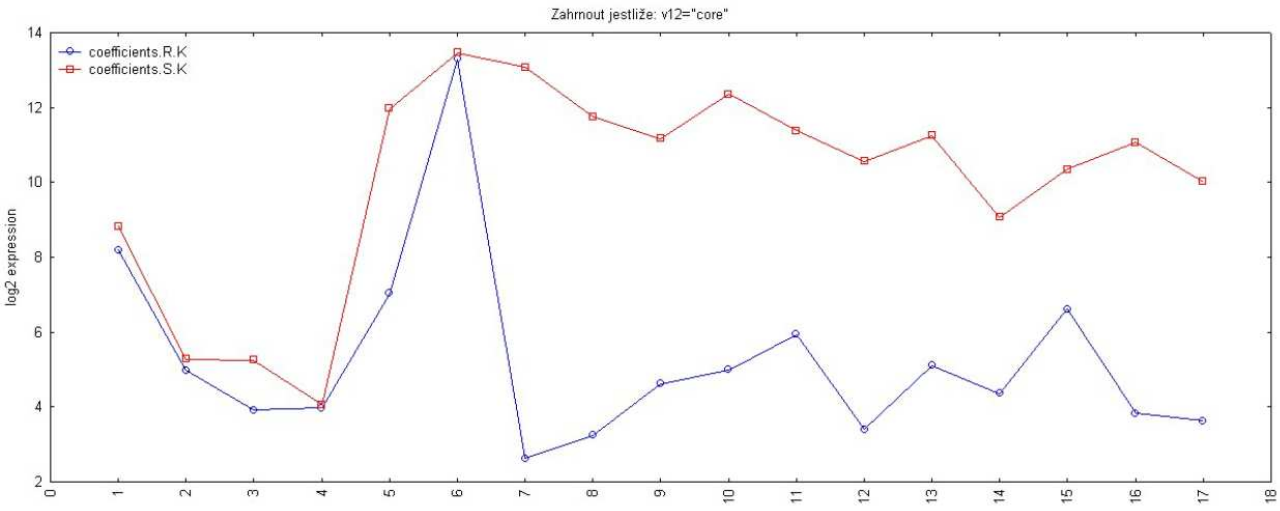
Ke zpracování a vyhodnocení dat z microarray byl použit software R/Bioconductor a jeho přídavnými balíky Heatplus (vizualizace skupin významně odlišných genů), oligo (pracuje s CDF soubory, které popisují rozložení čipu) a limma (nalezení nejvýznamnějších exonů/genů v jednotlivých sledovaných skupinách). Tato data byla zpracována biostatistikem ve Statistice. Jedná se o pilotní nepublikovaná data, které byly přizpůsobeny na skupinu pacientů. Heatmapy proto nejsou zcela jasné, na jejich dalších úpravách se pracuje.

Na základě RNA získané z lymfoblastů před zahájením léčby (0. den) prednisonem byl identifikován profil genové exprese, který se lišil v expresi 557 genů umožňujících predikci léčebné odpovědi na glukokortikoidy. PGR a PPR mají odlišné profily genové exprese. V případě porovnání profilů genové exprese v závislosti na procentuálním poklesu počtu blastů v periferní krvi 0. a 8. dne bylo identifikováno 113 rozdílně exprimovaných genů.

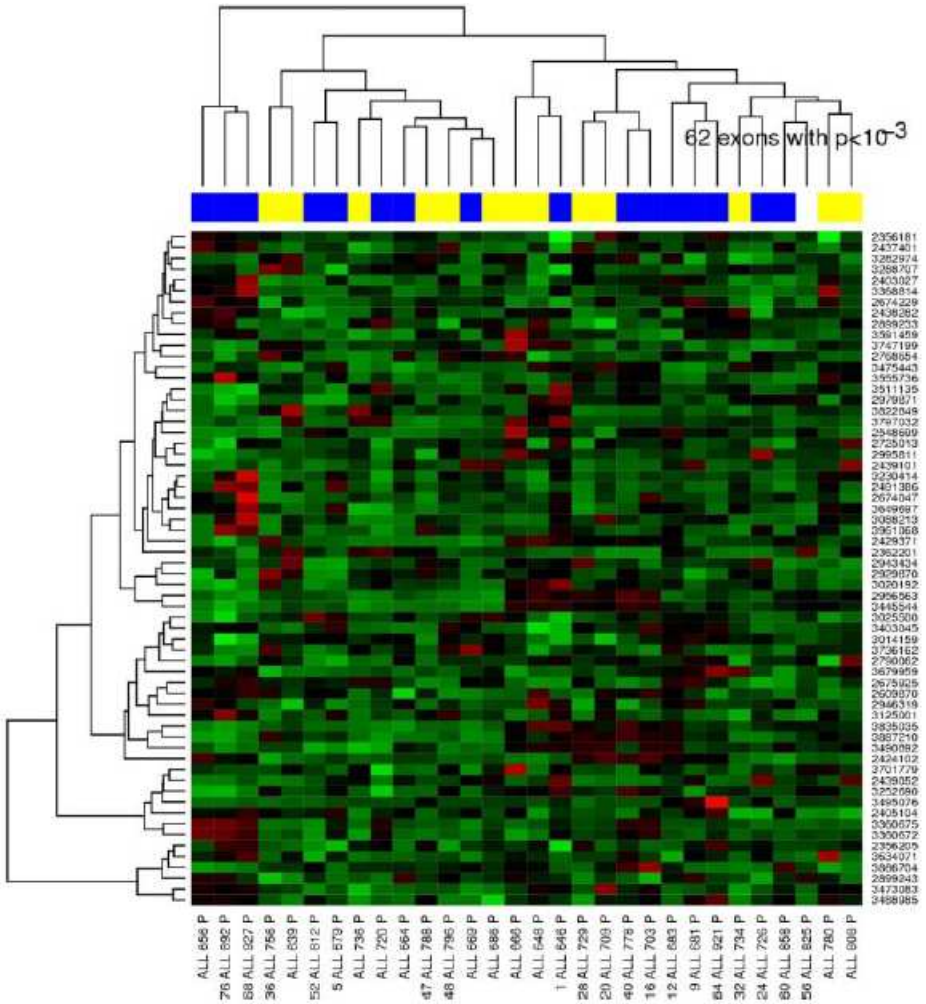


Obr. 10. Supervised clustering analysis. Rozdílné profily genové exprese 113 genů mezi pacienty s více než 95 % poklesem lymfoblastů po prednisonové předfázi (žlutá) a pacienty s menším poklesem (modrá). Podmínky statistické analýzy <0,00000000001; logFC <-2 nebo > 2.

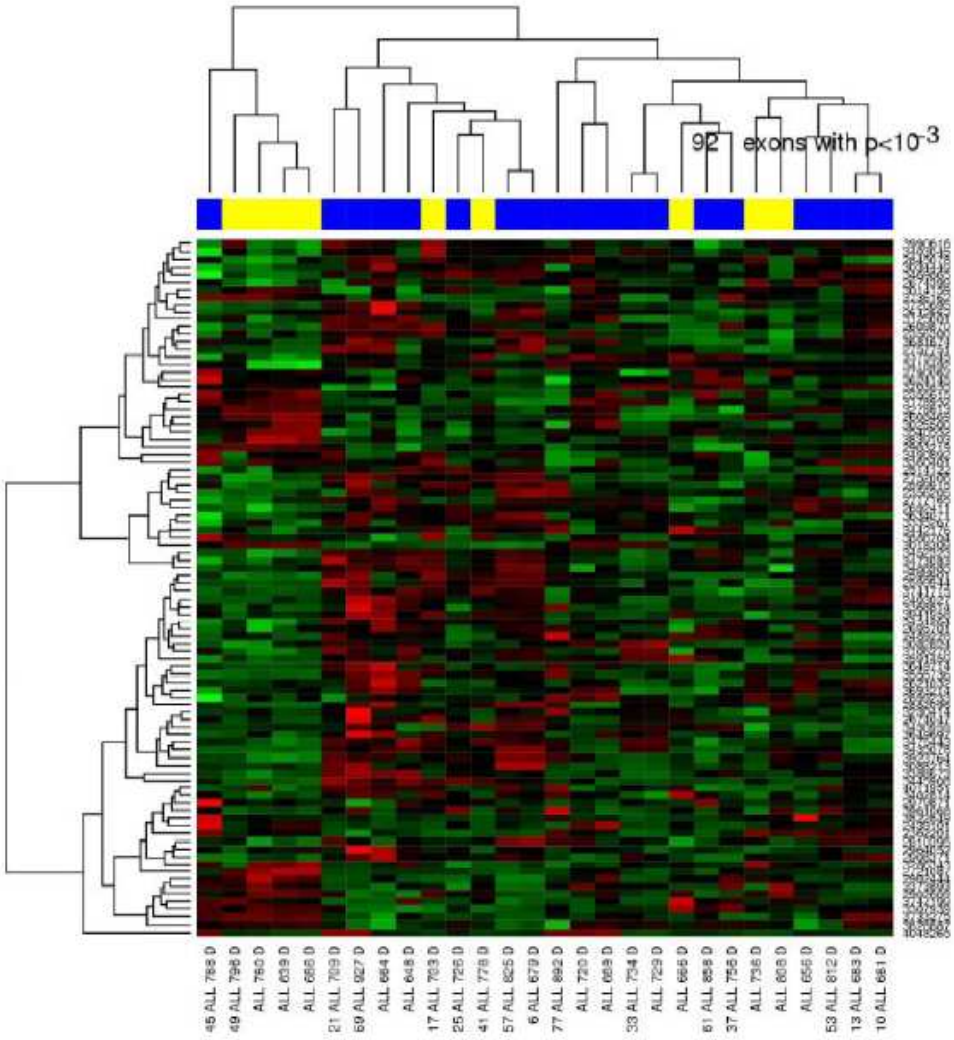
Na základě statistické analýzy byla dále zjištěna exprese dvou variant splicingových genů PBX1 (pre-B-cell leukemia homebox 1) mezi PPR a PGR pacienty. Jedná se o expresi exonu 7-17 u prednosilon sensitivních pacientů.



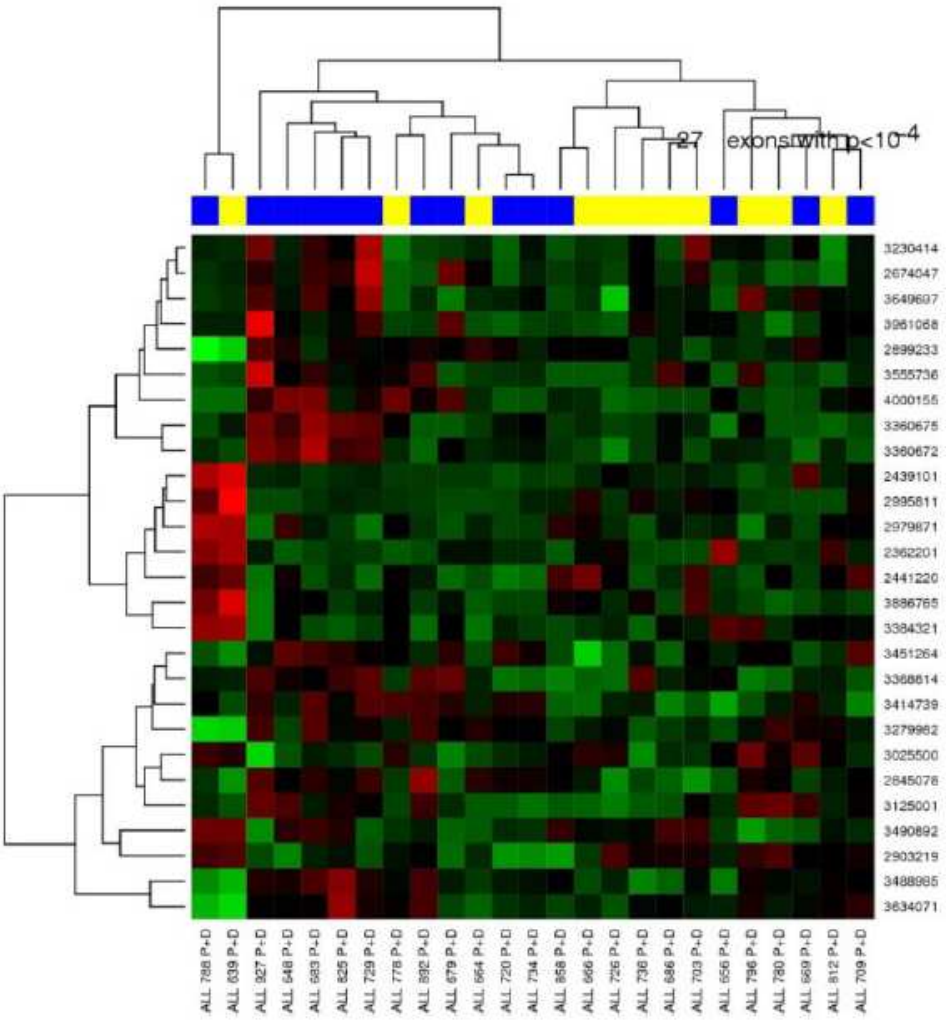
Obr. 11. Rozdílná exprese exonů 7-17 v genu PBX1.



Obr. 12. Supervised clustering analysis. Rozdílné profily genové exprese 62 genů v lymfoblastech 0. den mezi pacienty *in vitro* rezistentními (žlutá) a senzitivními (modrá) na prednisolon. Podmínky statistické analýzy <0,001; logFC <-2 nebo > 2.



Obr. 13. Supervised clustering analysis. Rozdílné profily genové exprese 92 genů v lymfoblastech 0. den mezi pacienty *in vitro* rezistentními (žlutá) a senzitivními (modrá) na dexamethason. Podmínky statistické analýzy <0,001; logFC <-2 nebo >2.



Obr. 14. Supervised clustering analysis. Rozdílné profily genové exprese 27 genů v lymfoblastech 0. den mezi pacienty *in vitro* rezistentními (žlutá) a senzitivními (modrá) na prednisolon/dexamethason. Podmínky statistické analýzy <0,0001; logFC <-2 nebo > 2.

6. Diskuze

Poměr absorbancí A260/A280 u vyizolované RNA byla nejnižší u vzorku č. 20 a to 1,57. Nejvyšší poměr byl pak u vzorku č. 17 a to 2,23. U vyššího poměru absorbancí, než je hodnota 2 mohlo dojít během provedení experimentu k znečištění RNA proteiny. Výsledná koncentrace RNA by se měla pohybovat v rozmezí 200 – 1000 ng/µl. Koncentrace většiny vzorků byla nižší než 200 ng/µl. Koncentrace získané celkové RNA byly dostatečné pro microarray analýzy.

Výsledné RIN hodnoty kontroly kvality RNA byly u všech vzorků dostatečně vysoké. U intaktní total RNA převažuje 28S rRNA v poměru k 18S rRNA přibližně 2:1. Snížení tohoto poměru svědčí o degradaci. U vzorků z experimentu nebyla prokázána vyšší míra degradace, všechny vzorky byly použity v následné microarray analýze.

Senzitivita a rezistence nádorových buněk ALL u dětských pacientů je rozdílná. Účinky léčiv závisí na řadě farmakokinetických a farmakogenetických faktorů, které určují výsledný terapeutický efekt. Účinnost ovlivňuje i řada biologických vlastností organismů. Ve skupině dětí s ALL je stále asi 10 % pacientů, kteří neodpovídají na iniciální terapii. Cílem současných studií je podávat pacientům účinnou terapii za minimálních nežádoucích účinků agresivní cytotoxické léčby.

Specifická rezistence na terapii glukokortikoidy může být způsobena sníženou permeabilitou buněčné membrány, abnormálním glukokortikoidním receptorem, který má sníženou kapacitu vázat glukokortikoidy (GK), sníženým výskytem glukokortikoidních receptorů (GR) v cytoplazmě, mutací ve vazebných oblastech pro GR-GK komplex.

Podle profilů genové exprese z DNA microarray analýzy lze predikovat odpověď dětských pacientů s ALL na léčbu glukokortikoidy. Geny, u kterých jsou stanoveny značné rozdíly v expresi mezi chemosenzitivními a chemorezistentními pacienty, mohou být využity v rutinní diagnostice k určení cílenější terapie. Jejich identifikace může být dále prováděna běžnými molekulárně biologickými metodami, jako například PCR.

V analýze byly identifikovány různé splicingové varianty genu PBX1. Exprese krátké varianty tohoto genu byla nalezena u pacientů rezistentních na terapii

prednisolonem. Gen PBX1 kóduje jaderný protein patřící do homeoboxové rodiny PBX. Nachází se na 1q23.3. Je součástí přestavby chromozomů t(1;19)(q23,p13), kde je společně s PBX1 zahrnut i gen E2A.

Vysoká variabilita odpovědi ALL na glukokortikoidy ve studii ukázala, že léčba prednisonem nebo dexamethasonem by měla být stanovena na základě prediktivních markerů. Byla zjištěna i potenciální léčba, ve které dochází ke kombinaci prednisolonu s velmi nízkou dávkou dexamethasonu, jež zesiluje antileukemický účinek. Avšak tato potenciální léčba vyžaduje další klinické studie.

7. Závěr

V teoretické části byla vypracována literární rešerše zabývající se současnou problematikou akutní lymfoblastické leukemie a následně metody profilování genové exprese. Dále byly ukázány možnosti využití techniky DNA microarray ve stanovení prognózy a léčby ALL.

V experimentální části byla provedena izolace RNA z kostní dřeně a také byla stanovena kvalita total RNA.

Profily genové exprese byly stanoveny u dětských pacientů s ALL. Koncentrace i kvalita izolované RNA byly dostatečné. Ve studii byl identifikován různé varianty genu PBX1, jehož exprese se lišila ve skupinách PPR a PGR.

Profilování genové exprese by mělo pomoci stanovit markery, které by určily cílenější terapii s menšími vedlejšími účinky.

8. Literatura

Archer, K. J., Reese, S. E. (2010): Detection call algorithms for high-throughput gene expression microarray data. Briefings in Bioinformatics 11: 244–252

Arteaha-Salas, J.M., Zuzan, H., Langdon, W.B., Upton, G.J.G., Harrison, A.P. (2007): An overview of image-processing methods for Affymetrix GeneChips. Briefings in Bioinformatics 9: 25-33

Bacher, U., Haferlach, C., Schnittger, S., Kohlmann, A., Kern, W., Haferlach, T. (2010): Mutations of the TET2 and CBL genes: novel molecular markers in myeloid malignancies. Annals of Hematology 89: 643-652

Barret, T., Troup, D. B., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Rudney, D., Evangelista, C., Kim, I. F., Soboleva, A., Tomashevsky, M., Edgar, R. (2007): NCBI GEO: mining ten sof millions of expression profiles – database and tools update. Nucleic Acids Research 35: 760-765

Bernardini, L., Alesi, V., Loddo, S., Novelli, A., Bottillo, I., Battaglia, A., Digilio, M. C., Zampino, G., Ertel, A., Fortina, P., Surrey, S., Dallapiccola, B. (2009): High-resolution SNP array in mental retardation diagnostics: how much do we gain? European Journal of Human Genetics 18: 178-185

Bilitewski, U. (2009): DNA microarrays: an introduction to the technology. Methods in Molecular Biology 509: 1-14

Brazma, A. (2009): Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME)--successes, failures, challenges. TheScientificWorldJournal 9: 420–423

Brentani, R.R., Carraro, D.M., Verjovski-Almeida, S., Reis, E.M., Neves, E.J., de Souza, S.J., Carvalho, A.F., Brentani, H., Reis, L.F.L. (2005): Gene expression arrays in cancer reseaech: methods and applications. Critical Reviews in Oncology/Hematology 54: 95-105

Cahan, P., Rovegno, F., Mooney, D., Newman, J.C., G.S.L. III, McCaffrey, T.A. (2007): Meta-analysis of microarray results: challenges, opportunities, and recommendations for standardization. Gene 401: 12–18.

Cleven, B. E. E., Palka-Santini, M., Gielen, J., Meebor, S., Kronke, M., Krut, O. (2006): Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. Journal of Clinical Microbiology 44: 2389-2397

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

Croning, M.DR, Fricker, D.G., Komiyama, N.H., Grant, S.GN (2010): Automated design of genomic Southern blot probes. BMC Genomics 11: 74

Dalma-Weiszhausz D. D., Warrington, J., Tanimoto, E. Y., Miyada, C. G. (2006): The Affymetrix GeneChip® platform: an overview. Methods in Enzymology 410: 3-28

De Pittà, Ch., Tombolan, L., Dell´Orto, M.C., Accordi, B., te Kronnie, G., Romualdi, Ch., Vitulo, N., Basso, G., Lanfranchi, G. (2005): A leukemia-enriched cDNA microarray platform identifies new transcripts with relevance to the biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 90: 890-898

Dunning, M.J., Smith, M.L., Ritchie, M.E., Tavaré, S. (2007): Beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. Bioinformatics 23: 2183-2184

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: 944-950

Henrickson, S. E., Hartmann, E. M., Ott, G., Rosenwald, A. (2007): Gene expression profiling in malignit lymphomas. Advances in Experimental Medicine and Biology 593: 134-146

Holleman, A., Cheok, M. H., den Boer, M. L., Yang, W., Veerman, A. J. P., Kazemier,K. M., Pei, D., Cheng, Ch., Ph.D., Pui, Ch.-H., Relling, M. V., Janka-Schaub, Pieters, R., Evans, W. E. (2004): Gene-expression patterns in grug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells andresponse to treatment. The New England Journal of Medicine 351: 533-542

Chiaretti, S., Li, X., Gentleman, R., Vitale, A., Vignetti, M., Mandelli, F., Ritz, J., Foa, R. (2004): Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of patients with different response to therapy and survival. Blood 103: 2771–2778

Chiaretti, S., Tavolaro, S., Ghia, E. M., Ariola, C., Matteucci, C., Elia, L., Maggio, R., Monica, M., Ricciardi, M.R., Vitale, A., Ritz, J., Mecucci, C., Guarini, A., Foà, R. (2007): Characterization of ABL1 expression in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia by oligonucleotide array analysis. Haematologica 92: 619–626

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.

Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B., Speed, T. P. (2003):Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. Nucleic Acids Research 31: e15

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

Kastner, P., Dupuis, A., Gaub, M.-P., Herbrecht, R., Lutz, P., Chan, S. (2013): Function of Ikaros as a tumor suppressor in B cell acute lymphoblastic leukemia. American Journal of Blood Research 3: 1-13

Loh, M. L., 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 kinome sequencing of pediatric acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group TARGET Project. Blood 121: 485–488

McCall, M. N., Murakami, P. N, Lukk, M., Huber, W., Irizarry, R. A (2011): Assessing affymetrix GeneChip microarray quality. Biomedcentral Bioinformatics 12: 137

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. Pediatrie pro praxi 3: 163-165

Miller, M. B., Tang, Y.-W. (2009): Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. Clinical Microbiology Reviews 22: 611-633

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

Onciu, M. (2009): Acute lymphoblastic leukemia. Hmeatology/Oncology Clinics of North America 23: 655-674

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

Patterson, T. a, Lobenhofer, E. K., Fulmer-Smentek, S. B., Collins, P. J., Chu, T.-M., Bao, W., Fang, H., Kawasaki E. S, Hager, J., Tikhonova, I.R, Walker, S. J, Zhang, L., Hurban, P., de Longueville, F., Fuscoe, J. C, Tong, W., Shi, L., Wolfinger, R. D (2006): Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project. *Nature biotechnology 24*: 1140–1150

Pozhitkov A.E., Tautz, D., Noble, P.A. (2007): Oligonucleotide microarrays: widely applied- poorly underwood. Briefings in Functional Genomics and Proteomics 6: 141-148

Pradervand, S., Paillusson, A., Thomas, J., Weber, J., Wirapati, P., Hagenbüchle, O., Harshman, K. (2008): Affymetrix Whole-Transcript Human Gene 1.0 ST array is highly concordant with standard 3' expression arrays. BioTechniques 44: 759–762

Pradervand, S., Paillusson, A., Thomas, J., Weber, J., Wirapati, P., Hagenbüchle, O., Harshman, K. (2008): Affymetrix whole-transcript human gene 1.0 ST array in highly concordant with standard 3´ expression arrays. BioTechnoques 44: 759-762

Rajaram, S., Oono, Y. (2010): NeatMap – non-clustering heat map alternatives in R. Biomedcentral Bioinformatics 11: 45

Raychaudhuri, S., Sutphin, P. D., Chang, J. T., Altman, R. B. (2001): Basic microarray analysis: grouping and feature reduction. Trends in Biotechnology 19: 189–193

Saal, L. H, Troein, C., Vallon-Christersson, J., Gruvberger, S., Borg, Å., Peterson, C. (2002): BioArray Software Environment (BASE): a platform for comprehensive management and analysis of microarray data. Genome Biology 3: software0003.1–0003.6

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T. (2006): The RIN: an RNA integrity number for assihning integrity values to RNA measurements. BMC Moleculat Biology 7: 3

Sidorov, I. A., Hosack, D. A., Gee, D., Yang, J., Cam, M. C., Lempicki, R. A., Dimitrov, D. S. (2002): Oligonucleotide microarray data distribution and normalization. Information Sciences 146: 67-73

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

Stam, R. W., Schreiden, P., Hagelstein, J. A. P., van der Linden, M. H., Strumpel, D. J. P. M., de Menezes, R. X., de Lorenzo, P., Valsecchi, M. G., Pieters, R. (2009): Gene expression profiling – based dissection of MLL translocated and MLL Germáne acute lymphoblastic leukemia in infants. Blood 115: 2835-2844

Stiller 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

Tajunisha, N., Saravanan, V. (2011): A new approach to improve the clustering accuracy using informative genes for unsupervised microarray data sets. International Journal of Advanced Science and Technology *27*: 85–94.

Thompson, A. M. (2005): Microarray technology for surgeons. The British Journal of Surgery 92: 387–388

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

Yang, D., Li, Y., Xiao, H., Liu, Q., Zhang, M., Zhu, J., Ma, W., Yao, Ch., Wang, J., Wang, D., Guo, Z., Yang, B. (2007): Gaining konfidence in biological interpretation of the microarray data: the functional consestence of the signifiant GO categories. Bioinformatics 24: 265-271

Yuen, T., Wurmbach, E., Pfeffer, R. L., Ebersole, B. J., Sealfon, S. C. (2002): Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. Nucleic Acids Researche 30: e48
Zilliox, M.J., Irizarry, R.A. (2007): A gene expression barcode for microarray data. Nat Methods 4: 911-913

Knižní zdroje:

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

Göhlmann, H., Talloen, W. (2009): Gene expression studies using Affymetrix Microarrays. New York: CRS Press. 359 s. ISBN 978-1-4200-6515-2

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

Wright, E. P., Lyons, V., Wang, S., Higgins, V. J. (2011): Investigating the biological signifikance of metallointercalators with cDNA microarrays. In: Aldrich-Wright, J., (ed.): Metallointercalators: synthesis and techniques to probe their interactions with biomolecules. pp. 325-359, Sydney: University of Western Sydney. 427 s. ISBN 978-3-311-09427-3

Internetové zdroje:

URL:< http://www.affymetrix.com/estore/>[cit.2013-4-11]

URL:< http://www.home.agilent.com/agilent/home>[cit.2013-4-12]

URL:< http://www.medinfographics.com/>[cit.2013-3-4]

9. Seznam použitých zkratek

A	absent
A260	absorbance při 260 nm
A280	absorbance při 280 nm
ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 gene
AGCC	Affymetrix GeneChip Command Console
AHNAK	desmoyokin
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
ANOVA	Analysis of variance
APE1	Apurinic/apyrimidinic endonuclease
ARMC2	armadillo repeat containing 2
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
B-ALL	akutní lymfoblastická leukémie B buněčné řady
BAX	BCL-2-associated X gene
BCR	B-buněčný receptor
BCR/ABL	breakpoint cluster region/ c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase (Abelson murine leukemia)
BTG1	B-buněčná translokace genu 1
CD	cluster of differentiation
CDF	cystom chip definitiv files
CDKN2A	cyklin-dependentní kinázový inhibitor 2A
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CNN-LOH	copy number neutral los sof heterozygosity
CNS	centrální nervová soustava
CNV	copy number variations
CRLF2	cytokine receptor-like factor 2
cRNA	komplementární ribonukleová kyselina
CTCF	CCCTC-binding factor
Cy3	barvivo odvozené od cyaninu (dye cyanine 3)
Cy5	barvivo odvozené od cyaninu (dye cyanine 5)
dATP	deoxyadenintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
DEPC	derthypyrocarbonate
dGTP	deoxyguanintrifosfát

DHFR	dihydrofolát reduktasa
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
DSC3	desmocollin 3
dTTP	deoxythymintrifosfát
dUTP	deoxyuridin trifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGIL	European Group for Immunological Classification of Leukemia
EML1	Echinoderm microtubule-associated protein-like 1
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FAB	French-American-British
FC	fold change
FOXO3	forkhead box O3
GEO	Gene Expression Omnibus
GK	glukokortikoidy
GO	Gene Ontology
GR	glukokortikoidních receptorů
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOXA	homeoboxové geny skupiny A
HTLV1	Human T-lymphotropic virus 1
IKZF1	Ikaros family zinc finger 1 gene
IL-8	interleukin 8
IVT	*in vitro* transkripce
JAK	Janus kinase
log	logaritmus
LOH	lost of heterogenity
M	marginally present
MCL1	myeloid cell leukemia 1 gene
MGED	Gene Expression Microarray Database Society
MIAME	Minimum Information About a Microarray Experiment
miRNA	mikroribonukleová kyselina
MLL	lineární leukemický gen
MLXIP	faktor regulační glykolýzy MondoA

MM	mismatch
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	nukleotidy
NUP214	Nucleoporin 214 kDa
P	present
PAX5	paired box 5
PBX1	Pre-B-cell leukemia transcription factor 1
PCA	analýza hlavních komponent
PCR	polymerázová řetězcová reakce (polymerase chain reaction)
PDLIM1	PDZ and LIM domain 1
PGR	prednisone good response
PM	perfekt match
PPR	poor prednisone response
PRPF18	pre-mRNA processing factor 18 homolog
PTPRD	protein tyrosin fosfatáza, receptor typu D
q	dlouhé raménko chromozomu
qPCR	kvantitativní polymerázová reakce
REV3L	reversionless 3-like gene
RFC4	replication factor C subunit 4 gene
RIN	RNA integrity number
RNA	ribonukleová kyselina
RPL	ribosomal protein L
rRNA	ribozomální RNA
RT-PCR	polymerázová řetězcová reakce založena na reverzní transkripci
SESN1	sestrin 1 gen
SMARCB1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1 gene
SNP	single nucleotide polymorphism
STAT	signal transducer and activator of transcription
t	translokace
T-ALL	akutní lymfoblastická leukémie T buněčné řady
TMSB10	thymosin beta-10 gene
TOPBP1	topoisomerase 2-binding protein 1 gene

TSG	tumor supresorový gen
TSLPR	thymic stromal lymphopoietin receptor
UDG	uracil DNA glykosylasa
USA	United States of Americe
UV-VIS	Ultraviolet–visible
WHO	Word Health Organization