

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2009

Bc. Jana Böhmová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Asociační studie vybraných genových
polymorfismů u pacientů s alergickou reakcí**

Diplomová práce

Jana Böhmová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2009

Vedoucí práce: Mgr. Radek Vodička, Ph. D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a že jsem použila pouze těch zdrojů, které uvádím v literatuře. V případě obhájení práce s kladným výsledkem souhlasím s tím, aby moje práce byla uložena v knihovně a sloužila ve shodě s mými autorskými právy zájemcům o moji diplomovou práci, protože jsem si vědoma, že tato práce byla vypracována jako součást mých povinností v rámci studijního programu, jehož dílčí výsledky jsou zároveň plněním badatelských cílů ústavu, fakulty a univerzity.

V Olomouci dne

Bc. Jana Böhmová

Souhrn

Astma bronchiale patří mezi nejčastější dětská onemocnění. Není vyléčitelné, ale existuje mnoho léků, které jsou zpravidla dobře tolerovány. Nicméně u jednotlivých pacientů je léčba charakterizována různorodou odpovědí. Tyto odlišnosti v odpovědi na astmatické léky jsou přisuzovány genetické variabilitě.

Pro tuto studii byly vybrány geny, které souvisí s přenosem léků a to ABCC1/MRP1 a ABCB1/MDR1. Gen ABCB1/MDR1 je specifický pro transport glukokortikoidů, zatímco ABCC1/MRP1 je součástí signální dráhy cysteinyl leukotrienů. V těchto genech byly zkoumány jednonukleotidové polymorfismy, které by mohly mít vliv na jejich funkci jako transportérů. Genotypizace polymorfismů byla provedena pomocí alelově diskriminační/SNP polymerázové řetězové reakci v reálném čase za pomoci fluorescenčně značených TaqMan sond.

Pro hodnocení polymorfismy bylo nalezeno několik statisticky významných odchylek, nicméně se nepodařilo zjistit jejich jednoznačný vliv na rezistenci k antagonistům leukotrienových receptorů a glukokortikoidům.

Summary

Asthma bronchiale belongs to the most frequent child illnesses. It is not curable but there exist many medicaments that are generally well tolerated. Treatment is nevertheless characterized by various answers among patients. It is supposed that the differences in responses to the asthmatic medicaments are caused mostly by genetics variability.

ABCC1/MRP1 and ABCB1/MDR1 genes with relation to transportation of medicaments were chosen for the research. The ABCB1/MDR1 gene is specific for transporting of glucocorticoids while ABCC1/MRP1 is a part of signal track of cysteinyl leukotriens. There were examined particular types of single nucleotide polymorphisms that can affect their function like transporters. Genotyping of polymorphisms was led through allele discrimination/SNP real-time polymerase chain reaction with use of fluorescently labeled TaqMan probes.

Several statistical divergences were found for examined polymorphisms but we were not able to find explicit influence for the resistance against leukotriene receptor antagonists and glucocorticoids.

Děkuji především svému vedoucímu Mgr. Radkovi Vodičkovi, Ph.D., doc. RNDr. Radkovi Vrtělovi, Ph.D. a MUDr. Markovi Godavovi za ochotu, vstřícný přístup a odborné rady. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Veronice Svačinové, laborantkám Mgr. Evě Krejčířkové a Evě Schneiderové, DiS. za poskytnutí pomoci při řešení experimentální části diplomové práce. Děkuji rovněž prof. MUDr. Jiřímu Šantavému, CSc., který mi umožnil vypracovat diplomovou práci na Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci. Experimentální část diplomové práce mohla být uskutečněna díky grantu IGA MZ ČR: NR8954-3/2006.

Obsah

1 Úvod.....	3
2 Současný stav řešené problematiky.....	5
2. 1 ABC transportní proteiny	5
2. 1. 1 Charakteristika ABC proteinů.....	5
2. 1. 2 Klasifikace ABC transportérů.....	6
2. 1. 3 Základní struktura ABC proteinů.....	7
2. 2 Gen ABCB1/MDR1	11
2. 2. 1 Lokalizace a funkce ABCB1/MDR1	11
2. 2. 2 Proteinová struktura ABCB1/MDR1	11
2. 2. 3 Genová organizace ABCB1/MDR1	12
2. 2. 4 Jednonukleotidové polymorfismy genu ABCB1/MDR1	14
2. 2. 5 Substrátová specifita proteinového transportéru ABCB1/MDR1	15
2. 3 Gen ABCC1/MRP1	17
2. 3. 1 Lokalizace a funkce ABCC1/MRP1	17
2. 3. 2 Proteinová struktura ABCC1/MRP1.....	18
2. 3. 3 Genová organizace ABCC1/MRP1.....	20
2. 3. 4 Jednonukleotidové polymorfismy genu ABCC1/MRP1	21
2. 3. 5 Substrátová specifita proteinového transportéru ABCC1/MRP1	22
3 Cíle práce	25
4 Materiál a metodika.....	26
4. 1 Laboratorní vybavení.....	26
4. 2 Soubor vyšetřovaných pacientů.....	27
4. 3 Metody.....	28
4. 3. 1 Izolace DNA Millerovou metodou	28
4. 3. 2 Genotypizace.....	29
4. 3. 2. 1 Výběr polymorfismů pro analýzu	29
4. 3. 2. 1. 1 Kritéria výběru jednonukleotidových polymorfismů	30
4. 3. 2. 1. 2 Seznam vybraných polymorfismů pro analýzu	30

4. 3. 2. 2 Optimalizace teplotních podmínek pro PCR v reálném čase pomocí Smart Cycleru	34
4. 3. 2. 3 Alelově diskriminační/SNP PCR v reálném čase	34
4. 3. 2. 4 Sekvenační reakce.....	36
4. 3. 2. 4. 1 Návrh sekvenačních primerů	37
4. 3. 2. 4. 2 Optimalizace PCR podmínek.....	37
4. 3. 2. 4. 3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	38
4. 3. 2. 4. 3. 1 PCR reakce s kitem.....	38
4. 3. 2. 4. 4 Gelová agarózová elektroforéza	39
4. 3. 2. 4. 5 Přečištění PCR produktů (post-PCR purifikace)	39
4. 3. 2. 4. 6 Sekvenace PCR produktů	39
4. 3. 2. 4. 7 Přečištění sekvenačních produktů (post-sekvenační purifikace) ..	40
4. 3. 2. 4. 8 Kapilární elektroforéza	41
4. 3. 2. 4. 9 Vyhodnocení získaných sekvencí.....	41
4. 3. 3 Statistické zpracování dat.....	41
5 Výsledky	42
5. 1 Optimalizace teplotních podmínek pro PCR v reálném čase pomocí Smart Cycleru.....	42
5. 2 Sekvenační analýza genů ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1	43
5. 3 Alelově diskriminační/SNP PCR v reálném čase.....	44
5. 4 Frekvenční výskyt alel a genotypů u astmatiků a zdravých kontrol	45
5. 5 Vzájemný vztah mezi jednotlivými polymorfismy	47
5. 6 Vztah genetických charakteristik pacientů s astmatem a jejich terapií	48
5. 7 Rozdíly v zastoupení genetických charakteristik pacientů s různou terapií astmatu vzhledem ke kontrolám.....	49
6 Diskuse.....	51
7 Závěr.....	53
8 Seznam použitých zkratk.....	54
9 Literatura.....	58

1 Úvod

Astma je komplexní stav se značnou heterogenitou ve fenotypu, což způsobuje potíže při určení genetických spouštěčů. V současné době se zkoumá celá řada genů, které by mohly být asociované s astmatem. Představuje chronické onemocnění dýchacích cest postihující 15–18 % světové populace. Astma je nejčastější chronickou dětskou nemocí ve vyspělých zemích ovlivňující více než 155 milionů jedinců.

Toto onemocnění není vyléčitelné, avšak existuje mnoho léků, které jsou zpravidla velmi dobře tolerovány, jsou efektivní pro kontrolu průběhu astmatu a jeho symptomů. K léčbě se používají tři hlavní třídy léků: β 2 antagonisté, kortikosteroidy a leukotrienové modifikátory. Účelem léčby je zmírnit symptomy, maximalizovat plicní funkci, předcházet podráždění a minimalizovat nepříznivé vlivy léků. Ačkoli léky v uvedených třídách dosahují těchto cílů ve větším nebo menším měřítku, jsou všechny charakterizovány různorodou odpovědí u jednotlivých pacientů. To naznačuje, že až 60–80 % odlišnosti v odpovědi na astmatické léky mezi pacienty může být přisuzováno genetické variabilitě (Lima, 2007).

Nejdůležitějším cílem výzkumu astmatu je právě porozumět jeho genetickým a environmentálním spouštěčům. Mnoho genetických studií ukázalo, že četná místa v lidském genomu jsou asociovaná s tímto onemocněním.

Astma je považované za onemocnění s polygenní dědičností, kdy jedna nebo více variant jednoho nebo více genů může mírně přispívat k výslednému fenotypu (Lima, 2007).

Pochopení dopadu genetických variant na terapii má potenciál ve zlepšení péče, snížení vedlejších účinků a efektivnější léčbě pacienta (Marrow, 2007). Zatím nejsou zcela jasné funkční důsledky mnoha identifikovaných polymorfismů v genech, jejichž produkty možná předpovídají účinnost léků. Stále chybí dostatek klinických studií v této oblasti (Hall *et Sayers*, 2007).

Cílem farmakogenetiky je využít genetickou informaci k individualizaci léčby, u které se očekává snížení astmatických potíží (Lima, 2007).

Aktivní odtok je obecně důležitým aspektem buněčné detoxifikace předcházející akumulaci komponent, které mohou být potenciaálně toxické (Leslie *et al.*, 2001). Součástí plasmatické membrány jsou transportéry umožňující odstranění těchto toxických látek z buňky. Jejich představiteli jsou ABC proteiny, jako jsou ABCC1/MRP1 a ABCB1/MDR1. Transportem exogenních a endogenních směsí redukuje zátěž těla od potenciaálně škodlivých substancí. Vedlejší rolí jejich ochranné

funkce je eliminace různých užitečných léků z těla způsobující lékovou rezistenci (Choudhuri *et* Klaassen, 2006).

2 Současný stav řešené problematiky

2. 1 ABC transportní proteiny

2. 1. 1 Charakteristika ABC proteinů

ABC (ATP-binding cassette) transportéry představují rozsáhlou rodinu membránových proteinů (Choudhuri *et* Klaassen, 2006), které translokují široké spektrum substrátů přes extracelulární a intracelulární membrány (Dean, 2002) proti koncentračnímu spádu za spotřeby adenosintrifosfátu (ATP). Substráty ABC transportérů jsou lipidy, žlučové kyseliny, xenobiotika a peptidy pro antigenovou prezentaci (Choudhuri *et* Klaassen, 2006).

ABC transportéry se zapojují do různých buněčných procesů jako je například udržení osmotické homeostázy, příjem živin, rezistence vůči xenotoxinům, vystavení antigenů, buněčné dělení, bakteriální imunita, patogeneze a sporulace, transport cholesterolu a lipidů (Jones *et* George, 2003). Transportem exogenních a endogenních směsí redukuje zátěž těla od potencionálně škodlivých substancí. Vedlejší rolí jejich ochranné funkce je eliminace různých užitečných léků z těla způsobující lékovou rezistenci (Choudhuri *et* Klaassen, 2006).

V současné době víme, že ABC transportéry jsou přítomny v buňkách všech druhů a hrají centrální roli ve fyziologii (van der Deen *et al.*, 2005).

ABC geny jsou esenciální pro mnoho procesů v buňce a mutace v těchto genech způsobují nebo přispívají k mnoha lidským genetickým onemocněním jako je cystická fibróza, neurologické onemocnění, defekty v transportu cholesterolu a žluči, anémie a odpovědi na léky (Dean *et al.*, 2001).

Bylo zjištěno, že tkáně s funkční bariérou jako jsou plíce a průdušky, mají vysokou transkripční aktivitu pro mnoho ABC transportérů. Existují již jasné důkazy důležitých funkcí ABC transportérů v plicích. Nejvyšetřovanějším ABC transportérem je CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), protože mutace v tomto genu jsou zodpovědné za vývoj cystické fibrózy. Role pozměněných funkcí ABC transportérů u plicních onemocnění jako je astma zatím nebylo objasněno.

Významná exprese P-glykoproteinu (P-gp) a MRP1 (multidrug resistance-associated protein) v lidských plicích naznačuje, že tyto transportéry mohou být rozhodující v ochraně před endogenními a exogenními toxickými komponentami vstupujícími plicemi. Doručení plicních léků do místa působení může záviset na přítomnosti a aktivitě mnoha transportérů (van der Deen *et al.*, 2005).

2. 1. 2 Klasifikace ABC transportérů

Termín ABC transportér byl zaveden v roce 1992. Název ABC byl založen na nejvíce charakterizovaném rysu této rodiny na vysoce konzervativní ATP vazebné kazetě (Choudhuri *et* Klaassen, 2006).

ABC geny jsou široce rozšířené v eukaryotických genomech a jsou vysoce konzervovány mezi druhy, což naznačuje, že většina těchto genů existuje od počátku eukaryotické evoluce (Dean *et al.*, 2001).

Bylo objeveno 48 lidských ABC genů (Kenneth, 2007) rozdělených do sedmi podtříd na základě aminokyselinových sekvencních podobností a fylogeneze (Dean *et* Annilo, 2005). Analýza genomové sekvence naznačila přítomnost pseudogenů. V genomu zůstává několik sekvencí s homologií k ABC genům, které leží v neúplně sekvencovaných oblastech a možná představují další pseudogeny nebo funkční lokusy (Dean, 2002). Pro označení jednotlivých podtříd byly zavedeny následující zkratky, v závorkách je uveden počet členů v podtřídě: ABCA (12), ABCB (11), ABCC (13), ABCD (4), ABCE (1), ABCF (3), ABCG (5) (Choudhuri *et* Klaassen, 2006).

Sekvencování genomů četných obratlovců by mělo umožnit doplnění informací o ABC transportérech a zhodnocení evoluce jejich genů. Většina ABC transportérů je konzervována u všech obratlovců, ale existují i některé případy nových duplikací a ztráty genů. Další charakterizace ABC transportérů z lidského genomu a z modelových organismů budou vést k novým poznatkům o normální fyziologii a o lidských onemocněních (Dean *et* Annilo, 2005).

2. 1. 3 Základní struktura ABC proteinů

ABC transportéry využívají energii uvolněnou při hydrolýze ATP k přenosu substrátů přes lipidové membrány obklopující buňky nebo buněčné organely, často proti koncentračnímu gradientu. ABC transportéry jsou různorodé s ohledem na jejich fyziologickou funkci, jejich substrátovou specifitu a řízený transport (import nebo export) (Locher *et Borths*, 2004).

Importéry byly dosud nalezeny pouze u prokaryot, zatímco exportéry typu ABC transportérů jsou exprimovány u všech žijících říší (Locher, 2009). U bakterií jsou převážně zapojené v importu esenciálních sloučenin, které nemohou být získány difúzí (cukry, vitamíny, ionty kovů) do buněk. U eukaryot většina ABC proteinů přepravuje sloučeniny z cytoplazmy vně buňku nebo do intracelulárních kompartmentů (endoplazmatické retikulum, mitochondrie, peroxisom). Většina známých funkcí eukaryotických transportérů zahrnuje přemísťování hydrofobních sloučenin buď uvnitř buňky jako součást metabolických procesů, nebo vně buněk pro transport k jiným orgánům nebo pro sekreci z těla (Dean, 2002).

Eukaryotické ABC geny jsou organizované buď jako úplné transportéry obsahující dvě transmembránové domény (TMD) a dvě domény vázající nukleotidy (NBD), nebo jako poloviční transportéry. Poloviční transportér musí formovat buď homodimery, nebo heterodimery pro vytvoření funkčního transportéru (Dean *et al.*, 2001).

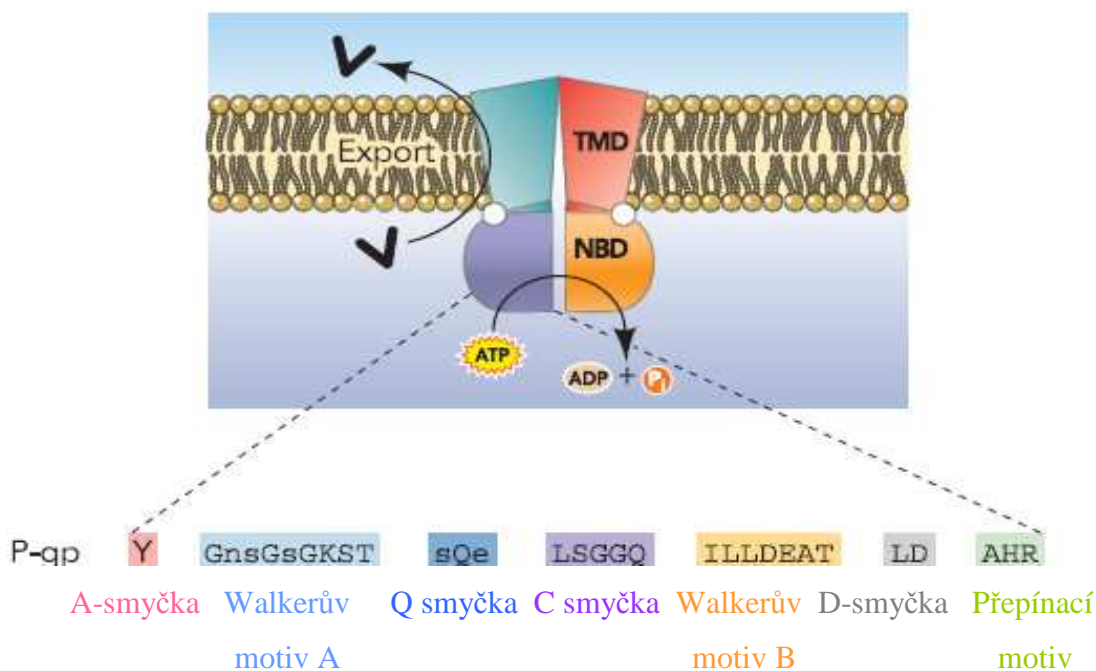
Dvě NBD, neboli ABC domény, a dvě TMD, také nazývané membránově uložené domény (MSD), tvoří funkční transportér. U archebakterií a eubakterií poskytují čtyři oddělené podjednotky čtyři domény, zatímco u vyšších organismů jsou tyto domény běžně fúzovány do jednoho polypeptidu (Schmitt *et Tampé*, 2002).

ABC transportéry se vyznačují společnou architekturou a základním mechanismem. Dvě NBD váží a hydrolyzují ATP. Dodávají energii jednosměrnému substrátovému transportu, který nastává během translační cesty poskytnuté dvěma TMD. ABC domény mají podobné struktury a sdílí konzervované sekvenční motivy, které jsou rozhodující pro vazbu ATP a hydrolýzu (Locher, 2004). NBD ABC transportérů jsou většinou blízce homogenní bez ohledu na substrátovou specifitu transportérů nebo fylogenetický počátek.

TMD ukazují relativně vysokou sekvenční variabilitu, protože obsahují vazebná místa pro substráty (Jones *et George*, 2002). TMD vykazují významnou sekvenční

podobnost, když transportují chemicky podobné substráty ve stejném směru přes membránu (Locher, 2004). TMD se značně různí v primární sekvenci, délce, architektuře a množstvím transmembránových (TM) helixů. Zatímco ABC exportéry obsahují konzervované jádro 12 TM helixů, ABC importéry mají mezi 10-20 TM helixy (Hollenstein *et al.*, 2007).

NBD je konzervovaná doména této proteinové rodiny a funguje jako motorová doména napojená na odlišné TMD. NBD obsahují dvě subdomény, jedna se funkčně podobá nepříbuznému RecA proteinu a druhou je helikální subdoména (Locher, 2009). Některé konzervované sekvenční motivy jsou buď zapojené do vazby ATP a hydrolýzy, nebo usnadňují skládání transportérů na jejich rozhraní (Hollenstein *et al.*, 2007). Každá NBD je složena ze sedmi vysoce konzervovaných, ale ne neměnných motivů (Obr. 1) (Kenneth, 2007). Mezi tyto evolučně konzervované motivy patří Walkerův motiv A (neboli P smyčka), Walkerův motiv B, LSGGQ motiv (také nazývaný jako C smyčka nebo ABC typický motiv). Walkerův motiv A zajišťuje vazbu nukleotidu ATP. LSGGQ motiv kontaktuje nukleotid, který je navázaný v ATP vazebném místě. Walkerův motiv B obsahuje konzervovaný glutamátový zbytek, který řídí nukleofilní atak na ATP přes molekulu vody. Schopnost rozpoznat γ fosfátovou skupinu se přisuzuje Q smyčce, která se nachází v kontaktním rozhraní s TMD. D smyčka zajišťuje kontaktní rozhraní mezi dvěma NBD a pravděpodobně i další úkoly. Smyčka A poskytuje aromatický zbytek postranního řetězce, který se staví proti adeninové skupině vázaného nukleotidu. Přepínací motiv obsahuje histidinový postranní řetězec, který pravděpodobně přispívá ke katalytické reakci (Hollenstein *et al.*, 2007).



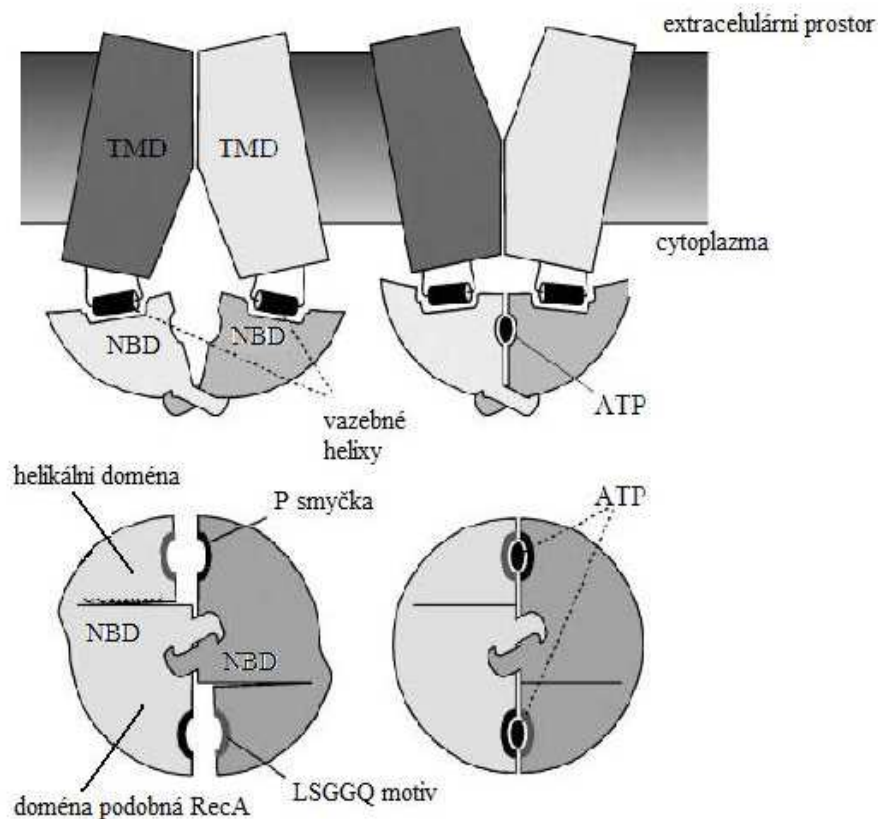
Obr. 1: Znárodnění motivů domény vázající nukleotidy P-glykoproteinu u ABC exportéru.

Upraveno podle:

Kenneth, J. L. (2007): Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology* 22: 122-130.

NBD jsou lokalizovány v cytoplazmě a převádí energii na transport substrátů přes membránu. ABC pumpy jsou většinou jednosměrné (Dean, 2002). Klíčem k efektivnímu jednosměrnému transportu je vazba ATP na NBD, která způsobuje zmenšení mezery mezi vazebnými helixy o 10-15 Å ve srovnání se stavem bez nukleotidu. Přibližující se vazebné helixy pravděpodobně spouští změnu konformace TMD, která se převrátí z vnitřní strany na vnější. Po uvolnění adenosindifosfátu (ADP) a anorganického fosfátu se transportéry vrátí do původní konformace (Hollenstein *et al.*, 2007). Na rozhraní NBD v úplných transportérech jsou konzervované motivy umístěny v „head-to-tail“ uspořádání. Toto uspořádání tvoří dvě místa pro vazbu a hydrolyzu ATP mezi P smyčkou jedné NBD a LSGGQ motivem druhé NBD, proto označení „head-to-tail“. V nepřítomnosti nukleotidu se tvoří mezera na rozhraní domén.

Umožňuje přístup vody k místům vázajícím nukleotidy. Když se naváží molekuly ATP, rozhraní mezi NBD se uzavře (Obr. 2). Předpokládá se, že během jednoho transportního cyklu jsou spotřebovány dvě molekuly ATP, což je v souladu s pozitivní kooperativou pozorovanou u ATP hydrolyzy u několika ABC transportérů (Locher, 2009).



Obr. 2: Konzervovaný vazebný mechanismus ABC transportérů.

Upraveno podle:

Locher, K. P. (2009): Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 239-245.

2. 2 Gen ABCB1/MDR1

2. 2. 1 Lokalizace a funkce ABCB1/MDR1

ABCB1 gen také nazývaný jako gen mnoholékové rezistence 1 (MDR1) kóduje transmembránový P-glykoprotein (P-gp) (Wada, 2006). P-gp byl poprvé objeven Julianem a Lingem v roce 1976. Nalezli jej jako integrální membránový glykoprotein u buněk vaječníku čínského křečka (Juliano *et Ling*, 1976). ABCB1 byl prvním klonovaným lidským ABC transportérem, jenž uděloval fenotyp mnoholékové rezistence nádorovým buňkám, u kterých se vyvinula odolnost k chemoterapeutickým lékům (Dean, 2002).

P-gp se vyskytuje v buňkách různých orgánů jako jsou játra, ledviny, střevo, mozek, placenta (Wada, 2006), varlata a plíce (Choudhuri *et Klaassen*, 2006). P-gp je apikálně exprimovaný hlavně v orgánech zapojených v exkreci jako jsou játra a střevo (van der Deen *et al.*, 2005) V plicích se nachází na apikální straně řasinkových epitelových buněk a řasinkových sběrných kanálků a na apikálním i laterálním povrchu serózních buněk bronchiálních žláz, ale ne u pohárkových buněk sekretujících hlen (Lechapt-Zalcman *et al.*, 1997). Také se vyskytuje na apikálním povrchu epitelových buněk, které lemují trávicí trakt a na apikálním povrchu endotelových buněk mozkových kapilár, kde tvoří hlavní složku hematoencefalické bariéry. Jeho fyziologickou rolí je pravděpodobně zamezení vstupu toxických látek z vnitřních orgánů do krve a ochrana citlivých vnitřních orgánů, jako je mozek, před komponentami, které vstoupily do krevního oběhu.

P-gp má širokou substrátovou specifitu. Transportuje slabě amfipatické a hydrofobní substráty (Sharom, 2006). Genetické a environmentální faktory mohou mít významný dopad na expresi a aktivitu P-gp a tedy i na dispozici, efektivitu nebo toxicitu léků (Fenneteau *et al.*, 2009).

2. 2. 2 Proteinová struktura ABCB1/MDR1

P-gp je integrální plazmatický protein tvořený 1280 aminokyselinami (Loo *et al.*, 2006) o molekulové hmotnosti 170 kDa (Germann *et Chambers*, 1998). Rosenberg a kolektiv (1997) popsali pomocí elektronové mikroskopie první třídimenzionální

strukturu P-gp. Třídídimenzionální struktura byla získána při rozlišení 8 Å z dvojrozměrných krystalů P-gp čínské křečka ve stavu s navázaným nukleotidem (Rosenberg *et al.*, 2005). Studie ukázala, že průřez P-gp molekuly má tvar jetelinového lístku. Konfigurační změnou proteinu se otevře dutina v TMD oblasti na extracelulární straně membrány a tak konformační změny zprostředkovávají transport substrátů (Choudhuri *et* Klaassen, 2006).

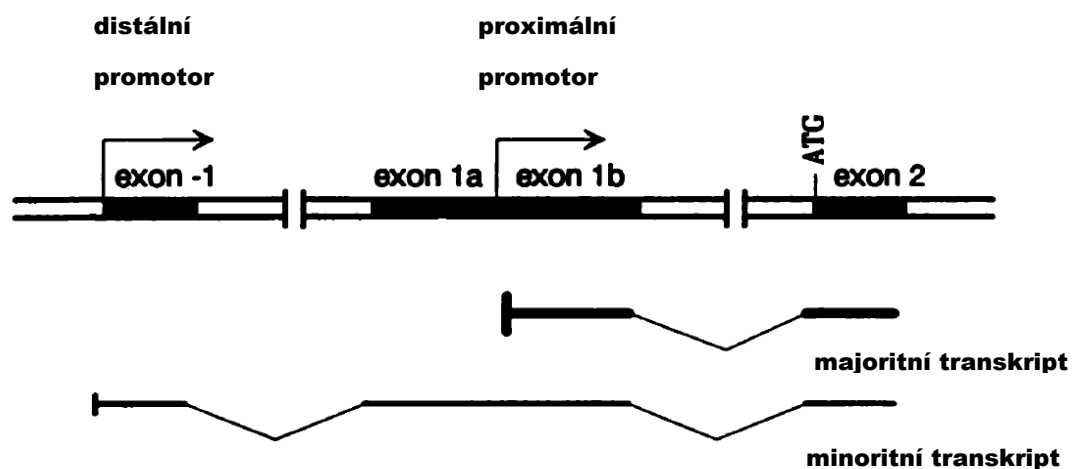
P-gp je složený ze dvou homologních částí, které se shodují ve 43 % aminokyselin (Loo *et al.*, 2006). Každá z částí obsahuje N-koncovou hydrofobní TMD. TMD je tvořena přibližně 250 aminokyselinami, které jsou uspořádány do šesti transmembránových helixů (Germann *et* Chambers, 1998). TMD jsou navzájem propojeny linkerem o délce přibližně 75 aminokyselin (Rao *et* Nuti, 2003). C-koncová hydrofilní NBD se skládá z 300 aminokyselin (Germann *et* Chambers, 1998). Některé transmembránové segmenty (TMS) pravděpodobně vytváří vazebné místo pro léky. Mutačními studii se zjistilo, že tato vazebná místa tvoří TMS4, TMS5, TMS6 N-koncové TMD a TMS10, TMS11 a TMS12 C-koncové TMD (Loo *et* Clarke, 2000). Výsledky naznačily, že významné konformační změny během hydrolyzy ATP nastávají mezi TMS5 a TMS8 (Loo *et al.*, 2004a) i mezi TMS2 a TMS11 (Loo *et al.*, 2004b). Tyto TMS formují bránu pro vstup léků (Loo *et al.*, 2006). Studie předpokládá, že zmíněné oblasti obou částí transportéru musí vymezovat místo pro vazbu léků na cytoplazmatické straně P-gp. Pravděpodobně tvoří „čepy“ nutné pro konformační změny během transportního cyklu (Loo *et al.*, 2004b). Loo a kolektiv (2006) srovnávali krystalovou strukturu bakteriálního transportéru MsbA se svým modelem rotační symetrie a zjistili, že TMS1 a TMS7 také podílí na vytvoření vazebného místa pro léky.

2. 2. 3 Genová organizace ABCB1/MDR1

Gen MDR1 má rozpětí přibližně 200 kb. Je umístěný v chromozomální oblasti 7p21 (Tang *et al.*, 2004). Skládá se z 29 exonů a 29 intronů, číslovaných -1 až 28 (Choudhuri *et* Klaassen, 2006). Číslování vyjadřuje skutečnost, že v genu se nachází dvě místa začátku transkripce a tedy i dvě promotorové oblasti, které jsou od sebe vzdáleny přibližně 100 kb (Tang *et al.*, 2004). MDR1 může být transkribován ze dvou promotorů, distálního a proximálního (Chen *et al.*, 1990). Distální promotor se nachází na začátku exonu -1 a proximální promotor uvnitř exonu 1. Protože proximální

promotor je umístěný uvnitř exonu 1, část lokalizovaná 5' k promotoru je nazývána exon 1a a druhá část umístěná 3' k promotoru je pojmenována exon 1b (Choudhuri *et* Klaassen, 2006). Ve většině buněčných typů řídí expresi proximální promotor s transkripčním počátkem v nukleotidové pozici -140 .

Translace iniciačního kodonu ATG je umístěná uvnitř exonu 2 (Obr. 3). Z toho vyplývá, že sekvenci kódující protein MDR1 genu tvoří 27 exonů, 14 z nich kóduje první polovinu a následujících 13 druhou polovinu proteinu (Chen *et al.*, 1990).



Obr. 3: Schématické znázornění počátku transkripce v genu MDR1

Upraveno podle:

Chin, J. E., Soffir, R., Noonan, K. E., Choi, K., Roninson, I. B. (1989): Structure and Expression of the Human MDR (P-Glycoprotein) Gene Family. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3808-3820.

Lidský gen MDR1 nemá v promotoru TATA box (tím se liší od myšního analogu), ale místo něj obsahuje iniciační element. Iniciační element řídí transkripci a zajišťuje její přesný začátek. Studie odhalily, že sekvence mezi -6 až +11 bp je dostačující pro správný počátek transkripce (van Groenigen *et al.*, 1993). Promotor lidského MDR1 genu má několik transkripčních regulačních elementů, jako je GC box,

Y box (invertovaný CCAAT element), který reaguje s p53 elementem, AP-1 elementem, HSE (heat shock element), MEF1 (MDR1 promotor-enhancing faktor 1) a dalšími. Přítomnost těchto různých regulačních elementů naznačuje komplexní řízení MDR1 genu (Choudhuri *et* Klaassen, 2006).

Velikostní rozpětí exonů genu MDR1 se pohybuje od 49 do 587 bp nebo od 16 až 69 kodonů v oblasti kódující protein. Průměrná délka vnitřních exonů MDR1 kódujících protein je 47,5 kodonů ve srovnání s velikostí vnitřních exonů u jiných genů, kde průměrná délka je 44,5 kodonů (průměrná délka vnitřních exonů jiných genů je 44,5 kodonů).

V otevřeném čtecím rámci se 19 intronů nachází mezi kodony (introny typu 0), 1 intron přerušuje rámec po prvním nukleotidu kodonu (intron typu 1) a 6 intronů začíná po druhém nukleotidu kodonu (intron typu 2).

Část genu kódující TMD zahrnuje osm intronů, čtyři typu 2, tři jsou typu 0 a jeden typu 1. NBD obsahuje šest intronů typu 0 následované dvěma introny typu 2. Oblasti vázající nukleotidy jsou tvořeny pouze introny typu 0 (Chen *et al.*, 1990).

2. 2. 4 Jednonukleotidové polymorfismy genu ABCB1/MDR1

V MDR1 bylo identifikováno mnoho jednonukleotidových polymorfismů (SNP). Velký počet studií se má zapojit do výzkumu běžně se vyskytujících SNP v MDR1, které mají za následek pozměnění hladiny léků a odlišnou vnímavost k různým nemocem (Marzolini *et al.*, 2004).

Bylo zjištěno, že u různých národů se vyskytovaly pouze tři exonické SNP s vysokou frekvencí. V exonu 12 C1236T, v exonu 21 G2677T/A a v exonu 26 C3435T (Tang *et al.*, 2004).

Bylo zjištěno, že dva synonymní SNP (C1236T v exonu 12 a C3435T v exonu 26) a nesynonymní SNP (G2677T, Ala893Ser) v exonu 21 jsou ve vazebné nerovnováze, čímž formují SNP haplotyp. Tento haplotyp se vyskytoval u 62 % evropských Američanů a 13 % Afroameričanů (Kim *et al.* 2001).

C3435T byl identifikován jako rizikový faktor pro mnohá onemocnění (Li *et al.*, 2006). Hoffmeyer a kolektiv (2000) poprvé objevil souvislost exprese P-gp ve střevě a polymorfismem C3435T v exonu 26. Nízká střevní exprese P-gp byla asociovaná s T alelou na rozdíl od *wild-type* alely C.

Nicméně další studie ukázaly, že snížená exprese může být způsobená nesynonymním SNP v exonu 21 (G2677T/A). SNP v exonu 21 v pozici 2677 je trialeický a může mít za následek dvě odlišné změny aminokyselin, Ala893Ser (G2677T) a Ala893Thr (G2677A) (Choudhuri *et* Klaassen, 2006).

Odlišnosti v alelové frekvenci SNP C3435T exonu 26 byly patrné mezi africkou a běloško-asijskou populací. Frekvence alely C byla u africké v rozpětí 73-84 % ve srovnání s běloško-asijskou populací, kde se frekvence pohybovala v rozmezí 34-55 % (Ameyaw *et al.*, 2001).

Vysoká ale etnický variabilní frekvence C3435T exonu 26, byla různě asociovaná s odlišnostmi v MDR1 expresi, funkci, odpovědi na léky, klinických výsledcích a s citlivostí k různým nemocem. Tyto rozdíly způsobuje sám C3435T nebo v kombinaci s C1236T v exonu 12, G2677T/A v exonu 21 nebo T-129C v exonu 1 (Tang *et al.*, 2004). SNP T-129C MDR1 genu, ale ne G2677A/T a C3435T, je spojován s nízkou expresí mRNA MDR1 u kolorektálního adenokarcinomu (Koyama *et al.*, 2006).

Genotypová frekvence SNP genu MDR1 T-129C, C1236T, G2677A/T a C3435T byla srovnávaná u 157 zdravých Japonců a 100 zdravých bělochů pro objasnění základních informací o odlišnostech farmakoterapeutických výsledků mezi rasami. G2677A byl pětkrát více frekventovaný u Japonců než bělochů. Nejčastější japonský haplotyp je reprezentován alelami T(-129)-T1236-T2677-T3435 (36,1 %), zatímco haplotyp T(-129)-C1236-G2677-T3435 (12,8 %) byl specifický pro bělochy (Komoto *et al.*, 2006).

Avšak v mnoha případech je zjištěný vliv SNP genu MDR1 rozporuplný a v některých případech protichůdný (Marzolini *et al.*, 2004). Vliv polymorfismů na plicní onemocnění je zatím spekulativní (van der Deen *et al.*, 2005).

2. 2. 5 Substrátová specifita proteinového transportéru ABCB1/MDR1

P-gp reaguje se stovkami strukturně odlišných komponent. Substráty jsou slabě amfipatické a relativně hydrofobní. Většinou (ale ne všechny) obsahují aromatický kruh a pozitivně nabitý atom dusíku (Sharom, 2006). P-gp transportuje metabolické produkty, lipidy, steroly, léky a jiná xenobiotika. Substráty P-gp jsou různé léky

používané při chemoterapii nádorů, hypertenzi, alergiích, infekcích, imunosupresi a zánětech (Choudhuri *et* Klaassen, 2006).

P-gp je pumpou pro lipofilní léky včetně glukokortikosteroidů. Zvýšená exprese P-gp možná způsobuje omezenou odpověď na glukokortikosteroidy u steroidního rezistentního astmatu (Montano *et al.*, 1996).

Zatím není známý přesný transportní mechanismus P-gp pro léky a jiná xenobiotika. Byly navrženy tři modely pro objasnění způsobu transportu P-gp. Klasický, hydrofobní „vacuum cleaner“ a flipázový model.

TMD u klasického modelu vytvářejí pór, což naznačuje, že P-gp pracuje jako protein transportující léky směrem z cytoplazmy do extracelulárního prostoru (Ramakrishnan, 2003).

U hydrofobního „vacuum cleaner“ modelu se P-gp váže přímo k substrátům na plazmatické membráně a pumpuje je ven z buňky, protože tyto substráty jsou rozpoznány jako membránově cizí (Choudhuri *et* Klaassen, 2006).

Flipázový model předpokládá reakci P-gp s léky na cytosolické straně lipidové dvojvrstvy a jejich překlopení je do vnější membrány proti koncentračnímu gradientu. Z vnějšího listu membrány difundují léky do extracelulárního prostoru. Současné důkazy podporují mechanismus flipázového modelu (Ramakrishnan, 2003).

2. 3 Gen ABCC1/MRP1

2. 3. 1 Lokalizace a funkce ABCC1/MRP1

Protein mnohočetné lékové rezistence MRP1/ABCC1 je členem „C“ větve ABC superrodiny (Westlake *et al.*, 2005). Všudypřítomná tkáňová distribuce tohoto transportéru naznačuje, že přispívá k různým fyziologickým funkcím, včetně ochrany před xenobiotiky, endogenními toxickými metabolity a leukotrieny, které zprostředkovávají zánětlivou odpověď. Podílí se na ochraně před toxickými účinky a oxidativním stresem (Bacos *et Homolya*, 2007).

V roce 1992 Cole a kolektiv zjistili u plicních nádorových buněčných linií H69AR rezistenci k mnoha chemoterapeutickým činidlům, která nesouvisela s nadexpresí P-glykoproteinu. Klonovali komplementární DNA (cDNA) mediátorové RNA (mRNA) nadexprimované v H69AR buňkách. Nadexprese byla asociována s genem lokalizovaným na chromozomu 16p13.1 (Cole *et al.*, 1992). H69AR buněčné linie odvozené od buněk malobuněčného karcinomu plic byly vybrány opakovaným vystavením doxorubicinu. (Cole *et al.*, 1991). H69AR buňky ukázaly zkříženou rezistenci k širokému spektru strukturně nesouvisejících cytotoxických léků. Fenotyp mnoholékové rezistence H69AR se podobal již dříve známé rezistenci asociované s nadexpresí P-gp (Deeley *et al.*, 2006). H69AR neexprimovaly P-gp, což bylo dokázáno pomocí monoklonálních protilátek (Cole *et al.*, 1991).

Lidský MRP1 protein je detekovaný u potních a mazových žláz kůže, slinných kanálků a slinivky, v epitelu jícnu, tlustého střeva, žaludku, plic a mandlí, v srdci, hladkých a kosterním svalech, v kůře nadledvinek, v Langerhansových ostrůvcích slinivky, v Leydigových a Sertoliho buňkách varlat, placentálním syncytiotrofoblastu, žírných buňkách, eosinofilech, pomocných T buňkách. Slabá imunoreaktivita byla nalezena v tubulech ledvin. MRP1 nebyl detekován v endotelových buňkách kapilár (Deeley *et al.*, 2006; Wijnholds, *et al.*, 1998).

MRP1 je umístěn převážně basolaterálně v plazmatické membráně polarizovaných buněk, na rozdíl od apikální membrány, kde jsou umístěny ostatní odtokové pumpy jako je P-gp. V některých buněčných typech, jako jsou placentární syncytiotrofoblast a mozkové mikrocévní endotelové buňky, je MRP1 lokalizovaný na apikální membráně. Co určuje tuto specifickou membránovou lokalizaci u jednotlivých buněčných typů, není známo (Deeley *et al.*, 2006).

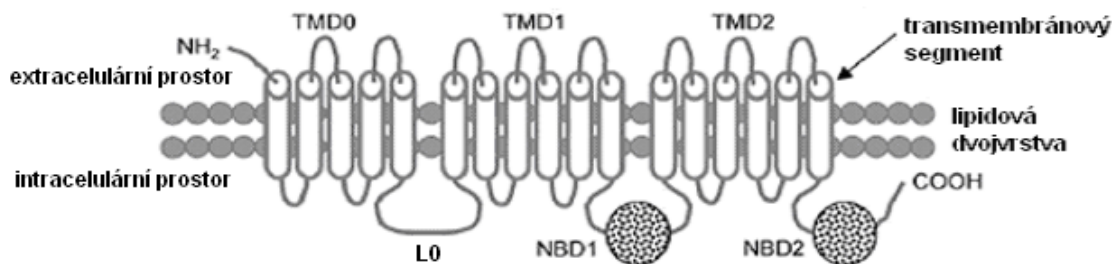
Vysoká exprese MRP1 na basolaterální straně plicního epitelu pravděpodobně pomáhá při odstranění toxinů. MRP1 v plicním epitelu, žlázách a alveolárních makrocytech se zřejmě podílí na odstraňování toxických intracelulárních substancí, antioxidantové ochraně nebo produkci cysteinyl leukotrienu C₄ (LTC₄) jako zánětlivé odpovědi. MRP1 exprese je vyšší v plicích ve srovnání s jinými orgány. Snížená nebo zvýšená MRP1 exprese může mít velký dopad na vývoj a průběh plicních onemocnění, ochranu před vzdušnými polutanty i inhalovanými toxickými substancemi jako je cigaretový kouř (van der Deen *et al.*, 2005).

2. 3. 2 Proteinová struktura ABCC1/MRP1

MRP1 je integrální glykofosfoprotein s molekulovou váhou 190 kDa (Bacos *et Homolya*, 2007), který stejně jako ostatní ABC transportéry obvykle obsahuje dvě tandemově uspořádané TMD a dvě cytoplazmatické NBD. MRP1 a některé další ABCC proteiny obsahují navíc třetí NH₂ terminální TMD (Westlake *et al.*, 2005).

Rosenberg a kolektiv (2001) poskytl první informace o struktuře tohoto transportéru pomocí analýzy jeho částí a elektronové krystalografie při rozlišení 22 Å. Výsledky naznačily, že MRP1 funguje jako dimer.

MRP1 má doménové uspořádání TMD0-L0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2. Hlavní oblast MRP1 (TMD1-NBD1-TMD2-NBD2) je prodloužena N-koncovou membránovou doménou (TMD0), která je napojena na hlavní oblast charakteristickým intracelulárním linkerem (L0). TMD0 je tvořena pěti a každá TMD1 a TMD2 šesti transmembránovými segmenty (Obr. 4) (Bacos *et Homolya*, 2007).



Obr. 4: Schématické zobrazení proteinové struktury MRP1.

Upraveno podle:

Choudhuri, S. a Klaassen, C. D. (2006): Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.* 25: 231-259.

Mutační studie určily, že Asn19 a Asn23 na NH₂ konci TMD jsou modifikovány N-vázanými oligosacharidy. N-glykosylace Asn19 a Asn23 stanovila první přímý důkaz, že MRP1 má extracytosolický NH₂ konec (Hipfner *et al.*, 1997)

TMD0 oblast je charakteristická pro mnoho členů ABCC rodiny. Bylo objeveno, že tato doména je postradatelná pro funkci MRP1. Zkrácený mutant, kterému chybí tato doména, byl funkční s ohledem na transportní aktivitu a je podobný *wild-type* proteinu, lokalizovanému na basolaterální membráně u polarizovaných buněk. Na druhou stranu mají určité mutace v TMD0 za následek významné konformační změny a redukuje transportní aktivitu. Detailní studie vyšetřovaly vliv TMD0 na subbuněčnou lokalizaci MRP1. Odhalily, že ačkoliv TMD0 není esenciální pro basolaterální umístění MRP1, delece oblasti TMD0 působí na subbuněčnou distribuci proteinu. V recyklujících endosomech bylo nalezeno okolo 50% zkrácených proteinů a pouze 20% intaktních MRP1. Tyto nálezy naznačily, že TMD0 doména je důležitá pro recirkulaci nebo pro vazbu MRP1 k plazmatické membráně. (Bacos *et al.*, 2007). Studie ukázaly, že MSD0 a COOH koncová oblast obsahují nadbytečné směrové signály, které se stávají esenciální, když jedna nebo druhá oblast chybí a nebo jsou mutovány (Westlake *et al.*, 2005). Delece TMD0 v MRP1 společně s L0 linkerem ruší aktivitu pumpy a způsobuje hromadění v intracelulárních

membránách. Z toho vyplývá, že L0 doména je nezbytná pro funkci a správnou lokalizaci. Experimenty naznačily, že L0 tvoří doménu uvnitř MRP1, která pracuje ve specifické interakci s hydrofobní membránovou oblastí a s hlavní oblastí MRP1 (Bacos *et al.*, 2000). Oblast v L0 zodpovědná za transportní aktivitu byla mapována mezi aminokyselinami 208 (Cys) a 260 (Asn), zatímco oblast L0 potřebná pro basolaterální lokalizaci byla udána mezi aminokyselinami 208 (Cys) a 270 (Lys). (Westlake *et al.*, 2003).

Přes relativně malou sekvenční podobnost je pravděpodobně sekundární struktura L0 oblastí konzervována u všech členů ABCC rodiny. Předpokládanou sekundární strukturu L0 tvoří dva helixy. Jeden je charakteristicky amfipatický (aminokyseliny 221-233) a je zodpovědný za interakci s buněčnou membránou. Odstranění tohoto helixu ruší membránové připojení L0 (Bacos *et Homolya*, 2007).

2. 3. 3 Genová organizace ABCC1/MRP1

MRP1 je lokalizován na chromozomu 16 na pruhu 13.1 a rozpětí má přibližně 200 kb. Obsahuje 31 exonů a kóduje 1531 aminokyselin (Wang *et al.*, 2006). Exon 1 kóduje 5'UTR mRNA MRP1 a prvních 48 bp kódující sekvence. Exon 31 tvoří posledních 109 bp kódující sekvence a 3'UTR, která je dlouhá asi 1,5 kb. Průměrná délka vnitřních exonů je 154 bp (Grant *et al.*, 1997). Což je blízko průměrné exonové velikosti 137 bp pro geny obratlovců (Hawkins, 1998). Nejkratší je exon 6, má 62 bp. Nejdelší je exon 23, je tvořen 311 bp. Mnoho intronů je dlouhých. Z tohoto důvodu známe pouze minimum velikostí odhadnutých pro 8 z 30 intronů. Nejkratší je intron 25 o velikosti 1,1 kb (Grant *et al.*, 1997). Všechny 30 intronů se řídí pravidlem GT-AG (Choudhuri *et Klaassen*, 2006). Předpovězená topologie naznačuje, že MRP1 je rozdělen do šesti hlavních domén: tři TMD, dvě NBD a oblast linkeru. 205 aminokyselin blízko NH₂ představující TMD0 jsou kódovány prvními pěti exony MRP1. Každá NBD je kódovaná třemi exony. NBD1 exony 16-18, NBD2 exony 28-30. TMD1 je tvořena exony 7-15 a TMD2 exony 22-27. Linker zahrnuje oblast aminokyselin 820-958 a je kódován exony 19-21 (Grant *et al.*, 1997)

Proximální promotor lidského, myšního a krysího MRP1 genu je bohatý na GC báze (> 70%). Všechny tři promotory jsou bohaté na GC báze a neobsahují TATA nebo CAAT prvek. Prvních 100 nukleotidů u lidských, myších a krysích promotorů vykazuje

významnou sekvenční konzervaci. Obsahují několik překrývajících se GC boxů. Každý CG box může vázat Sp1 nebo Sp3. Kromě prvních 100 nukleotidů jsou hlodavčí a lidské sekvence odlišné. Nicméně krysí a myší lemující oblasti mají víc jak 70 % sekvenční identity na 3,5 kb při srovnání sekvencí (Muredda *et al.*, 2003)

Z celkových 30 intronů je 19 intronů třídy 0, tři introny jsou třídy 1 a osm intronů třídy 2. V tomto ohledu jsou důležité oblasti kódující TMD0 a NBD1, ve kterých všechny introny jsou třídy 0. Tento typ organizace by mohl zvyšovat pravděpodobnost alternativního sestřihu, který má za následek významné množství variant transkriptů, které udržují původní otevřený čtecí rámec mRNA MRP1 (Grant *et al.*, 1997).

2. 3. 4 Jednonukleotidové polymorfismy genu ABCC1/MRP1

Genetické varianty v MRP1 genu mohou ovlivňovat jeho expresi, proteinovou strukturu a funkci. Mají za následek odlišnosti v odpovědi na léky, oxidativní stres stejně jako vnímavost k nemocem, ve kterých environment hraje důležitou roli (Wang *et al.*, 2005).

Wang a kolektiv (2005) zkoumali 13 SNP v MRP1 u 480 jednotlivců z pěti různých populací (čínské, malajské, indiánské, afroamerické a evropských Američanů). Frekvence SNP u Afroameričanů byly výrazně odlišné od ostatních neafričských populací ve většině SNP lokusech. Nalezli relativně vysokou haplotypovou odlišnost v genu MRP1. SNP G3140C v exonu 23 (Cys1047Ser v cytoplazmatické smyčce 6) se vyskytuje relativně ve vysoké frekvenci 4,5 % u africkoamerické populace, což nebylo dosud nalezeno u žádných zkoumaných bělochů. SNP G2012T v exonu 16 (Gly671Val) nemá funkční důsledek, zatímco SNP G1299T v exonu 10 (Arg433Ser v cytosolickém rozhraní transmembránového segmentu 8) má za následek významné snížení transportní schopnosti mnoha organických aniontů, ale zvyšuje doxorubicinovou rezistenci (Choudhuri *et al.*, 2006).

Polymorfismy genu MRP1 mohou ovlivňovat jeho funkci v plicích. Etnické odlišnosti pro MRP1 expresi byly pozorovány mezi bělošskou a japonskou populací. Mutace v MRP1 genu mohou mít za následek ztrátu transportu některých substrátů MRP1 (van der Deen *et al.*, 2005). Například substituce vysoce konzervovaného tryptofanu v pozici 1246 cysteinem (Trp1246Cys) v posledním transmembránovém

segmentu 17 způsobuje ztrátu schopnosti přepravovat estradiol- β -D-glukoronid, zatímco transport leukotrienu C₄ je zachován (Ito *et al.*, 2001). Nízká frekvence (<1 %) přirozeně působících mutací, které mají za následek aminokyselinové substituce v cytoplazmatické oblasti MRP1, souvisí s funkčními odlišnostmi v organickém aniontovém transportu a lékové rezistenci (Conrad *et al.*, 2002). Proto někteří jednotlivci mohou být více vnímaví k souboru xenobiotik než jiní (van der Deen *et al.*, 2005).

V genu MRP1 bylo identifikováno mnoho SNP. Většina těchto studií byla provedena v jedné populaci, která byla zejména čínská, japonská nebo původem bělošská. Proto dosud nebyla pozorována žádná jednoznačná asociace mezi polymorfismy v MRP1 a funkčními rozdíly (Wang *et al.*, 2006).

2. 3. 5 Substrátová specifita proteinového transportéru ABCC1/MRP1

Tento protein má neobvykle širokou substrátovou specifitu. Transportuje různé hydrofobní komponenty, organické aniontové konjugáty, aniontové nekonjugované substance. Transportní mechanismus MRP1 je komplexní. Složené substrátové vazebné místo dovoluje kooperativitu i kompetici mezi různými substráty (Bacos *et Homolya*, 2007).

MRP1 transportuje různé konjugáty glutathionu, glukoronátu a sulfátu s hydrofobními endogenními substancemi a xenobiotiky (Jedlitschky *et Keppler*, 2002). Mezi typické sulfátové konjugáty patří cysteinyl leukotrien LTC₄, estradiol- β -D-glukoronid, estradiol a sulfátové žlučové kyseliny (Bacos *et Homolya*, 2007).

MRP1 také transportuje nemodifikované hydrofobní složky jako jsou chemoterapeutická činidla a aflatoxin B1. Ukázalo se, že transport některých těchto komponent je nezávislý na přítomnosti redukovaného glutathionu (GSH). GSH stimuluje transport konjugovaných komponent zahrnující sulfáty a glukoronidy (Deeley *et Cole*, 2006).

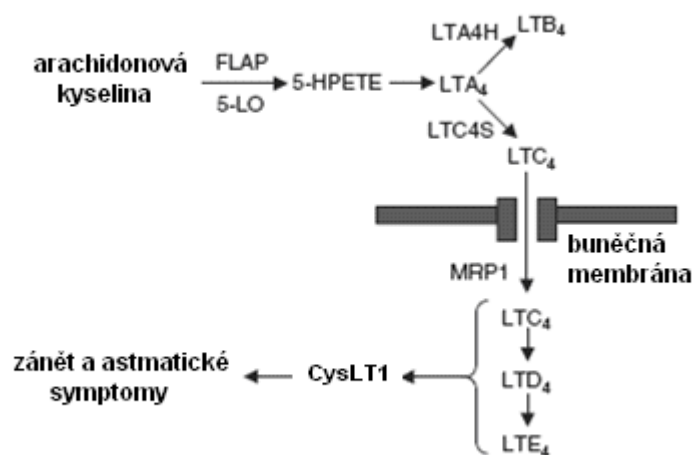
Mnoho studií bylo zaměřeno na xenobiotika kvůli potencionální roli MRP1 v klinické lékové rezistenci a ochraně před širokým spektrem environmentálních toxinů. Identifikace exogenních substrátů MRP byla mnohdy založena na stanovení jejich schopnosti udělovat rezistenci kandidátním cytotoxickým lékům a xenobiotikům.

Podobné studie mají sledovat buněčnou akumulaci a tok radioaktivně nebo fluorescenčně značených xenobiotik a endobiotik (Deeley *et al.*, 2006).

MRP1 může udělovat rezistenci nejen mnoha běžně používaným neutrálním chemoterapeutickým činidlům, podobně jako P-gp, ale také různým aniontovým konjugátům, jako jsou methotrexát, určité těžké kovové oxidanty (arsenické, antimonité) a antiandrogeny (flutamid) (Bacos *et Homolya*, 2007). První MRP1 substrát identifikovaný *in vitro* transportními studiemi byl prozánětlivý mediátor LTC₄, který zůstává nejlépe charakterizovaným fyziologickým substrátem tohoto proteinu (Deeley *et al.*, 2006). MRP1 je transportér s vysokou afinitou pro cysteinyl leukotrien C₄, který je zodpovědný za systémové uvolnění cytokinů v odpovědi na zánětlivé stimuly (Deeley *et Cole*, 2006).

Cysteinyl leukotrieny jsou důležité prozánětlivé mediátory zapojené v patogenezi astmatu, mající za následek bronchokonstrikci (Currie *et al.*, 2003).

Leukotrieny (LT) jsou lipidové mediátory (Lima, 2007) vyskytující se v buňkách asociovaných s astmatem, jako jsou eosinofily a žírné buňky (Wenzel, 2003). LT jsou syntetizovány z arachidonové kyseliny lokalizované v membránových fosfolipidech pomocí činnosti fosfolipázy A v odpovědi na stimulaci. LT jsou klasifikovány do dvou tříd: LTB₄ a CysLT (Lima, 2007). LTB₄ je chemoatraktant pro neutrofile a eosinofily (Wenzel, 2003). CysLT je potencionální bronchokonstrikční mediátor astmatického zánětu (Lima 2007). Cysteinyl leukotrieny, LTC₄, LTD₄ a LTE₄ spouští kontrakci a zánětlivé odpovědi přes specifické interakce s receptory spřaženými s G proteiny (Capra *et al.*, 2007), CysLT1 a CysLT2. LTC₄ je transportován do extracelulárního prostoru převážně MRP1 a přeměněn na LTD₄ a LTE₄ γ -glutamyltransferázou a dipeptidázou (Obr. 5) (Lima, 2007). 5-lipoxygenáza (5-LO) je klíčovým enzymem biosyntézy leukotrienů (Ramires *et al.*, 2004). Zileuton a antagonisté leukotrienů jako je například montelukast blokují činnost CysLT kompetitivní inhibicí 5-LO a CysLT1 receptoru (Lima 2007; Ramires *et al.*, 2004).



Obr. 5: Schéma leukotrienové dráhy zobrazující tvorbu a činnost cysteinyl leukotrienů.

Arachidonová kyselina je přeměněná na LTA_4 v membráně vázanou 5-lipoxygenázou a 5-LO aktivačním proteinem (FLAP). U lidských žírných buněk, basofilů, eosinofilů a makrofágů, LTA_4 je přeměněn LTA_4 hydrolázou (LTA4H) na LTB_4 nebo je redukován LTC_4 glutathion syntázou (LTC4S) na formu LTC_4 . LTC_4 je transportován do extracelulárního prostoru MRP1 transportérem a přeměněn na LTD_4 a LTE_4 . LTC_4 , LTD_4 a LTE_4 tvoří CysLT, které přes receptor CysLT1 vyvolávají zánět a astmatické symptomy.

Upraveno podle:

Lima, J. J. (2007): Treatment heterogeneity in asthma: genetics of response to leukotriene modifiers. *Mol. Diagn. Ther.* 11: 97-104.

3 Cíle práce

- 1) Výběr kandidátních jednonukleotidových polymorfismů v genech ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1.
- 2) Zoptimalizování metodiky studia polymorfismů (SNP) pomocí alelově diskriminační polymerázové řetězové reakce (PCR) v reálném čase s využitím TaqMan sond.
- 3) Ověření určitých vybraných SNP sekvenční analýzou.
- 4) Provedení vlastní genotypizace na přiděleném souboru pacientů a kontrol.
- 5) Vyhodnocení experimentální práce a srovnání zjištěných výsledků s literárními údaji.

4 Materiál a metodika

4.1 Laboratorní vybavení

- analytická váha: BBC 32, BOECO Germany
- centrifugy: FORCE 1418, Labnet (max. 14 000 rpm)
IEC Multi RF, Thermo IEC (max. 4000 rpm)
Janetzki S70 (max. 6 000 RPM)
MPW-310, Mechanika Precyzyjna Warszawa
Spectrafuge 7M, Labnet (max. 10 000 RPM)
- centrifuga - třepačka: Combi-Spin, BIOSAN EAST PORT (2 400 rpm)
- elektroforetická komora: SUB-CELL[®] GT, BIORAD
JSB-30, Shelton Scientific
- Flow box: Telstar Mini-V/PCR
- horkovzdušný sterilizátor: HS 122 A, ZPA Dukla Prešov
- kapilární elektroforéza: ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyser, AB Applied Biosystemes
- lednice: Zanussi
- mikrovlnná trouba: Elektrolux
- mrazáky: Elektrolux (-26 °C)
PMA 315 BL (-18 °C)
Zanussi (-18 °C)
- pipety: Eppendorf Research (2,5 µl)
Labmate (2 µl, 20 µl, 200 µl)
Pipetman Gilson (2 µl, 200 µl)
- QPCR systém: Mx3005P[™] QPCR Systems, Stratagene
Smart Cycler, Cepheid
- spektrofotometr: Life Science UV/Vis Spectrophotometer DU[®] 530,
BECKMAN COULTER[™]
- termocykler: Gradient Cycler, DNA Engine, PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research
- termostat: TV51 Laboratorní přístroje Praha
- transluminátor: TRANSILLUMINATOR UPV
- zdroje napětí: PowerPac Basic 041, BIORAD

4. 2 Soubor vyšetřovaných pacientů

Ke zjištění polymorfismů v genech ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 sloužila DNA izolovaná z leukocytů periferní krve. Vlastní genotypizace SNP byla provedena pomocí alelově diskriminační/SNP PCR v reálném čase (real-time PCR) s využitím TaqMan sond. Pro ověření správnosti rozlišení genotypů jednotlivých polymorfismů bylo provedeno sekvencování příslušných úseků genů ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 u vybraných probandů.

Vyšetření, které podstoupilo 116 dětských astmatiků, jejich nejbližší rodinní příbuzní (rodiče a sourozenci) celkově 256 osob a 86 zdravých kontrol, probíhalo na Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci ve spolupráci s doc. MUDr. Františkem Kopřivou, Ph.D. z Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci. Pacienti, sourozenci pacientů a kontroly, jakož i jejich rodiče byli zařazeni do studie na základě informovaného souhlasu zákonných zástupců dětských pacientů a kontrol.

Pacienti s diagnózou Persistující asthma bronchiale středně těžkého typu dle the Global Initiative For Asthma (GINA 2006) 2006 byli rozděleni dále do skupin podle léčby (Tab. I):

1. bez terapie
2. léčba antileukotrieny – montelukast (LTRA)
3. inhalační kortikosteroidy (GC)
4. ostatní - kombinace inhalačními kortikosteroidy a antileukotrieny.

Tab. I: Popis pacientů s různými druhy léčby.

Terapie	N (%)	Věk v letech medián (5-95%)	Pohlaví % žen
Bez terapie	74 (41.8%)	10.0 (3.0; 19.5)	36.5%
LTRA	57 (32.2%)	14.0 (6.3; 20.4)	31.6%
GC	21 (11.9%)	14.5 (6.0; 19.0)	19.0%
Ostatní ¹	25 (14.1%)	15.0 (7.0; 20.9)	40.0%

Vysvětlivky:¹ m-t GC (H d.d.) nebo syst. GC nebo m-t GC (L,M,H d.d.) + LTRA

N – počet osob s diagnózou Persistující asthma bronchiale středně těžkého typu v procentech

V tabulce I jsou uvedeny základní charakteristiky jednotlivých podskupin. Z tabulky je zřejmá převaha pacientů mužského pohlaví, což je v souladu s literaturou.

4. 3 Metody

4. 3. 1 Izolace DNA Millerovou metodou

- 1) 10 ml periferní krve ve 300 µl EDTA o pH = 8.
- 2) Krev přelít do kyvety (50 ml zkumavka), přidat 30 ml LB pufru a nechat lyzovat na ledu 45 min.
- 3) Po lýzi krev centrifugovat 20 min. při 2200 rpm.
- 4) Slít supernatant.
- 5) Přidat 10 ml LB pufru, sediment důkladně s LB pufrem protřepat a centrifugovat 10 min. při 2200 rpm.
- 6) Slít supernatant.
- 7) 3 ml NLB přidat k sedimentu, promíchat a sediment kvantitativně přenést do modré zkumavky (jednorázová sterilní 10 ml zkumavka).
- 8) Přidat 50 µl proteinázy K (20µg/µl), 150 µl 20% SDS a důkladně protřepat.
- 9) Nechat inkubovat přes noc v termostatu při teplotě 37 °C.
- 10) Přidat 1000 µl NaCl (6 mol/l) a 15 s protřepat.
- 11) Centrifugovat 15 min. při 4000 rpm.
- 12) Supernatant slít do modré zkumavky (10 ml), centrifugovat 15 s při 2500 rpm, až je roztok čirý.

- 13) Supernatant slít do modré zkumavky (15 ml), zalít 100% ethanolem a nechat vysrážet DNA.
- 14) „Medůzku“ DNA přenést do mikrozukavky se 70% ethanolem, protřepat a centrifugovat 5 min. při 8000 rpm.
- 15) Opatrně slít 70% ethanol a ponechat samovolně vyschnout.
- 16) Rozpustit DNA v 500 µl TE pufru.

LB: Lysisbuffer: 155 mmol/l NH₄Cl.....8,825 g
 10 mmol/l KHCO₃.....1,001 g
 1 mmol/l EDTA..... 0,372 g nebo 2 ml 0,5 mol/l EDTA
 pH 7,3 – 7,4 upravené přidáním cca 800 µl koncentrovaného NaOH
 doplnit destilovanou vodou do 1 l

NLB: Nucei lysisbuffer: 400 mmol/l NaCl.....23,376 g
 10 mmol/l Tris-HCl.....1,211 g
 2 mmol/l EDTA.....0,745 g
 pH 7,3 – 7,4
 doplnit destilovanou vodou do 1 l

TE: TRIS 7,5.....2,5 ml
 0,5 mol/l EDTA.....0,5 ml
 doplnit destilovanou vodou do 250 ml

4. 3. 2 Genotypizace

4. 3. 2. 1 Výběr polymorfismů pro analýzu

Většina jednonukleotidových změn v obou genech ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 má spíše charakter mutací než polymorfismů, protože jejich frekvence se pohybuje pod 1 %. Ostatní změny, které je možno definovat jako polymorfismy, se vyskytují v intronech mimo předpokládané oblasti sestřihu nebo se nachází v exonech,

ale mají charakter tichých mutací (substituce báze v tripletu, která nemění smysl aminokyseliny).

Genotypizace SNP z genu ABCB1/MDR1 (C3435T, T-129C) byla provedena na zakázku Laboratoří experimentální medicíny při Dětské klinice Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc v rámci plnění grantového projektu.

4. 3. 2. 1. 1 Kritéria výběru jednonukleotidových polymorfismů

Pro výběr jednonukleotidových polymorfismů v genech ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 byla stanovena tato kritéria:

- Nejčastěji se vyskytující SNP, u kterých byla v předcházejících studiích nalezena asociace s ovlivněním funkce proteinu
- SNP/jednonukleotidové mutace (o neznámém vlivu na funkci proteinu) v exonech, které kódují tvorbu NBD
- SNP/jednonukleotidové mutace v intronových úsecích přilehlých k exonům tvořících NDB v oblasti exon-intronového spojení a v oblasti asi 20-30 bp před 3'koncem intronu, tedy v evolučně vysoce konzervovaných sekvencích důležitých pro správný sestřih mRNA.

4. 3. 2. 1. 2 Seznam vybraných polymorfismů pro analýzu

Pro hledání konkrétních jednonukleotidových polymorfismů v genech ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1, byly použity referenční SNP (Obr. 6, 7) z databáze NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Přehled zjišťovaných SNP v genech ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 s jejich identifikačními čísly je uveden v tabulce II a III.

- Polymorfismy sledované v genu ABCB1/MDR1 jsou uvedeny v tabulce II a referenční SNP jsou znázorněny na obrázku 6.

Tab. II: Přehled SNP genu ABCB1/MDR1 a jejich identifikační čísla v databázi NCBI.

Název SNP	Varianta alely	Pozice v genu	Identifikační číslo v NCBI
C3435T	C/T	exon 26	rs1045642
T-129C	T/C	exon 1	rs3213619
E14-SNP1	A/G	exon 14	rs28381902
E26-SNP2	G/C	exon 26	rs41309228
E26-SNP4	G/A	exon 26	rs41309225
In11-SNP2	C/T	intron 11	rs28381896

Obř. 6: Referenční SNP genu ABCB1/MDR1 uvedené v databázi NCBI.

C3435T

AGCCGGGTGGTGTACAGGAAGAGAT[C/T]GTGAGGGCAGCAAAGGAGGCCAACA

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs1045642>

T-129C

CCACAGGAAGCCTGAGCTCATTCGAG[C/T]AGCGGCTCTCCAAGCTCAAAGAAG

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs3213619>

E14-SNP1

CCACGTCAGCCTTGGACACAGAAAGC[A/G]AAGCAGTGGTTCAGGTGGCTCTGGA

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs28381902>

E26-SNP2

CAATCTTCTCCTGTGACACCACCCGG[A/C]TGTTGTCTCCATAGGCAATGTTCTC

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs41309228>

E26-SNP4

CTGAACATTTCAGTCGCTTTATTTCTT[C/T]GCCATCAAGCAGCTGAAAACAAGAG

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs41309225>

In11-SNP2

AGTTCCTATATCCTGTGTCTGTGAAT[C/T]GCCTTGAAGTTTTTTTCTCACTCGT

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs28381896>

- Polymorfismy vybrané v genu ABCC1/MRP1 jsou uvedeny v tabulce III a referenční SNP jsou znázorněny na obrázku 7.

Tab. III: Přehled SNP genu ABCC1/MRP1 a jejich identifikační čísla v databázi NCBI.

Název SNP	Varianta alely	Pozice v genu	Identifikační číslo v NCBI
E16-SNP1	T/G	exon 16	rs45511401
E17-SNP1	A/G	exon 17	rs4148356
E28-SNP1	G/A	exon 28	rs28364006
E29-SNP1	T/C	exon 29	rs8057331
In18-SNP2	G/C	intron 18	rs2074087

Obr. 7: Referenční SNP genu ABCC1/MRP1 uvedené v databázi NCBI.

E16-SNP1

CAGCATCACCTTCTCCATCCCCGAAG[G/T]TGCTTTGGTGGCCGTGGTGGGCCAG

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs45511401>

E17-SNP1

GGCCTGGATTGAGAATGATTCTCTCC[A/G]AGAAAACATCCTTTTTGGATGTCAG

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs4148356>

E28-SNP1

GGACGGGAGCTGGGAAGTCGTCCCTG[A/G]CCCTGGGCTTATTTTCGGATCAACGA

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs28364006>

E29-SNP1

CCAGTACTCGGATGAAGAAGTCTGGA[C/T]GTCCCTGGAGCTGGCCACCTGAAG

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs8057331>

In18-SNP2

GCTAGGCAGTCTCACACATGTGCACT[C/G]ACGTGGCCGGGTGTCCCCTTTGCC

Převzato z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs2074087>

4. 3. 2. 2 Optimalizace teplotních podmínek pro PCR v reálném čase pomocí Smart Cycleru

Genotypizace SNP byla provedena pomocí alelově diskriminační/SNP PCR v reálném čase s využitím TaqMan sond. Pro zjištění optimální teploty annealingu (nasedání primerů a sond) byly vybrány pro každý polymorfismus všechny pozorované genotypy. Smart Cycler (Cepheid) umožňuje zajistit rozdílnou teplotu annealingu pro každou reakční směs zvlášť. Optimalizace probíhala při pěti různých teplotách: 54 °C, 57 °C, 60 °C, 62 °C, 66 °C. To znamená, že pro každý genotyp byl sledován charakter a průběh křivek při těchto pěti teplotách.

Reakce probíhala ve speciální 25 µl propylenové zkumavce s optickým okénkem pro snímání fluorescence po jednotlivých cyklech PCR.

Složky reakční směsi (15 µl):

9,91 µl PCR vody (Top-Bio)

0,01 µl Rox (Applied Biosystems)

0,27 µl Probe Assay (Applied Biosystems)

0,71 µl DNA (100 ng/µl)

Podmínky amplifikace:

Pro annealing při 54 °C: 15 min. 95 °C (15 s 95 °C, 60 s 54 °C)_{55x}

Pro annealing při 57 °C: 15 min. 95 °C (15 s 95 °C, 60 s 57 °C)_{55x}

Pro annealing při 60 °C: 15 min. 95 °C (15 s 95 °C, 60 s 60 °C)_{55x}

Pro annealing při 62 °C: 15 min. 95 °C (15 s 95 °C, 60 s 62 °C)_{55x}

Pro annealing při 66 °C: 15 min. 95 °C (15 s 95 °C, 60 s 66 °C)_{55x}

4. 3. 2. 3 Alelově diskriminační/SNP PCR v reálném čase

Alelově diskriminační/SNP PCR v reálném čase byla s využitím komerčně dostupných nebo na objednávku dodaných fluorescenčně značených TaqMan sond (Applied Biosystems). TaqMan sondy komerčně dostupné v databázi Applied Biosystems (<https://products.appliedbiosystems.com>) byly dodány bez uvedení sekvence sondy. V tabulce IV jsou uvedeny kontextové sekvence SNP a fluorofory, kterými byly TaqMan sondy označeny pro jednotlivé alely. SNP, pro které v databázi

nebyly uvedeny TaqMan sondy, byly zadány s kontextovou sekvencí do programu File Builder v3.1. Tyto TaqMan sondy dodané firmou Applied Biosystems na objednávku byly dodány s uvedenou sekvencí sond (Tab. V).

Pomocí real-time PCR (allele discrimination assay) na přístroji Mx3005P™ QPCR Systems (Stratagene) byla získána data o genotypech v sledované populaci astmatických pacientů a kontrol.

Pro vyhodnocení průběhu a výsledku reakce byl využit software: MxPro - Mx3005P v3.00 Build 311, přičemž se bralo v potaz několik věcí:

- Velikost C_t
- Hodnocení křivek snímané fluorescence – velikost, tvar, průběh
- Každý genotyp má specifický tvar a průběh křivek

Tab. IV: Kontextové sekvence SNP a fluorofory TaqMan sond.

Gen	SNP	Alela	fluorofor	Kontextová sekvence	Teplota annealingu
ABCB1/	E14-SNP1	A	Vic	ACCTGAACCACTGCTT[A]GCTTTCTGTGTCCA	60 °C
		G	Fam	ACCTGAACCACTGCTT[G]GCTTTCTGTGTCCA	
MDR1	E17-SNP1	A	Vic	CAGAATGATTCTCTCC[A]AGAAAACATCCTTT	60 °C
		G	Fam	CAGAATGATTCTCTCC[G]AGAAAACATCCTTT	
ABCC1/	E29-SNP1	C	Vic	ATGAAGAAGTCTGGA[C]GTCCCTGGAGCTGG	60 °C
		T	Fam	ATGAAGAAGTCTGGA[T]GTCCCTGGAGCTGG	
MRP1	In18-SNP2	C	Vic	CTCACACATGTGCACT[C]ACGTGGCCGGGTG	60 °C
		G	Fam	CTCACACATGTGCACT[G]ACGTGGCCGGGTG	

Tab. V: Přehled TaqMan sond s uvedenou sekvencí.

Gen	SNP	Alela	fluorofor	Sekvence TaqMan sondy	Teplota annealingu
ABCB1/ MDR1	E26-SNP2	C	Vic	CCACCCGG[C]TGTTGT	60 °C
		A	Fam	CACCCGG[A]TGTTGT	
	E26-SNP4	A	Vic	CTTGATGGC[A]AAGAA	60 °C
		G	Fam	CTTGATGGC[G]AAGAA	
	In11-SNP2	C	Vic	TCGTCCTG[C]TAGATCT	60 °C
		T	Fam	TCGTCCTG[T]TAGATCT	
ABCC1/ MRP1	E16-SNP1	G	Vic	CCCGAAG[G]TGCTTT	62 °C
		T	Fam	CCCGAAG[T]TGCTTT	
	E28-SNP1	A	Vic	TCCCTG[A]CCCTGGGCT	60 °C
		G	Fam	CCTG[G]CCCTGGGCT	

Složky reakční směsi (11 µl):

7,29 µl PCR vody (Top-Bio)

0,01 µl Rox (Finnzymes)

0,20 µl TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems)

3 µl DyNAmo™ qPCR Kits (Finnzymes)

0,5 µl DNA (100 ng/µl)

Podmínky amplifikace:

Pro annealing při 60 °C: 15 min. 95 °C (15 s 95 °C, 60 s 60 °C)_{55x}

Pro annealing při 62 °C: 15 min. 95 °C (15 s 95 °C, 60 s 62 °C)_{55x}

4. 3. 2. 4 Sekvenační reakce

Pro kontrolu správnosti diskriminace genotypů jednotlivých polymorfismů byla provedena sekvenace příslušných úseků genů ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 u vybraných probandů.

4. 3. 2. 4. 1 Návrh sekvenačních primerů

K návržení primerů byl použit program Oligo Explorer -1. 1. 0. Podle něj bylo určeno 6 párů sekvenačních primerů (r-reverse, f-forward) (viz Tab. VI).

Tab. VI.: Sekvence použitých primerů.

Označení primeru	Sekvence primeru
E26-SNP2,4-f	5'-CTTGGCAGTTTCAGTG-3'
E26-SNP2,4-r	5'-GTAAGGGTGTGATTTGG-3'
E16-SNP1-f	5'-TCAGCAGTAGAAATGGAAG-3'
E16-SNP1-r	5'-CCAAAATCCTGCCTTCTAG-3'
E17-SNP1-f	5'-GCATCTGTTGTCCTTTGTG-3'
E17-SNP1-r	5'-AGTGAGACCTGAGCCACACC-3'
E28-SNP1-f	5'-CGAGTCATTCCTTTTGGG-3'
E28-SNP1-r	5'-CTAGGGCCAAATGTATGTTT-3'
E29-SNP1-f	5'-CGAGTCATTCCTTTTGGG-3'
E29-SNP1-r	5'-GGACAGAATCTTCAAACACC-3'
In18-SNP2-f	5'-TGTTTCGTCGGCTCATTC-3'
In18-SNP2-r	5'-GGTGGTTTTCCACATTGCT-3'

4. 3. 2. 4. 2 Optimalizace PCR podmínek

Při optimalizaci PCR podmínek byl použit kit Top-Bio, Combi PPP Master Mix (0,01% Tween 20, 75 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8, 20 mmol/l (NH₄)₂SO₄, 200 μmol/l dATP, 200 μmol/l dTTP, 200 μmol/l dCTP, 200 μmol/l dGTP, 2,5 mmol/l MgCl₂, 50 U/ml Taq Purple polymeráza, stabilizátory, monoklonální protilátka anti-Taq (19 nmol/l), aditiva). Pro jednotlivé primery bylo zkoušeno teplotní optimum v rozmezí od 52 °C do 65 °C.

Pro primery E16-SNP1-f/r, E17-SNP1-f/r, E28-SNP1-f/r, E29-SNP1-f/r o koncentraci 10 pmol/μl byla stanovena teplota pro připojení primeru (annealing temperature) při 54,0 °C. Zoptimalizované podmínky amplifikace: 5 min. 95 °C

(30 s 94 °C, 30 s 54 °C, 90 s 72 °C)_{10x} (30 s 90 °C, 30 s 54 °C, 90 s 72 °C)_{25x} 10 min. 72 °C, 10 °C.

Pro primery In18-SNP2-f/r o koncentraci 10 pmol/μl byla stanovena teplota pro připojení primeru (annealing temperature) při 60,0 °C. Zoptimalizované podmínky amplifikace: 5 min. 95 °C (30 s 94 °C, 30 s 60 °C, 90 s 72 °C)_{10x} (30 s 90 °C, 30 s 60 °C, 90 s 72 °C)_{25x} 10 min. 72 °C, 10 °C.

Pro primery E26-SNP2,4-f/r o koncentraci 10 pmol/μl byla stanovena teplota pro připojení primeru (annealing temperature) při 56,0 °C. Zoptimalizované podmínky amplifikace: 5 min. 95 °C (30 s 94 °C, 30 s 56 °C, 90 s 72 °C)_{10x} (30 s 90 °C, 30 s 56 °C, 90 s 72 °C)_{25x} 10 min. 72 °C, 10 °C.

Elektroforetická separace PCR produktů probíhala v 1,5% agarózovém gelu 30 - 40 min. při 88 V.

4. 3. 2. 4. 3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

4. 3. 2. 4. 3. 1 PCR reakce s kitem

PCR reakce byla provedena s použitím kitu Top-Bio, Combi PPP Master Mix (viz kapitola 4. 3. 2. 4. 2). Tímto způsobem bylo syntetizováno všech 7 lokusů, které jsou určeny primery (viz Tab. VI., kapitola 4. 3. 2. 4. 1).

Složky reakční směsi (30 μl):

15 μl Combi PPP Master Mix (Top-Bio)

12,36 μl PCR vody (Top-Bio)

0,72 μl primeru f (10 pmol/μl)

0,72 μl primeru r (10 pmol/μl)

1,2 μl DNA (100 pmol/μl)

Podmínky amplifikace:

viz kapitola 4. 3. 2. 4. 2

4. 3. 2. 4. 4 Gelová agarózová elektroforéza

Pro ověření efektivity PCR před sekvencováním. DNA fragmenty vzniklé PCR reakcí se běžně separují pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

Na elektroforézu PCR produktů byl použitý 1,5% agarózový gel s EtBr (5 μ l 10 mg/ml EtBr na 100 ml gelu) a TBE pufr. Do jamek v gelu bylo pipetováno 20 μ l z 30 μ l PCR produktu. Elektroforetická separace probíhala při 88 V 30 – 40 min.

TBE pufr: 54 g Tris-(hydroxymetyl)-aminometan

27,5 g kyselina boritá

2 ml 0,5 M EDTA

5 l destilovaná voda

4. 3. 2. 4. 5 Přečištění PCR produktů (post-PCR purifikace)

Přečištění PCR produktů bylo provedeno podle protokolu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagene).

- 1) K 10 μ l PCR produktu přidat 50 μ l PB pufru a důkladně protřepat.
- 2) Vzorek s PB pufrům přenést do QIAquick kolonky umístěné v 2 ml zkumavce.
- 3) Centrifugovat 60 s při 12 000 rpm.
- 4) Vylít obsah 2 ml zkumavky a QIAquick kolonku do ní opět vložit.
- 5) Do QIAquick kolonky přidat 750 μ l PE pufru.
- 6) Centrifugovat 60 s při 12 000 rpm.
- 7) Obsah 2 ml zkumavky vylít a QIAquick kolonku do ní zpět umístit.
- 8) Centrifugovat 60 s při 12 000 rpm.
- 9) QIAquick kolonku umístit do 1,5 ml zkumavky, na střed membrány QIAquick kolonky přidat 50 μ l EB pufru.
- 10) Centrifugovat 60 s při 12 000 rpm.

4. 3. 2. 4. 6 Sekvence PCR produktů

Sekvenační reakce byla provedena s použitím sekvenačního kitu ABI PRISM[®] Big Dye[®] Terminator v 3. 1 s fluorescenčně značenými ddNTP (ddATP, ddCTP,

ddGTP, ddTTP). Sekvenační kit byl ředěný sekvenačním pufrům (ABI PRISM[®] Big Dye[®] Terminator v 1. 1, v 3. 1, 5x sequencing buffer) v poměru 1 : 11.

Složky reakční směsi (10 μ l):

4 μ l ředěného sekvenačního kitu

3 μ l PCR vody (Top-Bio)

2 μ l primeru o koncentraci 10 pmol/ μ l (v jednotlivých reakcích samostatně buď f nebo r primer, ne spolu)

1 μ l DNA templátu (přečištěný PCR produkt)

Podmínky sekvencování:

30 s 94 °C (10 s 96 °C, 1 °C/s – 50 °C, 5 s 50 °C, 4 min. 60 °C)_{34x} 10 °C

4. 3. 2. 4. 7 Přečištění sekvenačních produktů (post-sekvenační purifikace)

- 1) K sekvenomům (10 μ l produktů po sekvenační PCR) přidat 2 μ l NaOAc/EDTA pufru (acetát sodný/EDTA pufr), promíchat.
- 2) Přidat 25 μ l absolutního ethanolu.
- 3) Krátce, ale důkladně promíchat (vortex).
- 4) Centrifugace 30 min. při 15 000 rpm.
- 5) Opatrně odsát supernatant, přidat 50 μ l 80% ethanolu, nepromíchat.
- 6) Centrifugovat 5 min. při 15 000 rpm.
- 7) Opatrně odpipetovat supernatant a dát do otevřené mikrozkušavky vysoušet do trouby 10 min. při 50 °C.
- 8) Připipetovat 20 μ l formamidu, ponechat stát 3h až den, nebo promíchat, „odškrábat“ a protřepat.
- 9) Přenést do zkumavek určených k nasazení do přístroje pro kapilární elektroforézu a uzavřít pryží.

NaOAc/EDTA pufr: 1,5 mol/l NaOAc.....1 ml

250 mmol/l EDTA.....1,3 ml

4. 3. 2. 4. 8 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza sekvenačních fragmentů probíhala v automatickém sekvenátoru ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Kapilára analyzátoru byla 47 cm dlouhá s průměrem 50 μm a plněná gelem POP4 (Applied Biosystems). Směs přečištěného sekvenačního produktu s 20 μl Hi Di formamidu (Applied Biosystems) byla 3 - 5 min. denaturována při 95 °C, ihned zchlazena na ledu a aplikována do kapiláry sekvenátoru. Při průchodu kapilárou byly fluorescenční barvy ddNTPs excitovány laserem. Pro odlišení jednotlivých ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) byly použity čtyři různé fluorescenční barvy, které po excitaci laserem emitovaly světlo o čtyřech různých vlnových délkách. Získaná data byla vyhodnocena pomocí speciálního softwaru Sequencing Analysis.

4. 3. 2. 4. 9 Vyhodnocení získaných sekvencí

Jednotlivé sekvence genů ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 získané sekvenační analýzou byly hodnoceny pomocí programu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Jako referenční byly použity dvě sekvence.

První byla referenční sekvence AC_000050.1 z databáze NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) pro gen ABCB1/MDR1.

Druhou byla referenční sekvence AC_000059.1 z databáze NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) pro gen ABCC1/MRP1.

4. 3. 3 Statistické zpracování dat

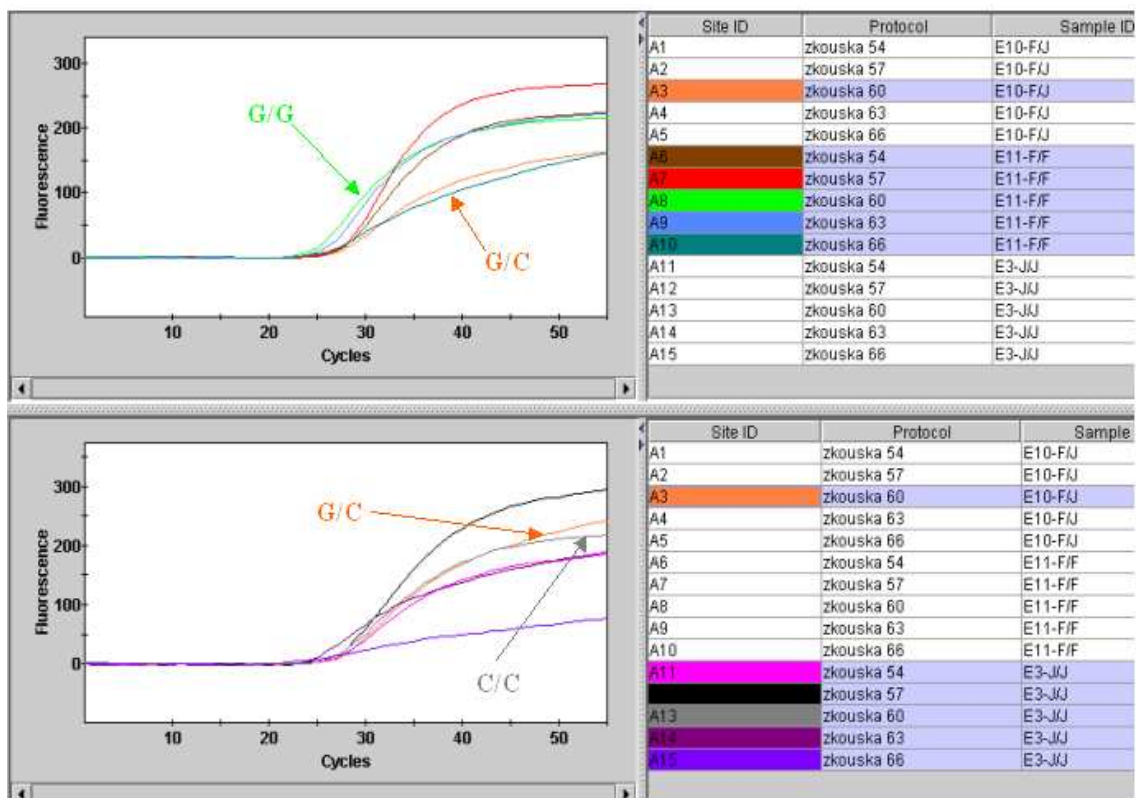
Zpracování dat bylo provedeno ve spolupráci s Institutem biostatistiky a analýz při MU v Brně doc. RNDr. Ladislavem Duškem, Ph.D.

Statistické analýzy byly provedeny programem Statistica. Byly použity zejména testy významnosti korelačních koeficientů, parciálních korelačních koeficientů a koeficientů mnohonásobné korelace (Spearmanův a Pearsonův test). Dále byly posuzovány rozdíly v jednotlivých skupinách pomocí ANOVA testu, Fisherova testu, t- testu, chí-kvadrát testu, Tukey post-hoc testu.

5 Výsledky

5.1 Optimalizace teplotních podmínek pro PCR v reálném čase pomocí Smart Cycleru

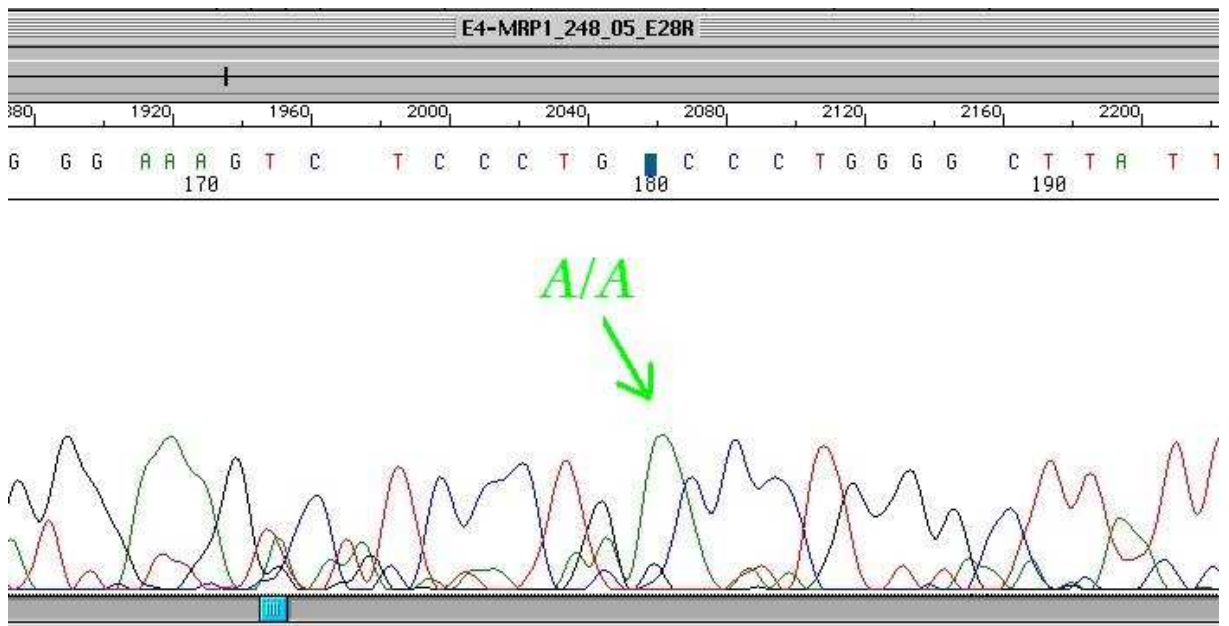
Pro všechny použité TaqMan sondy a primery, kromě TaqMan sondy pro polymorfismus E16-SNP1 v genu ABCC1/MRP1, byla stanovena teplota annealingu při 60,0 °C. Optimální teplota annealingu TaqMan sondy pro polymorfismus E16-SNP1 byla 62,0 °C. Ukázka optimalizace teplotních podmínek pro TaqMan sondy je znázorněna na obrázku 8.



Obr. 8: Ukázka optimalizace teplotních podmínek TaqMan sond konkrétně pro polymorfismus In18-SNP2 (rs2074087) genu ABCC1/MRP1 při 60,0 °C.

5. 2 Sekvenační analýza genů ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1

Pro kontrolu správnosti diskriminace genotypů jednotlivých polymorfismů byla provedena sekvenace příslušných úseků genů ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 u příslušných genotypů (ukázka výstupu viz obrázek 9). Tyto sekvence se shodovaly s danými alelodiskriminačními křivkami z real-time PCR.



Obr. 9: Ukázka výstupu z real-time PCR konkrétně polymorfismus E28-SNP1 (rs28364006) v genu ABCC1/MRP1.

Na obrázku je zobrazen grafický výstup při vyhodnocování výsledků po kapilární elektroforéze vzorků sekvenační reakce. V tomto případě je zobrazen polymorfismus E28-SNP1 v genu pro ABCC1/MRP1. Šipkou je vyznačeno místo polymorfismu a zároveň je zapsán i konkrétní genotyp ve vyšetřovaném vzorku. Zobrazená sekvence odpovídá f (forward) řetězci DNA. Tento pacient je tedy pro daný lokus homozygot.

5. 3 Alelově diskriminační/SNP PCR v reálném čase

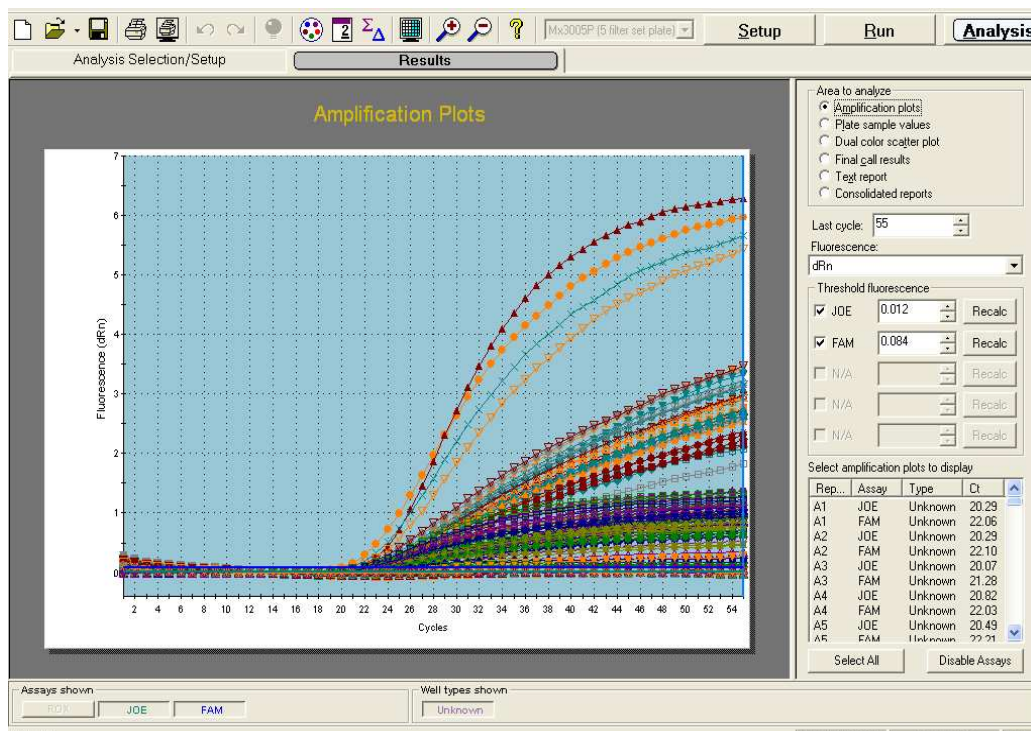
Námi bylo hodnoceno celkem 9 polymorfismů. Následující tabulka (Tab.VII) sumarizuje alelické frekvence těchto devíti sledovaných polymorfismů (nejsou tedy uvedeny polymorfismy C3435T a T-129C), přičemž pro určení jednotlivých frekvencí nebyli pacienti rozřizeni do jednotlivých skupin. Pro určení parentálního původu polymorfismů a haplotypů byla provedena genotypizace i u nejbližších příbuzných pacientů.

Tab. VII.: Frekvence alel u pacientů s astmatem a zdravých kontrol pro sledované polymorfismy.

Gen	Označení polymorfismu	Identif.číslo polymorfismu	SNP (Vic/Fam)	Alelická frekvence	
				Kontroly	Astmatici
ABCC1/MRP1	E16 - SNP1	rs45511401	G/T	0,53 : 0,47	0,48 : 0,52
	E17 - SNP1	rs4148356	A/G	0.0 : 1.0	1.0 : 0.0
	E28 - SNP1	rs45544333	A/G	1.0 : 0.0	1.0 : 0.0
	E29 - SNP1	rs8057331	C/T	1.0 : 0.0	1.0 : 0.0
	In18-SNP2	rs2074087	C/G	0,27 : 0,73	0,25 : 0,75
ABCB1/MDR1	E14-SNP1	rs28381902	A/G	1.0 : 0.0	1.0 : 0.0
	In11-SNP2	rs28381896	A/G	1.0 : 0.0	1.0 : 0.0
	E26-SNP2	rs41309228	G/T	1.0 : 0.0	1.0 : 0.0
	E26-SNP4	rs41309225	A/G	1.0 : 0.0	1.0 : 0.0

Alelické a genotypové frekvence bylo možné hodnotit pouze u polymorfismů E16-SNP1 a In18-SNP2 genu ABCC1/MRP1. U ostatních polymorfismů byl nalezen pouze jeden genotyp standardně uváděný v referenční sekvenci (viz kapitola 4. 3. 2. 4. 9). Do statistické analýzy byly proto zahrnuty pouze polymorfismy E16-SNP1 a In18-SNP2 genu ABCC1/MRP1 a dále polymorfismy C3435T a T-129C genu ABCB1/MDR1 (ty byly analyzovány na zakázku viz kapitola 4. 3. 2. 1).

Na obrázku (Obr. 10) je ukázka záznamu průběhu křivek sestavených z fluorescencí odečtených po každém cyklu real-time PCR.



Obr. 10: Ukázka výstupu po real-time PCR konkrétně pro MRP1-E16-SNP1.

5. 4 Frekvenční výskyt alel a genotypů u astmatiků a zdravých kontrol

V tabulce VIII je uvedeno srovnání výskytu alel a genotypů u astmatiků a zdravých kontrol pro polymorfismy E16-SNP1 a In18-SNP2 genu ABCC1/MRP1. U polymorfismů C3435T a T-129C genu ABCB1/MDR1 je uvedena pouze frekvence alel a genotypů u astmatických pacientů. U těchto na zakázku analyzovaných polymorfismů (viz kapitola 4. 3. 2. 1) nebyla provedena kontrola u neastmatických jedinců (zdravých kontrol).

Tab. VIII.: Frekvenční výskyt genetických charakteristik u astmatiků a kontrol.

	Astma ²	Kontrola ²	p ³	
Alely¹	MDR1 c3435	67.0%	-	-
	MDR1 t3435	76.5%	-	-
	MDR1-2 c-129	5.2%	-	-
	MDR1-2 t-129	98.3%	-	-
	MRP1 E16-SNP1 g	85.2%	95.1%	0.026
	MRP1 E16-SNP1 t	87.0%	87.8%	0.897
	MRP1 in18-SNP2 g	100.0%	100.0%	>0.99
	MRP1 in18-SNP2 c	50.9%	52.5%	0.820
Genotypy	MDR1 3435 CC	23.5%	-	-
	MDR1 3435 CT	43.5%	-	-
	MDR1 3435 TT	33.0%	-	-
	MDR1-2 -129 CC	1.7%	-	-
	MDR1-2 -129 CT	3.4%	-	-
	MDR1-2 -129 TT	94.8%	-	-
	MRP1 E16-SNP1 GG	13.0%	12.2%	0.897
	MRP1 E16-SNP1 GT	72.2%	82.9%	0.098
	MRP1 E16-SNP1 TT	14.8%	4.9%	0.026
	MRP1 in18-SNP2 CC	0.0%	0.0%	>0.99
	MRP1 in18-SNP2 CG	50.9%	52.5%	0.820
	MRP1 in18-SNP2 GG	49.1%	47.5%	0.897
Haplotypy	MDR1 paternální CC	4.0%	-	-
	MDR1 paternální CT	44.6%	-	-
	MDR1 paternální TC	3,9%	-	-
	MDR1 paternální TT	47.5%	-	-
	MDR1 maternální CC	4.0%	-	-
	MDR1 maternální CT	32.7%	-	-
	MDR1 maternální TC	3,9%	-	-
	MDR1 maternální TT	59.4%	-	-
	MRP1 paternální GC	17.1%	5.0%	0.01
	MRP1 paternální GG	24.4%	85.0%	< 0.001
	MRP1 paternální TC	7.3%	5.0%	0.390
	MRP1 paternální TG	51.2%	5.0%	< 0.001
	MRP1 maternální GC	7.3%	0.0%	0.099
	MRP1 maternální GG	46.3%	20.0%	0.026
	MRP1 maternální TC	14.6%	0.0%	0.005
	MRP1 maternální TG	31.7%	80.0%	< 0.001

¹ podíl pacientů s danou alelou ve skupině pacientů, nejde o alelické frekvence

² procenta jsou spočtena v rámci dané terapie

Na úrovni alelických frekvencí i genotypů byl nalezen statisticky významný rozdíl u polymorfismu E16-SNP1 genu ABCC1/MRP1.

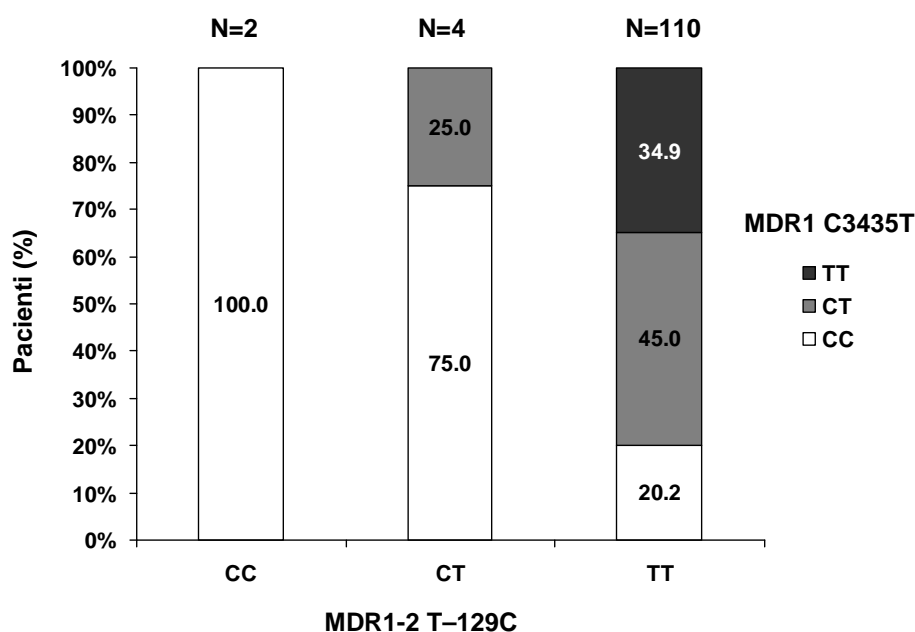
V případě ABCC1/MRP1 in18-SNP2 nebyl u astmatiků ani u kontrol nalezen žádný homozygot CC. Srovnání haplotypů byla provedena pouze u SNP z genu MRP1. Zde byly nalezeny rozdíly téměř u všech sledovaných haplotypů (viz Tab. VIII).

5.5 Vzájemný vztah mezi jednotlivými polymorfismy

V tabulce IX je uvedena významnost vztahu mezi genotypy statisticky hodnocených polymorfismů. Hodnocení bylo provedeno Chi-square testem maximální věrohodnosti. Statisticky významně zvýšený nebo snížený výskyt je označen * a tučným písmem. Na obrázku 11 je vyznačen vztah mezi genotypy ABCB1/MDR1 C3435T a MDR1-2 T-129C.

Tab. IX.: Významnost vztahu mezi genotypy.

p	MDR1-2 T-129C	MRP1 E16-SNP1	MRP1 in18-SNP2
MDR1 C3435T	0.015*	0.861	0.548
MDR1-2 T-129C		0.631	0.127
MRP1 E16-SNP1			0.159



Obr. 11: Vztah mezi genotypy MDR1 C3435T a MDR1-2 T-129C.

5. 6 Vztah genetických charakteristik pacientů s astmatem a jejich terapií

V tabulce X je zaznamenán vztah genetických charakteristik astmatiků k jejich terapii. Statisticky významně zvýšený nebo snížený výskyt je označen * a tučným písmem.

Tab. X.: Vztah genetických charakteristik pacientů s astmatem k jejich terapii.

		Bez terapie²	LTRA²	GC²	Ostatní^{1, 2}
Alely³	MDR1 c3435	63.0%	65.1%	100.0% *	60.0%
	MDR1 t3435	87.0% *	69.8%	54.5%	80.0%
	MDR1-2 c-129	2.1%	7.0%	18.2%	0.0%
	MDR1-2 t-129	100.0%	95.3%	100.0%	100.0%
	MRP1 E16-SNP1 g	82.2%	90.5%	83.3%	81.3%
	MRP1 E16-SNP1 t	93.3%	85.7%	75.0%	81.3%
	MRP1 in18-SNP2 t	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	MRP1 in18-SNP2 g	42.2%	53.5%	58.3%	62.5%
Genotypy	MDR1 3435 CC	13.0% *	30.2%	45.5%	20.0%
	MDR1 3435 CT	50.0%	34.9%	54.5%	40.0%
	MDR1 3435 TT	37.0%	34.9%	0.0% *	40.0%
	MDR1-2 -129 CC	0.0%	4.7%	0.0%	0.0%
	MDR1-2 -129 CT	2.1%	2.3%	18.2% *	0.0%
	MDR1-2 -129 TT	97.9%	93.0%	81.8%	100.0%
	MRP1 E16-SNP1 GG	6.7%	14.3%	25.0%	18.8%
	MRP1 E16-SNP1 GT	75.6%	76.2%	58.3%	62.5%
	MRP1 E16-SNP1 TT	17.8%	9.5%	16.7%	18.8%
	MRP1 in18-SNP2 GG	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	MRP1 in18-SNP2 TG	42.2%	53.5%	58.3%	62.5%
	MRP1 in18-SNP2 TT	57.8%	46.5%	41.7%	37.5%
Haplotypy	MDR1 parentální CC	2.4%	5.7%	8.3%	0.0%
	MDR1 parentální CT	41.5%	42.9%	66.7%	38.5%
	MDR1 parentální TT	51.2%	51.4%	16.7% *	53.8%
	MDR1 maternální CC	0.0%	8.6%	8.3%	0.0%
	MDR1 maternální CT	24.4%	37.1%	50.0%	30.8%
	MDR1 maternální TT	70.7%	54.3%	33.3%	61.5%
	MRP1 in18-SNP2 paternální GG	5.9%	33.3%	16.7%	16.7%
	MRP1 in18-SNP2 paternální GT	29.4%	8.3%	33.3%	33.3%
	MRP1 in18-SNP2 paternální TG	0.0%	8.3%	16.7%	16.7%
	MRP1 in18-SNP2 paternální TT	64.7%	50.0%	33.3%	33.3%
	MRP1 in18-SNP2 maternální GG	0.0%	8.3%	16.7%	16.7%
	MRP1 in18-SNP2 maternální GT	35.3%	58.3%	50.0%	50.0%

		Bez terapie²	LTRA²	GC²	Ostatní^{1,2}
Haplotypy	MRP1 in18-SNP2 maternální TG	29.4%	0.0%	16.7%	0.0%
	MRP1 in18-SNP2 maternální TT	35.3%	33.3%	16.7%	33.3%

¹ GC + LTRA (GC – glukokortikoidy; LTRA – leukotrienový antagonisté)

² procenta jsou spočtena v rámci dané terapie, použitým statistickým testem je Fisher-exact test; statisticky významně zvýšený nebo snížený výskyt je vyznačen * a tučným písmem

³ podíl pacientů s danou alelou ve skupině pacientů, nejde o alelické frekvence

5. 7 Rozdíly v zastoupení genetických charakteristik pacientů s různou terapií astmatu vzhledem ke kontrolám

V tabulce XI jsou zaznamenány rozdíly v zastoupení genetických charakteristik pacientů s různou terapií astmatu vzhledem ke zdravým kontrolám. Statisticky významně zvýšený nebo snížený výskyt je označen * a tučným písmem.

Tab. XI.: Rozdíly v zastoupení genetických charakteristik pacientů s různou terapií astmatu vzhledem ke kontrolám.

		Bez terapie^{2,3}	LTRA^{2,3}	GC^{2,3}	Ostatní^{1,2,3}	Kontrola²
Alely⁴	MDR1 c3435	63.0%	65.1%	100.0%	60.0%	-
	MDR1 t3435	87.0%	69.8%	54.5%	80.0%	-
	MDR1-2 c-129	2.1%	7.0%	18.2%	0.0%	-
	MDR1-2 t-129	100.0%	95.3%	100.0%	100.0%	-
	MRP1 E16-SNP1 g	82.2%	90.5%	83.3%	81.3%	95.1%
	MRP1 E16-SNP1 t	93.3%	85.7%	75.0%	81.3%	87.8%
	MRP1 in18-SNP2 g	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	MRP1 in18-SNP2 c	42.2%	53.5%	58.3%	62.5%	52.5%
Genotypy	MDR1 3435 CC	13.0%	30.2%	45.5%	20.0%	-
	MDR1 3435 CT	50.0%	34.9%	54.5%	40.0%	-
	MDR1 3435 TT	37.0%	34.9%	0.0%	40.0%	-
	MDR1-2 -129 CC	0.0%	4.7%	0.0%	0.0%	-
	MDR1-2 -129 CT	2.1%	2.3%	18.2%	0.0%	-
	MDR1-2 -129 TT	97.9%	93.0%	81.8%	100.0%	-
	MRP1 E16-SNP1 GG	6.7%	14.3%	25.0%	18.8%	12.2%
	MRP1 E16-SNP1 GT	75.6%	76.2%	58.3%	62.5%	82.9%
	MRP1 E16-SNP1 TT	17.8%	9.5%	16.7%	18.8%	4.9%
	MRP1 in18-SNP2 CC	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	MRP1 in18-SNP2 CG	42.2%	53.5%	58.3%	62.5%	52.5%
	MRP1 in18-SNP2 GG	57.8%	46.5%	41.7%	37.5%	47.5%

		Bez terapie ^{2,3}	LTRA ^{2,3}	GC ^{2,3}	Ostatní ^{1, 2,3}	Kontrola ²
Haplotypy	MDR1 paternální CC	2.4%	5.7%	8.3%	0.0%	-
	MDR1 paternální CT	41.5%	42.9%	66.7%	38.5%	-
	MDR1 paternální TC	4,9%	0%	8,3%	7,7%	-
	MDR1 paternální TT	51.2%	51.4%	16.7%	53.8%	-
	MDR1 maternální CC	0.0%	8.6%	8.3%	0.0%	-
	MDR1 maternální CT	24.4%	37.1%	50.0%	30.8%	-
	MDR1 paternální TC	4,9%	0%	8,3%	7,7%	-
	MDR1 maternální TT	70.7%	54.3%	33.3%	61.5%	-
	MRP1 in18-SNP2 paternální GC	5.9%	33.3%	16.7%	16.7%	5.0%
	MRP1 in18-SNP2 paternální GG	29.4%*	8.3%*	33.3%*	33.3%*	85.0%
	MRP1 in18-SNP2 paternální TC	0.0%	8.3%	16.7%	16.7%	5.0%
	MRP1 in18-SNP2 paternální TG	64.7%*	50.0%*	33.3%	33.3%	5.0%
	MRP1 in18-SNP2 maternální GC	0.0%	8.3%	16.7%	16.7%	0.0%
	MRP1 in18-SNP2 maternální GG	35.3%	58.3%	50.0%	50.0%	20.0%
	MRP1 in18-SNP2 maternální TC	29.4%*	0.0%	16.7%	0.0%	0.0%
	MRP1 in18-SNP2 maternální TG	35.3%*	33.3%*	16.7%*	33.3%	80.0%

¹ GC + LTRA (GC – glukokortikoidy; LTRA – leukotrienoví antagonisté)

² procenta jsou spočtena v rámci dané skupiny pacientů

³ statistická významnost rozdílů v zastoupení genetických charakteristik mezi pacienty s různou terapií astmatu a kontrolou hodnocen Fisherovým přesným testem; statisticky významné rozdílů označeny *

⁴ podíl pacientů s danou alelou ve skupině pacientů, nejde o alelické frekvence

Ani v alelických ani v genotypových frekvencích nebyly nalezeny statisticky významné rozdílů.

Haplotypová analýza byla provedena pouze u SNP genu MRP1. Zde byly nalezeny významné rozdílů u haplotypů MRP1 in18-SNP2 paternální GG, MRP1 in18-SNP2 paternální TG, MRP1 in18-SNP2 maternální TC a MRP1 in18-SNP2 maternální TG (Tab. XI).

6 Diskuse

Při léčbě astmatu se běžně používají antagonisté leukotrienů a glukokortikoidy, z tohoto důvodu byly pro výzkum zvoleny geny ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1, které kódují příslušné transportéry. ABCB1/MDR1 je specifický pro transport glukokortikoidů. Z lymfocytů aktivně transportují glukokortikoidy směrem ven z buněk a redukuje tak jejich efektivitu (Farrell *et* Kelleher, 2003). Zatímco ABCC1/MRP1 má substrátovou specifitu pro antagonisty leukotrienů, které blokují receptor pro prozánětlivé mediátory cysteinyl leukotrieny (Lima, 2007).

Vztah léčby astmatu a genů ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 byl zjišťován vzhledem k výskytu vybraných polymorfismů.

Při hodnocení alelických a genotypových frekvencí (viz Tab. VII., kapitola 5. 3) polymorfismu E16-SNP1 byla u astmatiků stanovena frekvence alely G 48 % a alely T 52 %, u kontrol pro G 53 % a pro T 47 %. Z těchto hodnot nelze vyvozovat prokazatelné rozdíly. Zatímco v databázi NCBI je uvedena pro tento polymorfismus alelická frekvence pro evropskou populaci 90,5 % pro G a 9,5 % pro T. Tato frekvence se tedy značně liší od našich výsledků. U polymorfismu In18-SNP2 byla u astmatiků zjištěna frekvence alely C 25 % a alely G 75 %, u kontrol pro C 27 % a pro G 73 %. Ani podle těchto hodnot nelze zjistit prokazatelné rozdíly. V databázi NCBI je dána pro tento polymorfismus u evropské populace alelická frekvence 15,5 % pro C a 84,5 % pro G. Frekvence se odlišuje od našich zjištěných údajů. Významná výjimka byla nalezena u polymorfismu E28-SNP1 genu ABCC1/MRP1, kde podle online dostupné databáze NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov – SNP database) je frekvence alely A 28% a G 72%. V námi vyšetřovaných skupinách byla nalezena pouze alela A. Ale uvedená frekvence v databázi není dána konkrétně pro evropskou populaci, což může mít za následek tento markantní rozdíl, pokud se frekvence týká jiných ras. Nepatrnou odlišností je výskyt frekvence alely A (2,6 %) polymorfismu E17-SNP1 u Evropanů v databázi NCBI, zatímco v našem výzkumu byla nalezena pouze alela G.

Avšak při hodnocení podílů určitých alel v dané skupině byl nalezen rozdíl ve frekvenci mezi astmatiky a kontrolami. U polymorfismu E16-SNP1 byl nalezen rozdíl ve výskytu genotypů TT a GT (na hranici statistické významnosti) mezi astmatiky a kontrolami. TT genotyp převažoval u astmatických pacientů, zatímco genotyp GT byl více zastoupený u kontrol. Podíl alely G byl vyšší u kontrol než u astmatiků. To by

mohlo naznačovat asociaci mezi pacienty a alelou T v homozygotním stavu a astmatem.

Téměř u všech haplotypů sestavených z polymorfismů E16-SNP1 a In18-SNP2 byly nalezeny rozdíly mezi astmatiky a kontrolami. U astmatiků se více vyskytoval paternální i maternální haplotyp GC, paternální haplotyp TG a maternální haplotypy GG a TC (viz Tab. VIII., kapitola 5. 4).

Genotyp CC polymorfismu T-129C se vyskytoval pouze s genotypem CC polymorfismu C3435T. S genotypem CT u polymorfismu T-129C byl zaznamenán v 75 % genotyp CC a v 25 % genotyp CT u polymorfismu C3435T. Genotyp TT polymorfismu T-129C se nacházel s genotypem CC ve 20,2 %, ve 45 % s genotypem CT a ve 34, 9 % s genotypem TT polymorfismu C3435T. Z těchto výsledků vyplývá vzájemný vztah mezi polymorfismy T-129C a C3435T genu MDR1 (viz Obr. 11, kapitola 5. 5). Tato vazebná analýza naznačuje, že sledované polymorfismy by se měly v dalších studiích zkoumat společně.

Vzhledem k předpokládané funkci obou sledovaných genů nás dále zajímal vztah genotypů a haplotypů k léčbě a k odpovědi na léčbu. Pro dané polymorfismy bylo vzhledem ke kontrolám a pacientům bez terapie nalezeno několik statisticky významných odchylek (viz Tab. X, kapitola 5. 6; Tab. XI, kapitola 5. 7). Nicméně nebyl prokázán vliv sledovaných polymorfismů genu ABCC1/MRP1 na rezistenci k leukotrienovým antagonistům (montelukast) a ani v případě ABCB1/MDR1 se nepodařilo prokázat závislost polymorfismů na terapii glukokortikoidy.

Pacienty léčené pomocí glukokortikoidů by bylo vhodné rozdělit podle stupně závažnosti astmatu (perzistentní lehké, perzistentní střední, perzistentní těžké), který přímo souvisí s dávkováním. Potom by bylo možné vyvodit vztah mezi vlivem dávky glukokortikoidů a určitým haplotypem. V naší studii to nebylo možné vzhledem k malému počtu pacientů léčených glukokortikoidy.

Dalším zajímavým zjištěním je nevyvážený poměr haplotypů z hlediska rodičovského původu. V tom to případě se bude zřejmě jednat pouze o nevyváženost způsobenou malým souborem (Tab. VIII., kapitola 5. 4). Není ovšem ani vyloučeno, že vyšší/nížší frekvence určitých haplotypů u pacientů mohou souviset s epigenetickými mechanismy.

7 Závěr

Výzkum se zabýval geny ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1, které souvisí s přenosem léků. V těchto genech byly zkoumány polymorfismy, které by mohly mít vliv na jejich funkci jako transportérů.

Genotypizace polymorfismů byla provedena pomocí alelově diskriminační/SNP real-time PCR za pomoci fluorescenčně značených TaqMan sond. Pro kontrolu správnosti diskriminace genotypů jednotlivých polymorfismů bylo provedeno sekvencování příslušných úseků genů ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 u vybraných probandů. Byla prokázána shodnost těchto sekvencí s danými alelodiskriminačními křivkami z real-time PCR.

Vyhodnocení alelických a genotypových frekvencí bylo možné pouze u polymorfismů E16-SNP1 a In18-SNP2 genu ABCC1/MRP1 a polymorfismů C3435T a T-129C genu ABCB1/MDR1. U zbývajících polymorfismů byl objeven pouze jeden genotyp. Ze zjištěných alelických a genotypových frekvencí polymorfismů E16-SNP1 a In18-SNP2 genu ABCC1/MRP1, které byly porovnávány se souborem kontrol, nebylo možné vyvozovat prokazatelné rozdíly mezi astmatiky a kontrolami.

Vztah genotypů a haplotypů k léčbě a k odpovědi na léčbu byl sledován v souvislosti s předpokládanou funkcí obou sledovaných genů. Pro hodnocené polymorfismy bylo nalezeno několik statisticky významných odchylek vzhledem ke kontrolám a pacientům bez terapie. Avšak nepodařilo se prokázat vliv sledovaných polymorfismů genu ABCC1/MRP1 na rezistenci k leukotrienovým antagonistům. Závislost léčby pomocí glukokortikoidů na výskytu polymorfismů v genu ABCB1/MDR1 nebylo možné také prokázat.

Vazebnou analýzou byl zjištěn vzájemný vztah mezi polymorfismy T-129C a C3435T genu MDR1, což naznačuje, že sledované polymorfismy by bylo vhodné v dalších studiích zkoumat společně.

Vliv polymorfismů ABCB1/MDR1 a ABCC1/MRP1 genů na odpověď na léčbu alergická onemocnění je zatím spekulativní, protože v této oblasti chybí validní klinické studie.

8 Seznam použitých zkratek

Å	Ångström - Ångström
ABCB1	ATP-binding cassette B1 – ATP vazebná kazeta B1
ABC	ATP-binding cassette – ATP vazebná kazeta
ABCC1	ATP-binding cassette C1 – ATP vazebná kazeta C1
ADP	adenosine diphosphate - adenosindifosfát
Ala	alanine – alanin
AP-1	activator protein 1 - aktivační rotein 1
Asn	asparagine – asparagin
Arg	arginine – arginin
ATP	adenosine triphosphate - adenosintrifosfát
BLAST	basic local alignment search tool – program pro vyhledávání lokální podobnosti mezi sekvencemi
bp	base pair – pár bází
cDNA	complementary DNA – komplementární DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator – transmembránový vodivý regulátor cystické fibrózy
Ct	threshold cycle – prahový cyklus
Cys	cysteine – cystein
CYSLT	cysteinyl leukotriene - cysteinyl leukotrien
CYSLT1	cysteinyl leukotriene receptor 1 - cysteinyl leukotrienový receptor 1
CYSLT2	cysteinyl leukotriene receptor 1 - cysteinyl leukotrienový receptor 2
dATP	deoxyadenosine triphosphate – deoxyadenozintrifosfát
dCTP	deoxycytidine triphosphate – deoxycytozintrifosfát
ddATP	dideoxyadenosine triphosphate – dideoxyadenozintrifosfát
ddCTP	dideoxycytidine triphosphate – dideoxycytozintrifosfát
ddGTP	dideoxyguanosine triphosphate - dideoxyguanozintrifosfát
ddNTP	dideoxyribonucleotide triphosphate – dideoxyribonukleosidtrifosfát
ddTTP	dideoxythymidine triphosphate - dideoxytimidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosine triphosphate – deoxyguanozintrifosfát

DNA	deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonucleosid triphosphate – deoxyribonukleosidtrifosfát
dTTP	deoxythymidine triphosphate – deoxytimidintrifosfát
EB	elution buffer – eluční pufr
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid – kyselina ethylendiamintetraoctová
EtBr	ethidium bromid – ethidium bromid
FAM	carboxy fluoresceine – karboxyfluorescein
FLAP	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein – aktivační protein arachidonátu-5-lipoxygenázy
GC	glucocorticoide – glukokortikoid
GINA	global initiative for asthma –světová iniciativa pro astma
GSH	glutathion - glutathion
Gly	glycine – glycin
H69AR	multidrug-resistant small cell lung cancer cell line – mnoholékově rezistentní buněčná linie rakoviny plic
HSE	heat shock element – element teplotního šoku
kDa	kilodalton - kilodalton
LB	lysisbuffer – lyzovací pufr
5-LO	5-lipoxygenase – 5-lipoxygenáza
LSGGQ	leucine-serine-glycine-glycine-glutamine – leucin-serin-glycin- glycin-glutamin
L0	linker 0 – linker 0
LT	leukotriene -leukotrien
LTA ₄	leukotriene A ₄ - leukotrien A ₄
LTB ₄	leukotriene B ₄ - leukotrien B ₄
LTC ₄	leukotriene C ₄ - leukotrien C ₄
LTD ₄	leukotriene D ₄ - leukotrien D ₄
LTE ₄	leukotriene E ₄ - leukotrien E ₄
LTA ₄ H	leukotriene A ₄ hydrolase – leukotrien A ₄ hydroláza
LTC ₄ S	leukotriene C ₄ synthase - leukotrien C ₄ syntáza
LTRA	leukotriene receptor antagonist – antagonist leukotrienového receptoru
Lys	lysine –lysin

MEF1	MDR1 promotor-enhancing faktor 1 – MDR1 faktor zvyšující promotor
MDR1	multidrug resistance 1 - gen zapříčiňující mnoholékovou rezistenci
MRP1	multidrug resistance-associated protein – protein asociovaný s mnoholékovou rezistencí
MSD	membrane-spanning domain – membránově uložená doména
mRNA	messenger ribonucleic acid – mediátorová ribonukleová kyselina
NaOAc	sodium acetate – acetát sodný
NBD	nucleotide binding domain – doména vázající nukleotid
NCBI	national center for biotechnology information – národní centrum biotechnologických informací
NLB	nucei lysisbuffer – lyzovací pufr kyselin
p53	transcription factor – transkripční faktor
PB	binding buffer – vazebný pufr
PCR	polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
PE	wash buffer – promývací pufr
P-gp	P-glycoprotein – P-glykoprotein
POP4	performance optimized polymer 4 – výkonný optimalizovaný polymér 4
QPCR	quantitative polymerase chain reaction – kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RecA	recombinase A – rekombináza A
RNA	ribonucleic acid – ribonukleová kyselina
rpm	rounds per minute – otáčky za minutu
SDS	sodium dodecyl sulfate – dodecyl sulfát sodný
Ser	serine - serin
SNP	single nucleotide polymorphism – jednonukleotidový polymorfismus
Sp1	transcription factor –transkripční faktor
Sp3	transcription factor –transkripční faktor
TBE	tris-borate-EDTA – tris-borát-EDTA
TM	transmembrane - transmembránové
TMD	transmembrane domain - transmembránová doména

TMS	transmembrane segment- transmembránový segment
Thr	threonine – treonin
TRIS	tris(hydroxymethyl)methylamine – tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	tryptophan – tryptofan
3'UTR	3'untranslated region – 3'nepřekládaná oblast
5'UTR	5'untranslated region – 5'nepřekládaná oblast
Val	valine – valin
Y-box	inverted CCAAT-box - invertovaný CCAAT-box

9 Literatura

- Ameyaw, M. M., Regateiro, F., Li, T., Liu, X., Tariq, M., Mobarek, A., Thornton, N., Folyan, G. O., Githang'a, J., Indalo, A., Ofori-Adjei, D., Price-Evans, D. A., McLeod, H. L. (2001): MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 11: 217-221.
- Bakos, E., Evers, R., Calenda, G., Tusnády, G. E., Szakács, G., Váradi, A., Sarkadi, B. (2000): Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *Journal of Cell Science* 113: 4451-4461.
- Bakos, E. a Homolya, L. (2007): Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflügers Arch.* 453: 621-641.
- Capra, V., Thompson, M. D., Sala, A., Cole, D. E., Folco, G., Rovati, G. E. (2007): Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Med. Res. Rev.* 27: 469-527.
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., Deeley, R. G. (1992): Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654.
- Cole, S. P., Chanda, E. R., Dicke, F. P., Gerlach, J. H., Mirski, S. E. (1991): Non-P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance in a Small Cell Lung Cancer Cell Line: Evidence for Decreased Susceptibility to Drug-induced DNA Damage and Reduced Levels of Topoisomerase II. *Cancer Research* 51: 3345-3352.
- Conrad, S., Kauffmann, H. M., Ito, K., Leslie, E. M., Deeley, R. G., Schrenk, D., Cole, S. P. (2002): A naturally occurring mutation in MRP1 results in a selective decrease in organic anion transport and in increased doxorubicin resistance. *Pharmacogenetics* 12: 321-330.
- Currie, G. P., Lima, J. J., Sylvester, J. E., Lee, D. K., Cockburn, W. J., Lipworth, B. J. (2003): Leukotriene C4 synthase polymorphisms and responsiveness to leukotriene antagonists in asthma. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56: 422-426.
- Dean, M. (2002): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mono_001&part=A137

- Dean, M. a Annilo, T. (2005): Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6: 123-142.
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid. Res.* 42: 1007–1017.
- Deeley, R. G. a Cole, S. P. (2006): Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett.* 580: 1103-1111.
- Deeley, R. G., Westlake, Ch., Cole, S. P. (2006): Transmembrane Transport of Endo- and Xenobiotics by Mammalian ATP-Binding Cassette Multidrug Resistance Proteins. *Physiol. Rev.* 86: 849–899.
- Farrell, R. J. a Kelleher, D. (2003): Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J. Endocrinol.* 178: 339-346.
- Fenneteau, F., Turgeon, J., Couture, L., Michaud, V., Li, J., Nekka, F. (2009): Assessing drug distribution in tissues expressing P-glycoprotein through physiologically based pharmacokinetic modeling: model structure and parameters determination. *Teor. Biol. Med. Model.* 6: 2.
- Germann, U. A. a Chambers, T. C. (1998): Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein. *Cytotechnology* 27: 31–60.
- Grant, C. E., Kurz, E. U., Cole, S. P., Deeley, R. G. (1997): Analysis of the intron-exon organization of the human multidrug-resistance protein gene (MRP) and alternative splicing of its mRNA. *Genomics* 45: 368-378.
- Hall, I. P. a Sayers, I. (2007): Pharmacogenetics and asthma: false hope or new dawn? *Eur. Respir. J.* 29: 1239-1245.
- Hawkins, J. D. (1988): A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res.* 16: 9893-9908.
- Hipfner, D. R., Almquist, K. C., Leslie, E. M., Gerlach, J. H., Grant, C. E., Deeley, R. G., Cole, S. P. (1997): Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *J. Biol. Chem.* 272: 23623-23630.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmüller, J., Johne, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., Brinkmann, U. (2000): Functional polymorphisms of the human multidrugresistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 3473-3478

- Hollenstein, K., Dawson, R. J., Locher, K. P. (2007): Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17: 412-418.
- Chen, Ch., Clark, D., Ueda, K., Pastan, I., Michael M. Gottesman, M. M., Roninson, I. B. (1990): Genomic Organization of the Human Multidrug Resistance (MDR1) Gene and Origin of P-glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 265: 506-514.
- Chin, J. E., Soffir, R., Noonan, K. E., Choi, K., Roninson, I. B. (1989): Structure and Expression of the Human MDR (P-Glycoprotein) Gene Family. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3808-3820.
- Choudhuri, S. a Klaassen, C. D. (2006): Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.* 25: 231-259.
- Ito, K., Olsen, S. L., Qiu, W., Deeley, R. G., Cole, S. P. (2001): Mutation of a single conserved tryptophan in multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) results in loss of drug resistance and selective loss of organic anion transport. *J. Biol. Chem.* 276: 15616-15624.
- Jedlitschky, G. a Keppler, D. (2002): Transport of leukotriene C4 and structurally related conjugates. *Vitam. Horm.* 64: 153-184.
- Jones, P. M. a George, A. M. (2002): Mechanism of ABC transporters: A molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 12639-1244.
- Jones, P. M. a George, A. M. (2003): The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 682-699.
- Juliano, R. L. a Ling, V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* 455: 152-162.
- Kenneth, J. L. (2007): Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology* 22: 122-130.
- Kim, R. B., Leake, B. F., Choo, E. F., Dresser, G. K., Kubba, S. V., Schwarz, U. I., Taylor, A., Xie, H. G., McKinsey, J., Zhou, S., Lan, L. B., Schuetz, J. D., Schuetz, E. G., Wilkinson, G. R. (2001): Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 70: 189-199.

- Komoto, C., Nakamura, T., Sakaeda, T., Kroetz, D. L., Yamada, T., Omatsu, H., Koyama, T., Okamura, N., Miki, I., Tamura, T., Aoyama, N., Kasuga, M., Okumura, K. (2006): MDR1 haplotype frequencies in Japanese and Caucasian, and in Japanese patients with colorectal cancer and esophageal cancer. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 21:126-132.
- Koyama, T., Nakamura, T., Komoto, C., Sakaeda, T., Taniguchi, M., Okamura, N., Tamura, T., Aoyama, N., Kamigaki, T., Kuroda, Y., Kasuga M., Kadoyama, K., Okumura, K. (2006): MDR1 T-129C polymorphism can be predictive of differentiation, and thereby prognosis of colorectal adenocarcinomas in Japanese. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1449-1453.
- Lechapt-Zalcman, E., Hurbain, I., Lacave, R., Commo, F., Urban, T., Antoine, M., Milleron, B., Bernaudin, J. F. (1997): MDR1-Pgp 170 expression in human bronchus. *Eur. Respir. J.* 10: 1837–1843.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., Cole, S. P. (2001): Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 167: 3-23.
- Li, Y. H., Wang, Y. H., Yang, L. (2006): MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yi Chuan Xue Bao* 33: 93-104.
- Lima, J. J. (2007): Treatment heterogeneity in asthma: genetics of response to leukotriene modifiers. *Mol. Diagn. Ther.* 11: 97-104.
- Locher, K. P. (2004): Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 426-431.
- Locher, K. P. (2009): Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 239-245.
- Locher, K. P. a Borths, E. (2004): ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. *FEBS Lett.* 564: 264-268.
- Loo, T. W., Bartlett, M. C., Clarke, D. M. (2004a): Disulfide cross-linking analysis shows that transmembrane segments 5 and 8 of human P-glycoprotein are close together on the cytoplasmic side of the membrane. *J. Biol. Chem.* 279: 7692-7697.
- Loo, T. W., Bartlett, M. C., Clarke, D. M. (2004b): Val133 and Cys137 in transmembrane segment 2 are close to Arg935 and Gly939 in transmembrane segment 11 of human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 279:18232-18238.

- Loo, T. W., Bartlett, M. C., Clarke, D. M. (2006): Transmembrane segment 7 of human P-glycoprotein forms part of the drug-binding pocket. *Biochem. J.* 399: 351–359.
- Loo, T. W. a Clarke, D. M. (2000): The packing of the transmembrane segments of human multidrug resistance P-glycoprotein is revealed by disulfide cross-linking analysis. *J. Biol. Chem.* 275: 5253-5256.
- Marrow, T. (2007): Implications of pharmacogenomics in the current and future treatment of asthma. *J. Manag. Care Pharm.* 13: 497-505.
- Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T., Kim, R. B. (2004): Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 75: 13-33.
- Montano, E., Schmitz, M., Blaser, K., Simon, H. U. (1996): P-glycoprotein expression in circulating blood leukocytes of patients with steroid-resistant asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 6: 14-21.
- Muredda, M., Nunoya, K., Burtch-Wright, R. A., Kurz, E. U., Cole, S. P., Deeley, R. G. (2003): Cloning and Characterization of the Murine and Rat mrp1 Promoter Regions. *Mol. Pharmacol.* 64: 1259-1269.
- Ramakrishnan, P. (2003): The Role of P-glycoprotein in the Blood-Brain Barrier. *Einstein Quart. J. Biol. Med.* 19: 160-165.
- Ramires, R., Caiaffa, M. F., Tursi, A., Haeggström, J. Z., Macchia, L. (2004): Novel inhibitory effect on 5-lipoxygenase activity by the anti-asthma drug montelukast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324: 815-821.
- Rao, U. S. a Nuti, S. L. (2003): Identification of two different states of P-glycoprotein in its catalytic cycle: role of the linker region in the transition between these two states. *J. Biol. Chem.* 278: 46576-46582.
- Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Ford, R. C., Higgins, Ch. F. (1997): Structure of the Multidrug Resistance P-glycoprotein to 2.5 nm Resolution Determined by Electron Microscopy and Image Analysis. *J. Biol. Chem.* 272: 10685-10694.
- Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Modok, S., Higgins, Ch. F., Ford, R. C. (2005): Three-dimensional Structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J. Biol. Chem.* 280: 2857-2862.

- Rosenberg, M. F., Mao, Q., Holzenburgi, A., Ford, R. C., Deeley, R. C., Cole, S. P. (2001): The Structure of the Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1): Crystallization and Single-Particle Analysis. *J. Biol. Chem.* 276: 16076–16082.
- Sharom, F. J. (2006): Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochem. Cell Biol.* 84: 979–992.
- Schmitt, L. a Tampé, R. (2002): Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 754-760.
- Tang, K, Wong, L. P., Lee, E. J., Chong, S. S., Lee, C. G. (2004): Genomic evidence for recent positive selection at the human MDR1 gene locus. *Hum. Mol. Genet.* 13: 783-797.
- van Groenigen, M., Valentijn, L. J., Baas, F. (1993): Identification of a functional initiator sequence in the human MDR1 promoter. *Biochim. Biophys. Acta.* 172: 138-146.
- van der Deen, M., de Vries, E. G., Timens, W., Scheper, R. J., Timmer-Bosscha, H., Postma, D. S. (2005): ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir. Res.* 6: 59.
- Wada, M. (2006): Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response. *Cancer Letters* 234: 40–50.
- Wang, Z., Swe, P.H., Ambrose, H., Ryan, S., Chong, S. S. Lee, E. J., Lee, C. G. (2006): Nucleotide sequence analyses of the MRP1 gene in four populations suggest negative selection on its coding region. *BMC Genomics* 7: 111.
- Wang, Z., Wang, B., Tang, K., Lee, E. J., Chong, S. S., Lee, C. G. (2005): A functional polymorphism within the MRP1 gene locus identified through its genomic signature of positive selection. *Hum. Mol. Genet.* 14: 2075-2087.
- Wenzel, S. E. (2003): The role of leukotrienes in asthma. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 69: 145-155.
- Westlake, Ch. J., Cole, S. P., Deeley, R. G. (2005): Role of the NH₂-terminal Membrane Spanning Domain of Multidrug Resistance Protein 1/ABCC1 in Protein Processing and Trafficking. *Mol. Biol. Cell.* 16: 2483-2492.
- Westlake, C. J., Qian, Y. M., Gao, M., Vasa, M., Cole, S. P., Deeley, R. G. (2003): Identification of the structural and functional boundaries of the multidrug resistance protein 1 cytoplasmic loop 3. *Biochemistry* 42: 14099-14113.

Wijnholds, J., Scheffer, G. L., van der Valk, M., van der Valk, P., Beijnen, J. H., Scheper, R. J., Borst, P. (1998): Multidrug Resistance Protein 1 Protects the Oropharyngeal Mucosal Layer and the Testicular Tubules against Drug-induced Damage. *J. Exp. Med.* 188: 797–808.

Databáze: NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)