

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Petra Gregorová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium vybraných genových variant u
chronické lymfocytární leukémie**

Petra Gregorová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Dr. Ing. Evy Kriegové a použila jen uvedené bibliografické a elektronické zdroje.

Olomouc 30. dubna 2015

podpis

Souhrn

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější formou leukémie v západních zemích. CLL je lymfoproliferativní, maligní onemocnění s neznámou etiologií, které se vyznačuje velkou klinickou a genetickou heterogenitou.

U pacientů s CLL bývají v 50 % přítomny genetické změny, mezi nejčastější patří delecce del(13q), del(11q), del(17p), del(6q), trisomie 12 a další. Tato bakalářská práce se zabývá studiem expresních profilů vybraných molekul u pacientů s CLL s delecí na dlouhém raménku chromozómu 6 [del(6q)], která se vyskytuje u 7 % pacientů s CLL a bývá spojována s horší prognózou.

U pacientů s del(6q) nebyl dosud studován expresní profil genů, které se nachází v minimální deletované oblasti na dlouhém raménku chromozómu 6. Tato bakalářská práce je proto zaměřena na studium mRNA / proteinové exprese vybraných molekul, které v této oblasti leží nebo s nimi souvisí. Konkrétně se tato práce zaměřuje na studium exprese genů *FoxO3a*, *NF-κB*, *TBX21*, *IL-2* a *BCL10*.

U souboru CLL pacientů s del(6q) a bez del(6q) a u kontrolních zdravých jedinců byla provedena kvantitativní PCR a bylo zjištěno, že nejvíce deregulovanými geny jsou *FoxO3a* a *NF-κB*. U těchto genů byla pomocí metody Western blotting studována proteinová exprese a byla zjištěna zvýšená exprese FoxO3a i NF-κB proteinů u pacientů s CLL s del(6q). U molekul *TBX21*, *IL-2* a *BCL10* nebyl prokázán rozdíl mezi studovanými skupinami.

Deregulace exprese transkripčních faktorů *FoxO3a* a *NF-κB* může mít klíčový vliv na průběh onemocnění a horší prognózu CLL pacientů s del(6q) ve srovnání s CLL bez del(6q) a kontrolními jedinci a bude určitě předmětem dalšího studia.

Summary

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in the western countries. CLL is a lymphoproliferative malignant disease with unknown etiology which is characterized by high clinical and genetic heterogeneity.

In 50 % of CLL patients are genetic changes, such as deletion del(11q), del(17p), del(6q) and others. This thesis deals with the molecular characterisation of patients with CLL with deletion on the long arm of chromosome 6 (del(6q), which occurs in 7 % of patients with CLL.

There is no gene expression profile study in patients with a deletion on the long arm of chromosome 6. This thesis is therefore focused on the study of mRNA / protein expression of selected molecules in minimal deleted region on the long arm of chromosome 6 in patients with CLL. Specifically, this work is focused on the study of gene expression *FoxO3a*, *NF-kB*, *TBX21*, *IL-2* and *BCL10*.

In a group of CLL patients with del(6q) and without del(6q), and control healthy subjects the gene expression profiling was performed using quantitative PCR, and it was found that genes *FoxO3a* and *NF-kB* were deregulated. The protein levels of these transcription factors were investigated by Western blotting. There was increased expression of FoxO3a and NF-kappa B proteins in CLL patients with del(6q) comparing to patients without del(6q).

The deregulation of the expression of the aforementioned molecules *FoxO3a* and *NF-kB* could affect the course and prognosis of CLL patients with del(6q) and will be investigated in future studies.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat zejména mé vedoucí bakalářské práce paní Dr. Ing. Evě Kriegové za odbornou spolupráci, podnětné rady a hlavně trpělivost při psaní této práce. Dále bych také ráda poděkovala paní Mgr. Tereze Dýškové, Ing. Regině Fillerové, Mgr. Petře Schneiderové a Mgr. Michalovi Křupkovi, Ph.D. za spolupráci při práci v laboratoři a za mnoho cenných rad. Mé díky také patří celému Ústavu imunologie LF UP a Hemato-onkologické klinice ve Fakultní nemocnici Olomouc, především paní prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc. za poskytnutí podkladů a klinických vzorků pro vypracování této práce.

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Současný stav řešené problematiky.....	2
2.1.	Chronická lymfocytární leukémie	2
2.1.1.	Etiologie CLL	3
2.1.2.	Vývoj CLL	3
2.1.3.	Role mikroprostředí	4
2.1.4.	Genetika CLL	4
2.1.5.	Delece dlouhého raménka na chromozómu 6	6
2.1.6.	Forkhead box (Fox)	8
2.1.7.	Nuclear factor – kappa B (<i>NF-κB</i>).....	9
3.	Principy metod	10
3.1.	Reverzní transkripce a PCR	10
3.2.	Kvantitativní PCR (qPCR) technologií duálně značených sond TaqMan™	11
3.3.	SDS–PAGE a Western blotting (WB)	12
4.	Cíl práce	14
5.	Materiál a metodika.....	15
5.1.	Materiál a vybavení	15
5.2.	Schéma postupu práce.....	18
5.3.	Soubor pacientů a kontrol	18
5.4.	Odběr vzorků, separace a homogenizace leukocytů.....	18
5.5.	Reverzní transkripce a PCR	19
5.6.	Kvantitativní PCR (qPCR).....	20
5.7.	SDS–PAGE a Western blotting	23
6.	Výsledky.....	25
6.1.	Výsledky exprese vybraných genů (<i>FoxO3a</i> , <i>NF-κB</i> , <i>TBX21</i> , <i>IL-2</i> , <i>BCL10</i> , <i>PGK1</i>) provedené pomocí qPCR	25
6.1.1.	Výsledky exprese <i>NF-κB</i>	25
6.1.2.	Výsledky exprese <i>FoxO3</i>	26

6.1.3.	Výsledky exprese <i>IL-2</i>	27
6.1.4.	Výsledky exprese <i>BCL10</i>	27
6.1.5.	Výsledky exprese <i>TBX21</i>	28
6.2.	Proteinová exprese vybraných molekul (FoxO3a, NF- κ B, p-NF- κ B) provedená pomocí Western blottingu	29
6.2.1.	<i>FoxO3</i>	30
6.2.2.	<i>NF-κB</i> a <i>p-NF-κB</i>	30
7.	Diskuse.....	31
8.	Závěr.....	33
9.	Literatura	34

1. Úvod

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je lymfoproliferativní onemocnění charakteristické klonální proliferací a akumulací zralých klonů lymfocytů v kostní dřeni, slezině, lymfatických uzlinách a játrech. CLL je nejčastější formou leukemie v západních zemích. CLL je velmi heterogenní onemocnění a její etiologie není stále známá. I přes rozsáhlý výzkum zůstává přesný mechanismus CLL na molekulární úrovni stále nejasný, což je jeden z důvodů, proč je CLL stále nevyléčitelnou nemocí.

U pacientů s CLL se často setkáváme s chromozomovými aberacemi. Nejčastějšími chromozomovými aberacemi jsou delece [del(13q), del(11q), del(17p), del(6q)] nebo trisomie 12. V 7 % všech případů CLL se setkáváme s delecí na dlouhém raménku chromozómu 6 (6q), del(6q). U této chromozómové aberace není zatím znám její funkční dopad na expresi genů, které leží v deletované oblasti nebo s nimi souvisí.

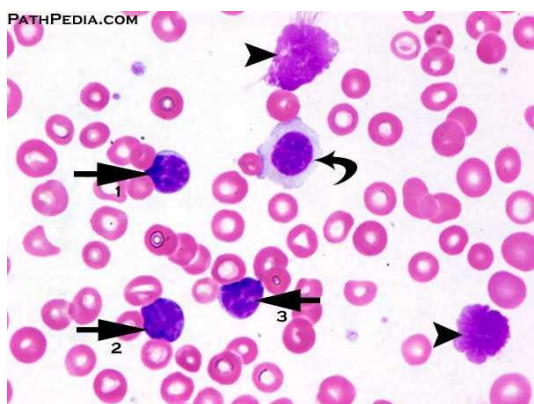
Tato práce se proto zabývá studiem exprese genů, které leží v minimální deletované oblasti na 6q. Konkrétně je tato práce zaměřena na expresi genů *FoxO3a*, *NF-κB*, *TBX21*, *IL-2* a *BCL10*, u kterých se předpokládá, že budou deregulovány a mohly by mít dopad na vývoj a prognózu CLL.

Soubor pacientů, u kterých byly porovnány expresní profily, tvořili pacienti s CLL s del(6q), pacienti s CLL bez delece del(6q) a zdravá kontrolní skupina jedinců. U souboru pacientů a kontrolních jedinců byla studována exprese na mRNA úrovni pomocí kvantitativní PCR (qPCR) a exprese na proteinové úrovni pomocí Western blottingu (WB).

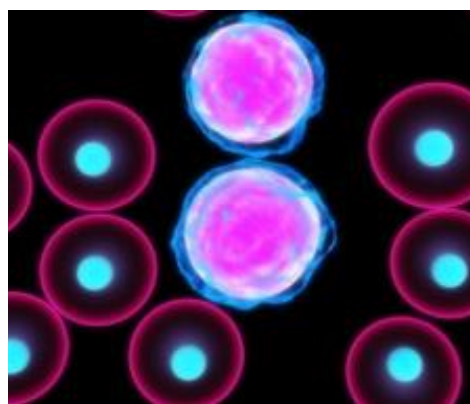
2. Současný stav řešené problematiky

2.1. Chronická lymfocytární leukémie

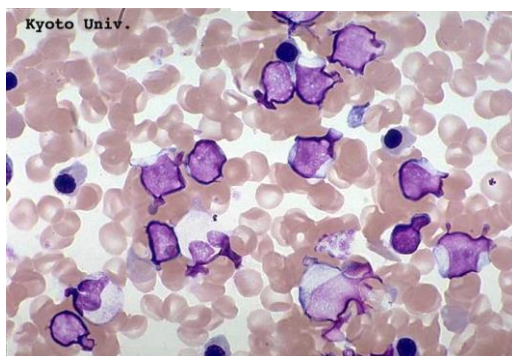
Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je lymfoproliferativní onemocnění charakteristické proliferací a akumulací zralých klonů lymfocytu v kostní dřeni, slezině, lymfatických uzlinách a játrech (Papajík 2002). V 95% jde o klonů B - lymfocytů, CD5+, CD19+, CD20+^{dim}, CD23+ a sIgM^{dim} (Obrázek 1, 2, 3), pouze v 5 % jde o klonů T - lymfocytů (Ticchioni et al. 2007, Wang et al. 2011).



Obrázek 1: Akumulace B – lymfocytů v krvi (http://www.pathpedia.com/education/atlas/histopathology/blood_cells/chronic_lymphocytic_leukemia_%28cll%29_b-cell.aspx, navštíveno dne 19. 4. 2015).



Obrázek 2: B – lymfocyty u pacienta s CLL (http://www.findingdulcinea.com/guides/Health/Cancer/Leukemia/Chronic-Lymphocytic_Leukemia.pg_01.html, navštíveno dne 19. 4. 2015).



Obrázek 3: Akumulace B – lymfocytů v kostní dřeni (<http://pathy.med.nagoya-u.ac.jp/atlas/doc/node64.html>, navštíveno dne 19. 4. 2015).

2.1.1. Etiologie CLL

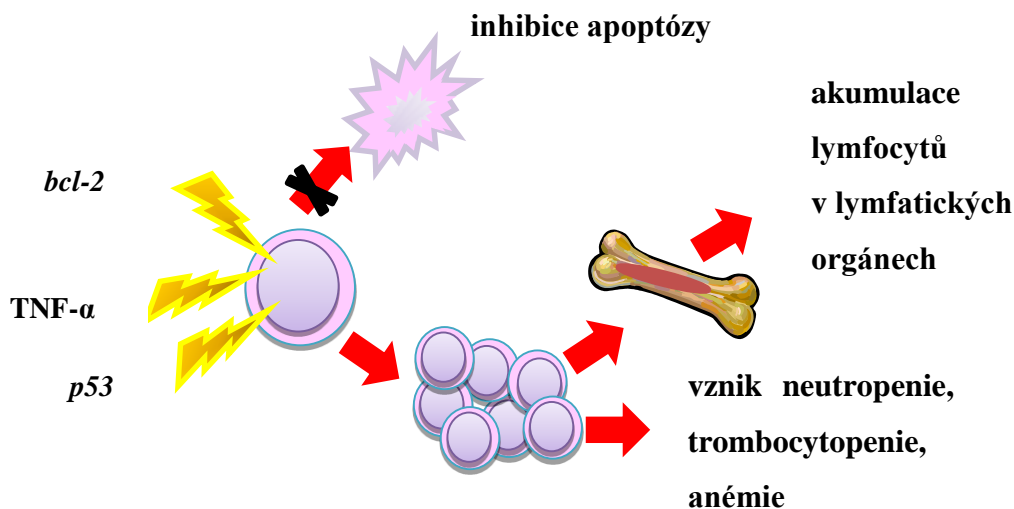
CLL je nejčastější forma leukémie v západních zemích. Vyskytuje se u 30 % všech případů leukémie a je charakteristická pro pacienty staršího věku v rozmezí 67 – 72 let, ale může se vyskytovat i u lidí mladších 40 let, vzácně i u dětí. Postihuje až 1,96x častěji muže než ženy (Dalsass et al. 2013, Hallek et al. 2013). Příčina onemocnění CLL je v současné době neznámá (Graça et al. 2007). Jsou známy pouze rizikové faktory, kterými jsou věk a výskyt hematologických malignit v rodině: 15 – 20 % lidí s CLL má rodinného příslušníka s CLL nebo jiným lymfoproliferativním onemocněním (Brown et al. 2013). Pomocí Genome–Wide Association Studies (GWAS) bylo identifikováno 13 genetických variant v genomu, které jsou spojeny s rizikem vzniku CLL (Berndt et al. 2013). CLL je v současné době nevléčitelným onemocněním.

2.1.2. Vývoj CLL

Ke spuštění CLL (**Obrázek 4**) dochází tehdy, když zralý lymfocyt (**Obrázek 2**) vytváří své klony na základě patogenetických faktorů. Mezi tyto patogenetické faktory patří nadměrná exprese protoonkogenu *bcl-2*, mutace *p53* genu, delece *RB1* genu, nadměrná exprese c-myc transkripčního faktoru, působení cytokinů TNF- α a interleukinů. Tyto klony buněk vznikají transformací imunokompetentních buněk. U těchto klonů lymfocytu dochází k inhibici apoptózy, klony daného lymfocytu se začínají v orgánu akumulovat (Mladoševičová et al. 2011).

U pacientů s CLL dochází zpočátku k proliferaci lymfocytů (zvýšené hladiny $5 \times 10^9/l$), které neutlačují nárůst ostatních krevních elementů. V případě, že zvýšená hladina leukocytů přetrvává (cca 3 měsíce), pacientovi je diagnostikována CLL. Klony lymfocytu pak utlačují vznik dalších krevních elementů. V tomto důsledku vznikají různé druhy anémií, trombocytopenie či neutropenie (Papajík et al. 2002b).

Schopnost lymfocytu generovat jeho klony však může být dána už ve stádiu hematopoetické kmenové buňky, což naznačuje, že primární leukemogenní stav v CLL může zahrnovat samoobnovení hematopoetické kmenové buňky (Kikushige et al. 2011). Předpokládá se, že leukemická transformace hematopoetické kmenové buňky je iniciována specifickými genetickými změnami způsobenými odstraněním specifických miRNA genů, a tím snížení citlivosti lymfocytu vůči apoptóze (Calin et al. 2002).



Obrázek 4: Vznik chronické lymfocytární leukémie. Působením patogenetických faktorů na lymfocyt vznikají jeho klony, které nejsou schopny apoptózy a akumulují se v orgánech na úkor dalších krevních derivátů.

2.1.3. Role mikroprostředí

Je známo, že CLL buňky nejsou schopny přežít *in vitro*, role mikroprostředí (například působení IL-4 nebo IFN- α) je pro CLL buňky klíčová. Bez mikroprostředí se inhibuje antiapoptický protein bcl-2 a je spuštěna apoptóza (Boelens et al. 2009).

Tyto poznatky vedly k tomu, že *in vivo* musí být CLL buňky v kontaktu i s dendritickými buňkami a ostatními buňkami nebo cytokiny, které jim vhodné mikroprostředí zajistí (Caligaris-Cappio et al. 2014).

2.1.4. Genetika CLL

Identifikace kompletního genomu a genetických variant, které regulují patogenezi CLL, je hlavním cílem post-genomového biomedicínského výzkumu (Tan et al. 2008).

V 50 % všech případů jsou u pacientů s CLL přítomny genetické abnormality (Smida 2012). Pacienti s CLL mohou mít buď cytogenetické aberace nebo somatické hypermutace (SHM).

Nejčastější cytogenetickou aberací je delece na dlouhém raménku chromozómu 13 [del(13q14)]. Tato genetická změna se vyskytuje až u 55 % všech případů pacientů

s CLL (Hallek et al. 2013b). U této delecce bylo prokázáno, že se v kritickém regionu del(13q14) vyskytují miRNA, které pak zapříčiňují vznik CLL.

Méně častou, avšak závažnější genetickou změnou, je delecce na dlouhém raménku chromozómu 11 [del(11q)]. Tato delecce se vyskytuje s větší četností u pacientů v pokročilých stádiích CLL (Zenz et al. 2010). Pacienti s del(q11) mají snížené celkové přežití díky poškození genu *ATM* (pacienti s 11q23), který kóduje proximální poškození ATM DNA kinázy (Hallek et al. 2013c).

Trisomie chromozómu 12 je identifikována v 10 – 12 % případů pacientů s CLL (Zenz et al. 2010b). Patogeneze genů s trisomií 12 však není v současné době známa (Seiffert et al. 2012).

Delecce na krátkém raménku chromozómu 17 [del(17p)] je nalezena v 5 – 8 % případů. Pro tuto delecce je téměř vždy charakteristický proužek 17p13, kde se nachází nádorový supresor TP53. Tito pacienti mají velmi špatnou prognózu a jsou označováni jako „ultra-high risk“ (Hallek et al. 2013d).

Další častou genetickou změnou je delecce na 6q [del(6q)], která se vyskytuje u 7 % pacientů s CLL a bývá spojována s horší prognózou.

Všechny tyto zmíněné chromozómové aberace jsou odlišné nejen svou četností, ale i prognózou (**Tabulka 1**). Cytogenetické aberace zhodnocené metodou FISH a jejich hierarchický model vlivů na jejich prognózu definuje 5 podskupin genetických změn u CLL: del(17p), del(11q), trisomie 12, del(6q) a del(13q) (Döhner et al. 2000).

Tabulka 1: Nejčastější genetické změny u pacientů s CLL, jejich procentuální zastoupení a medián přežití pacientů s CLL a určitým typem delecce (Papajík et al. 2002c, Hallek et al. 2013e).

Genetická změna	Výskyt (%)	Medián přežití (roky)	Citace
del(13q)	55	>15,0	Papajík et al. 2002c
del(11q)	17	6,6	Papajík et al. 2002c
trisomie 12	10 – 12	10,9	Papajík et al.2002c
del(17p)	5 – 8	3,6	Papajík et al.2002c
del(6q)	7	11,0	Hallek et al. 2013e

SHM variabilního těžkého řetězce imunoglobulinu (*IgVH*) je v současné době jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů CLL. Pacienti s mutací *IgVH* mají obecně lepší prognózu, většinou mají delší indolentní fázi nemoci. Výjimkou v jinak dobré prognóze pacientů s mutovanými *IgVH* jsou mutace, které zahrnují variantu *V3-21*. Zde je prognóza obvykle stejná jako u pacientů s nemutovanými *IgVH* (Kozák 2008).

Kromě mutace *IgVH* se vyskytují mutace v genech *NOTCH1*, *MYD8*, *TP53*, *ATM*, *SF3B1*, *FBXW7*, *POT1*, *CHD2*, *EXP1*, *KLHL6*, *ZAP-70* atd. Tyto SHM mohou, ale nemusí souviset s mutací *IgVH* (Puente et al. 2011, Rodríguez et al. 2013).

2.1.5. Delece dlouhého raménka na chromozómu 6

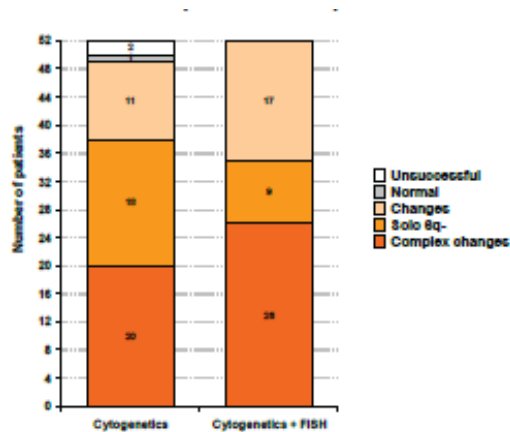
Del(6q) je méně častou genetickou aberací. Vyskytuje se u 7 % pacientů s CLL (Hallek 2013f). Pacienti s del(6q) jsou prognosticky řazeni do skupiny „intermediate–risk“, jelikož del(6q) je spojená s atypickou morfologií lymfocytů, výraznější lymfocytózou, splenomegálií, vyšším výskytem CD38+ a není zde přítomna mutace *IgVH* (Rodríguez et al. 2013b). Del(6q) se u malignit často vyskytuje jako sekundární chromozómová abnormalita (Finn et al. 1998).

Del(6q) se nachází u mnoha typů nádorových onemocnění, jako například u melanomu, rakoviny prostaty, fibroadenomu, karcinomu prsu a dalších. Del(6q) jsou také častými u lymfoidních malignit, jako jsou akutní lymfocytární leukémie (ALL), CLL, non Hodgkinův lymfom (NHL), mnohočetný myelom (MM) a Waldenstörmová makroglobulinémie (WM). Tyto delece mohou být buď terminální nebo intersticiální (Lawce et al. 2009).

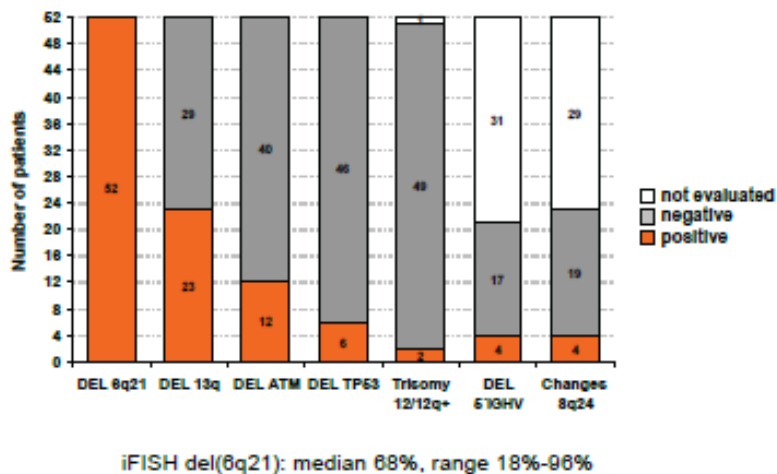
U všech zmíněných genetických změn dochází ve většině případů v průběhu onemocnění k dalším genetickým změnám. U del(6q) byly provedeny analýzy FISH a cytogenetické vyšetření u souboru 52 pacientů s CLL a del(6q). U 61 % případů po cytogenetickém a u 50 % případů po FISH + cytogenetickém vyšetření byly přítomny ještě další genetické změny (**Graf 1 a 2**) (Jarošová et al. 2014).

U del(6q) není doposud znám funkční dopad na expresi genů. U skupiny pacientů s CLL s del(6q) byla provedena arrayCGH, která vyhodnotila minimální deletovanou oblast, kde byly lokalizovány kandidátní geny (**Obrázek 5**), které by mohly mít prognostický a funkční dopad na vývoj CLL (Jarošová et al. 2014b). Minimální deletovaná oblast 6q má velikost 1,4 Mb (**Obrázek 5**). V této minimálně deletované oblasti se nachází

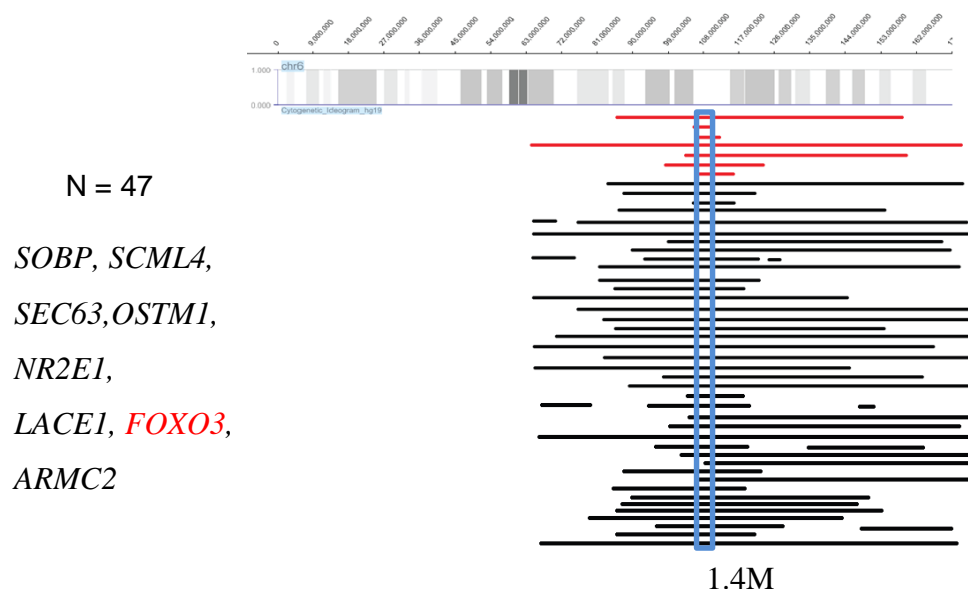
geny *SOBP*, *SCML4*, *SEC63*, *OSTM1*, *NR2E1*, *LACE1*, *FoxO3* a *ARMC2*. Tato bakalářská práce je zaměřena pouze na vybrané geny, které by mohly mít funkční dopad na vývoj onemocnění.



Graf 1: Výsledky cytogenetického vyšetření a FISH u skupiny 52 pacientů s CLL a delecí 6q (6q-) (Jarošová et al. 2014c).



Graf 2: Výsledky FISH u skupiny 52 pacientů s CLL a delecí 6q (6q-) (Jarošová et al. 2014d).



Obrázek 5: Stanovení minimální deletované oblasti na dlouhém raménku chromozómu 6 pomocí arrayCGH (Jarošová et al. 2014e).

2.1.6. Forkhead box (Fox)

U skupiny pacientů s CLL s del(6q) byla provedena arrayCGH, která vyhodnotila minimální deletovanou oblast, kde byly lokalizovány kandidátní geny (**Obrázek 5**). Jedním z těchto genů je gen pro *FoxO3* (Jarošová et al. 2014f).

Gen pro transkripční faktor FoxO3 patří do rodiny Fox proteinů. Tyto Fox proteiny hrají důležitou roli v regulaci genové exprese v procesech buněčné proliferace, apoptózy, oxidačního stresu, embryonálním vývoji a buněčném růstu.

Fox proteiny se řadí do tříd A - R. Forkhead box třídy O (FoxO) patří do obrovské rodiny forkhead transkripčních faktorů, které jsou charakterizovány konzervativní forkhead box DNA - binding doménou (Wang et al. 2009). FoxO proteiny jsou Akt-regulované transkripční faktory (PKB), které se podílí na kontrole buněčného cyklu, DNA opravách, obraně proti stresu, apoptóze a tumorsupresi. FoxO proteiny jsou také důležitými regulátory primární lymfocytární proliferace, přispívají k ukončení buněčného cyklu díky indukci exprese inhibitoru buněčného cyklu p27^{KIP1}. Do savčí forkhead třídy transkripčních faktorů O (FoxO) se řadí proteiny FoxO1, FoxO2, FoxO3, FoxO4 a FoxO6. Aktivita FoxO roste díky proteinkinázám jako JNK, MST1 a AMPK (Essafi et al. 2011).

Transkripční faktor FoxO3 je tumorsupresorem. Akt aktivovaná dráha PI3K růstovými faktory a cytokiny řídí fosforylaci FoxO1, FoxO3 a FoxO4 a tato Akt-

dependentní fosforylace zajišťuje jaderné vyloučení proteinů FoxO3. V leukemických buňkách jsou FoxO3 proteiny esenciálními spouštěči onkogeneze, růstových faktorů nebo rezistence vůči léčbě.

FoxO3a transkripční faktory se nachází na 6q (6q21), která patří do jedné z nejčastěji deletovaných oblastí u maligních onemocnění (Karube et al. 2012).

2.1.7. Nuclear factor – kappa B (*NF-κB*)

Transkripční faktor NF-κB je exprimován ve všech buněčných typech. Reguluje expresi mnoha antiapoptických genů, jejich produkty jsou asociovány s transformací normální buňky na nádorovou buňku a přežíváním nádorové buňky (Prasad et al. 2010). Transkripční faktor NF-κB hraje důležitou roli v klíčových buněčných funkcích jako je regulace apoptózy a tumorogeneze tím, že kontroluje expresi řady cílových genů (Dong et al. 2002). Aktivita NF-κB je jedním z hlavních znaků pro B – malignity a CLL (Frenzel et al. 2011).

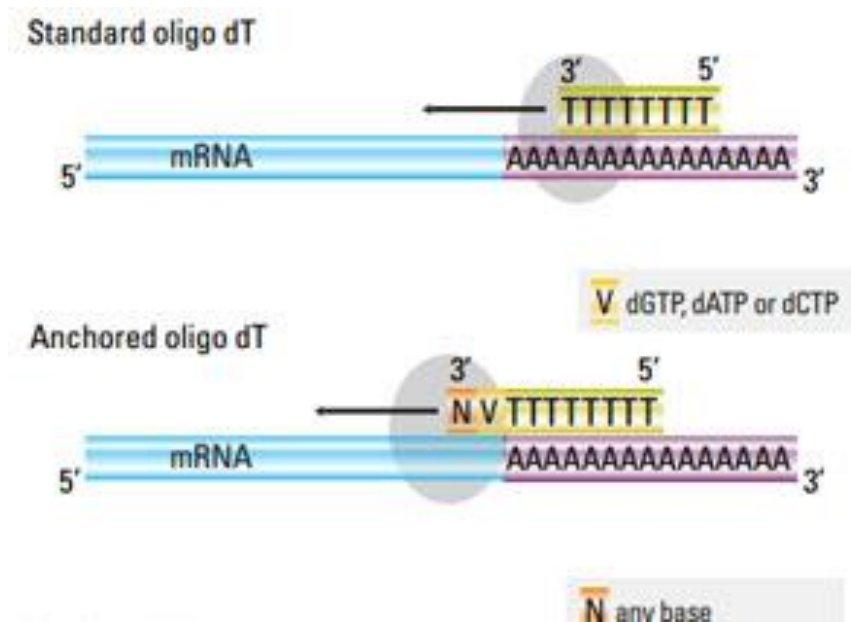
Funkční transkripční faktor NF-κB se skládá z 5 podjednotek: RelA, RelB, c-Rel, p50 (který je se svým prekurzorem p105 znám jako NF-κB1) a p52 (který je se svým prekurzorem p100 znám jako NF-κB2). Tyto podjednotky se chovají jako dimery (jak homodimery, tak i heterodimery), které spolu asociují a dávají dohromady funkční transkripční faktor NF-κB (Huang et al. 2005).

3. Principy metod

3.1. Reverzní transkripce a PCR

mRNA je velmi nestabilní, nedá se příliš dlouho uchovávat a manipulace s ní je rovněž velmi náročná. Proto se využívá reverzní transkripce, kdy je mRNA přepsána do komplementární DNA (cDNA) pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Po reverzní transkripci následuje amplifikace cDNA pomocí PCR.

In vitro reverzní transkripce se provádí ve dvou krocích (**Obrázek 6**). Používají se oligonukleotidy (primery) a náhodné nukleotidy. V této metodě je využito VN kotvy, která je připojena k primeru, kdy V je dGTP, dATP nebo dCTP a N je jakákoliv dusíkatá báze. Tato VN kotva zajistí syntézu vlákna ve směru 5' – 3' (<http://www.thermoscientificbio.com/applications/basic-rt-qpcr/>, navštíveno 19. 4. 2015).



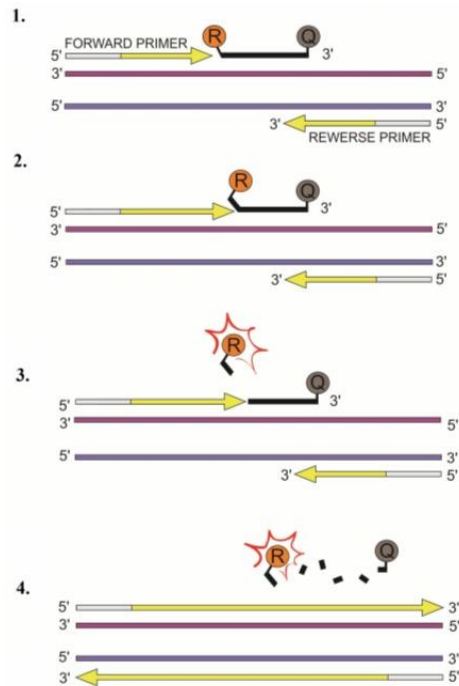
Obrázek 6: Schéma popisující přepis mRNA do cDNA (<http://www.thermoscientificbio.com/applications/basic-rt-qpcr/>, navštíveno 19. 4. 2015).

3.2. Kvantitativní PCR (qPCR) technologií duálně značených sond TaqMan™

Kvantitativní PCR (qPCR) je založena na polymerázové řetězové reakci (PCR), kdy dochází k denaturaci a renaturaci nukleových kyselin, a tak k amplifikaci signálu, který je následovně detekován a kvantifikován. Podstatou qPCR je, že amplifikace DNA může být sledována po každém cyklu v reálném čase, a to díky fluorescenčním sondám, které se hybridizují na DNA. Tyto fluorescenční sondy pak emitují záření, které je přístroj schopen detekovat. Úroveň detekované fluorescence pak odráží množství DNA po každém cyklu (<http://web.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>, navštíveno dne 19. 4. 2015).

Technologie TaqMan™ využívá duálně značených hydrolyzačních sond a 5' exonukleázové aktivity *Taq* polymerázy ke štěpení sondy, která má na svých koncích fluorofor a zhášec (<http://www.generi-biotech.com/sondy-dualne-znacene-sondy/>, navštíveno 19. 4. 2015). Jeden fluorofor je kovalentně navázán na 5' konci oligonukleotidového vlákna, druhý fluorofor – zhášec, je kovalentně vázán na 3' konci tohoto vlákna.

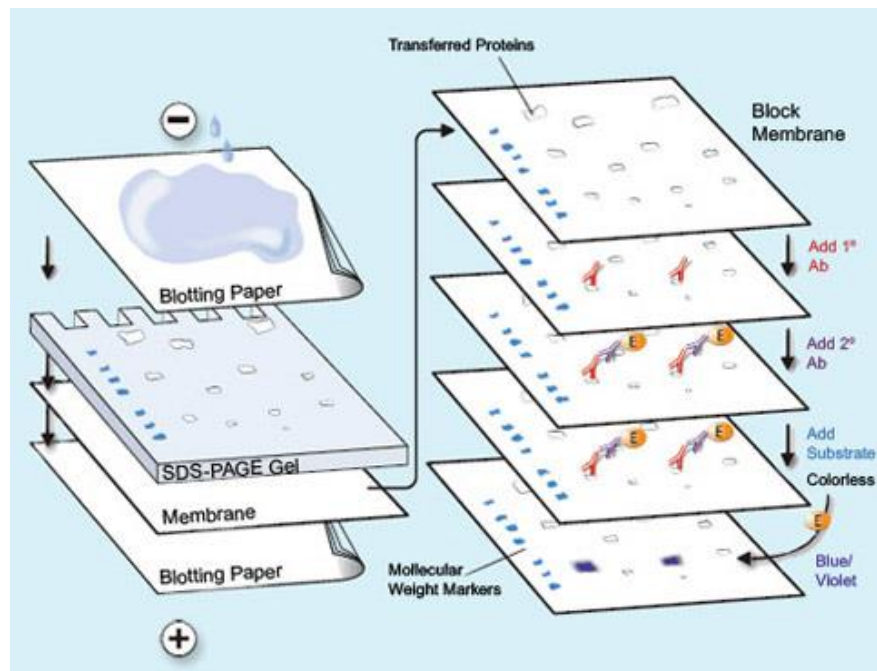
Tyto sondy hybridizují k cílové DNA. Když *Taq* polymeráza dosyntetizuje nově vznikající vlákno až k sondě, 5' exonukleázová aktivita *Taq* polymerázy degraduje tuto sondu. Díky 5' exonukleázové aktivitě se odštěpí fluorofor na 5' konci sondy, a tím se dostane fluorofor do větší vzdálenosti od zhášeče. Zhášec není schopen pohlcovat emitované záření z fluoroforu a emitované záření fluoroforu je pak detekováno real-time přístrojem (**Obrázek 7**) (http://premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html, navštíveno 19. 4. 2015).



Obrázek 7: Princip duálně značených hydrolyzačních sond TaqMan™ (http://premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html, navštíveno 19. 4. 2015).

3.3. SDS–PAGE a Western blotting (WB)

Western blotting (WB) je analytická metoda využívána k separaci a identifikaci proteinů. V této technice je mix proteinů denaturován teplotně a pomocí SDS (dodecyl síran sodný), který jim dodá uniformní záporný náboj - proteiny se pohybují v elektrickém poli ke kladně nabitě anodě. Následně jsou proteiny separovány na základě jejich molekulové hmotnosti pomocí elektroforézy v akrylamidovém gelu. Výsledný produkt elektroforézy je přenesen na membránu (**Obrázek 8**), kde každý proužek prezentuje jeden určitý protein. Tato membrána je pak inkubována s primární protilátkou, která je specifická proti hledanému proteinu, a následně je přidána sekundární, enzymaticky značená protilátka proti primární protilátce (Tahrin et al. 2012). Protein je následně chemiluminiscenčně vizualizován.



Obrázek 8: Systém složení membrány a gelu, postup při detekci proteinu (www.komabiotech.com., navštíveno dne 19. 4. 2015).

4. Cíl práce

Cílem této práce bylo srovnání genových a proteinových expresních profilů vybraných kandidátních molekul u pacientů s CLL s del(6q) a pacientů s CLL bez del(6q) a u kontrolní skupiny zdravých jedinců. Byla studována exprese transkripčního faktoru *FoxO3a*, který se nachází v minimální deletované oblasti na dlouhém raménku chromozomu 6, a dalších vybraných kandidátních molekul (*NF-κB*, *TBX21*, *IL-2* a *BCL10*), které se mohou na patogenezi CLL podílet.

5. Materiál a metodika

5.1. Materiál a vybavení

- **Biologický materiál:**

Periferní krev pacientů.

- **Izolace leukocytů:**

- **Pomůcky:**

Box s laminárním prouděním (Thermo Scientific)

Stojan na zkumavky (Sarstedt)

Stojan na mikrozkušavky (Merci)

Centrifuga chlazená (Sigma Laborzentrifugen)

Pasteurová pipeta (Equmed, 3 ml)

Zkušavky (Gama, 15 ml)

Mikrozkušavky (Eppendorf, 1,5 ml)

Automatická pipeta (Eppendorf research plus)

Plastové špičky s filtrem (Eppendorf)

- **Chemikálie a roztoky:**

Fosfátový pufr (PBS), (Exbio Olomouc s.r.o.)

Flotační roztok (Ficoll), (Sigma-Aldrich)

- **Reverzní transkripce a PCR:**

- **Pomůcky:**

Stolní centrifuga nechlazená – Hermle (Bio Tech)

Proužek 8 PCR mikrozkušavek s vypouklými víčky, PP (Vekon)

Kryjostojánek na mikrozkušavky (Vekon)

Termocyklér (Eppendorf)

Box s laminárním prouděním (Thermo Scientific)

Stripy s víčky pro Rotor-Gene (IAB, 0,1ml)

Rotor-Gene Q (Qiagen)

Plastové špičky s filtrem (Eppendorf)

Automatická pipeta (Eppendorf)

RotorGene Software 6.1.71, Corbett Research

- **Chemikálie a roztoky:**

Voda pro PCR (B. Braun)

Hořčnaté ionty (Thermo Scientific)

PCR pufr (Thermo Scientific)

StartTMTaqDNA polymeráza (Thermo Scientific)

Primery, Sondy (Roche, Life Technologies, IDT), (**Tabulka 6**)

Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche)

- **Příprava buněčných lysátů:**

- **Pomůcky:**

Box s laminárním prouděním (Thermo Scientific)

Vortex (Biosan)

Centrifuga chlazená (SIGMA Laborzentrifugen)

Stojan na mikroskopické skleničky (Merci)

Mikroskopické skleničky (Eppendorf, 1,5ml)

Automatická pipeta (Eppendorf research plus)

Plastové špičky s filtrem (Eppendorf)

- **Chemikálie a roztoky:**

RIPA pufr (Sigma-Aldrich)

Koktejl inhibitorů proteináz (Sigma-Aldrich)

- **SDS-PAGE a Western blotting:**

- **Pomůcky:**

Stojan na skla (Bio-Rad)

Skla 1,5 mm (Bio-Rad)

Plastové hřebeny na gel, pro 9 jamek (Bio-Rad)

Elektroforetická vana (Bio-Rad)

Zdroj napětí (Bio-Rad)

PVDF membrána (Life Technologies)

Třepačka (IKA)

Blotovací aparatura pro elektrotransfer (Bio-Rad)

Röntgenové snímky (Thermo Scientific)

Termo blok (Stvard)

Plastové špičky s filtrem (Neptune)

Automatická pipeta (Eppendorf)

Inkubátor (Life Science)

○ **Chemikálie a roztoky:**

Fosfátový pufr (PBS), (Exbio Olomouc s.r.o.)

Metanol (Nalgen)

Dělicí gel (viz příloha, tab. 1)

Zaostřovací gel (viz příloha tab. 2)

Elektrodový pufr (viz příloha)

Vzorkový pufr (viz příloha)

Promývací roztok (viz příloha)

Blokovací roztok (viz příloha)

Tobwinův roztok (viz příloha)

Stripovací pufr (viz příloha)

GeneRuler Plus Pre–Stained Protein Ladder (Fermentas), (10 – 250 kDa)

Primární protilátka FoxO3a rabbit polyclonal (Cell Signalling), 1:1000, Mr 82 – 97 kDa

Primární protilátka NF–κB rabbit polyclonal (affymetrix eBioscience), 1:1000, Mr 65 kDa

Primární protilátka p–NF–κB rabbit polyclonal (affymetrix eBioscience), 1:1000, Mr 65 kDa

Primární protilátka β–aktin *rabbit polyclonal* (Cell Signalling), 1:1000, Mr 45 kDa

Sekundární protilátka anti-rabbit (Cell Signalling), 1:10000 – 1: 20000

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit (Thermo Scientific)

Vývojka 1:3 (Manual fixing bath AFGA)

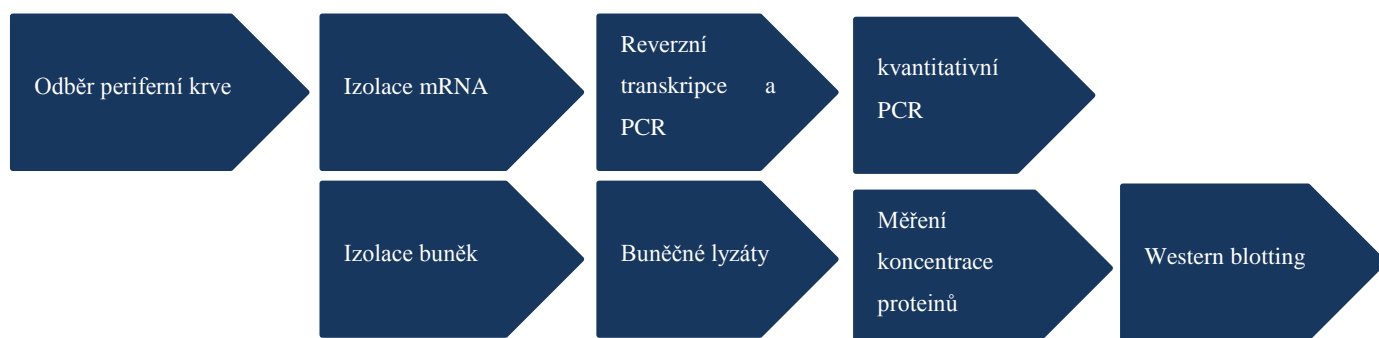
Kyselina octová (Nalgen)

Destilovaná voda (Nalgen)

Stripping buffer (viz příloha)

Pozn.: Ostatní použité chemikálie byly v čistotě p. a. nebo vyšší.

5.2. Schéma postupu práce



5.3. Soubor pacientů a kontrol

Do souboru jedinců, jejichž biologický materiál byl použit na mRNA a proteinovou expresi bylo zahrnuto 22 pacientů s CLL a del(6q), 30 pacientů s CLL bez del(6q) (**Tabulka 1**) a 20 zdravých kontrolních jedinců.

Tabulka 1: Soubor pacientů.

	Pacienti s CLL s del(6q)	Pacienti s CLL bez del(6q)
muži	16	24
ženy	6	6
celkem	22	30

5.4. Odběr vzorků, separace a homogenizace leukocytů

Pro účely molekulární diagnostiky bylo využito 2 - 10 ml periferní krve v ethylendiamintetraoctanu sodném (EDTA).

Pro separaci leukocytů byla použita metoda izolace buněk v hustotním gradientu pomocí flotačního roztoku (Ficoll).

Z izolovaných buněk (leukocytů) byly předpřipraveny buněčné lyzáty pomocí lizačního pufru RIPA a koktejlu inhibitoru proteináz. K peletě leukocytů bylo přidáno 150 μ l pufru RIPA a 1,5 μ l koktejlu inhibitoru proteináz. Takto připravený vzorek byl vortexován a stočen na centrifuze na 10000 ot./ 10 minut (tento krok je nutný, aby se vsrážely tzv. “debris”).

5.5. Reverzní transkripce a PCR

Veškerá práce byla prováděna na ledě, protože mRNA je velmi nestabilní molekula. Pro reverzní transkripci byl použit komerční kit Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche, 04 897 030 001).

Nejprve byl připraven Template–primer mix (**Tabulka 2**). Na jednu reakci bylo potřeba 7 μl vody pro PCR a 1 μl Anchored–oligo (dT). Do 0,2 ml PCR mikrozkušavek s vypouklým víčkem bylo napipetováno 8 μl Template–primer mixu.

Do každé zkumavky pak byl přidán příslušný vzorek mRNA o objemu 5 μl . Zkumavky pak byly centrifugovány a dány do termocykléru, kde byly zahřáty na 65 °C po dobu 10 minut. Poté byly mikrozkušavky chlazeny 5 minut na ledu.

Do všech mikrozkušavek pak bylo přidáno 7 μl RT–mixu (**Tabulka 3**). Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 4 μl Transcriptor reverse transcriptase reaction buffer, 0,5 μl Protector RNase inhibitor (40 U/ μl), 2 μl Deoxynucleotide mix (10 mmol/l) a 0,5 μl Transcriptor reverse transcriptase.

Mikrozkušavky byly poté opět centrifugovány a vloženy do termocykléru, kde byl nastaven program na 65 minut (60 minut inkubace při 50 °C, 5 minut inaktivace při 85 °C).

Produkt v mikrozkušavkách (cDNA) byl poté zchlazen na 4 °C a skladován při teplotě -20 °C.

Tabulka 2: Template–primer mix.

Reagencie	Objem na jednu reakci [μl]
Voda pro PCR	7,0
Anchored–oligo (dT)	1,0
Celkem	8,0

Tabulka 3: Mix pro reverzní transkripci.

Reagencie	Objem na jednu reakci [μ l]
Transcriptor reverse transcriptase reaction buffer	4,0
Protector RNase inhibitor (40 U/ μ l)	0,5
Deoxynucleotide mix (10 mmol/l)	2,0
Transcriptor reverse transcriptase	0,5
Celkem	7,0

5.6. Kvantitativní PCR (qPCR)

qPCR byla provedena v teplotním profilu (**Tabulka 4**) vhodném pro Thermo–Start™ *Taq*DNA polymerázu (Life Technologies) v celkovém objemu jedné reakce 25 μ l. Na sledování exprese genů byly použity fluorescenční sondy TaqMan™ (Life Technologies, IDT) (**Tabulka 6**).

Do každé mikrokumavky o objemu 0,1 ml bylo napipetováno 11,55 μ l vody pro PCR, 2,5 μ l AB pufry (10x), 3,5 μ l MgCl₂ (25 mmol/l), 1 μ l dNTPs (10 mmol/l), 1,25 μ l AB mix (assay) a 0,2 Thermo–Start™ *Taq*DNA. Do mikrokumavek bylo napipetováno vždy 20 μ l reakčního mixu (**Tabulka 5**).

Do mikrokumavek s reakčním mixem byl přidán příslušný vzorek cDNA. K měření fluorescence byl použit přístroj Rotor–GeneQ. Pro vyhodnocení dat byla použita metoda druhé derivace (RotorGene Software 6.1.71, Corbett Research). Výsledky exprese genů pacientů s CLL del(6q) byly porovnány s housekeepingovým genem PKG1.

Tabulka 4: Teplotní profil qPCR.

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	15	1
Denaturace	94	30	40
Nasedání primerů	60	45	40
Syntéza DNA	72	60	40
Celkem	72	300	1

Tabulka 5: Protokol pro qPCR (Life Technologies, IDT).

Reagencie	Objem na jednu reakci [μ l]
Voda pro PCR	11,55
AB pufr (10x)	2,5
MgCl ₂	3,5
dNTPs (10 mmol/l)	1,0
AB mix (assay)	1,25
Thermo-Start TM TaqDNA	0,2
Celkem	20

Tabulka 6: Popis studovaných genů, použitých sond a primerů pro qPCR.

Zkratka genu	Název genu	Referenční číslo	Poloha sondy (exony)	Assay ID	Výrobce
<i>FoxO3</i>	Forkhead box O3	NM_201559	1-2	Hs.PT.56a.39296574	IDT
<i>NF-κB1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B - cells	NM_001165412.1	16-17	Hs.PT.56a.20344216	IDT
<i>BCL10</i>	B-cell CLL/lymphoma	NM_003921	2-3	Hs.PT.56a.4981478	IDT
<i>TBX21</i>	T – box 21	NM_013351	1-2	Hs.PT.56a.3936407	IDT
<i>IL-2</i>	Homo sapiens interleukin 2	NM_000586.3	2-3	Hs00174114_m1	Life Technologies
<i>PKG1</i>	phosphoglycerate kinase 1	NM_000291	4-5	Hs.PT.39a.1406561	IDT

5.7. SDS–PAGE a Western blotting

Pro stanovení koncentrace proteinů v lyzátech byl použit ELISA reader a Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Vzorky byly připraveny dle návodu z Pierce BCA Protein Assay Kit a napipetovány do mikrotitrační destičky. Absorbance vzorků byla změřena na ELISA readru při 540 nm. Z výsledných absorbancí byla vyhotovena kalibrační křivka a podle rovnice přímky vypočtena koncentrace proteinů. Podle výsledků byly vzorky naředěny na stejnou koncentraci.

K tomu, aby byl detekován určitý protein, (v případě této práce proteiny FoxO3a, NF- κ B, p-NF- κ B a referenční protein β -aktin), bylo nutné proteiny ze vzorku od sebe separovat. Pro separaci proteinů byla využita metoda SDS-PAGE. Byla sestavena aparatura na nalévání gelu, kde byl nalit 10% dělicí gel do 2. třetiny skla (**viz příloha, Tabulka 1**), na tento dělicí gel byl nalit butanol, který odstranil bubliny a vyrovnal povrch gelu. Butanol byl po zatuhnutí gelu odstraněn a vymyt destilovanou vodou. Po zaschnutí dělicího gelu byl na dělicí gel nalit 4% zaostřovací gel (**viz příloha, Tabulka 2**). Do zaostřovacího gelu, mezi skla byl vložen hřeben pro 9 jamek.

Poté byl gel vložen do elektroforetické vany, kde byl zalit do migračního pufru, byl vyndán hřeben a do jamek byly napipetovány, vzorky: 10 μ l markru do první jamky a do ostatních jamek 20 μ l roztoku vzorku se vzorkovacím pufrem (1:4), kdy takto připravené roztoky vzorků byly inkubovány při 95 °C 5 minut. (Vzorkovací pufr obsahuje dodecyl síran sodný (SDS), který denaturuje proteiny a zároveň jim dodá záporný náboj, takže se proteiny pohybují ke kladné anodě). Byla spuštěna elektroforéza (150 V), která zajistila separaci proteinů v gelu podle jejich molekulové hmotnosti.

PVDF membrána byla inkubována 1 minutu v metanolu, poté 1 minutu v destilované vodě a poté byla vložena do Tobwinova roztoku. Taktéž filtrační papíry, které byly použity při blottingu byly ponořeny do Tobwinova roztoku.

Po ukončení elektroforézy byly proteiny separované v gelu přebloťovány na PVDF membránu pomocí blotovací aparatury pro elektrotransfer, která byla připojena ke zdroji elektrického napětí a zapnuta na 150 mA po dobu 1,5 hodiny. PVDF membrána pak byla promyta v promývacím roztoku, a poté byla inkubována přes noc při 4 °C v blokovacím roztoku, určeného k zablokování nespecifických vazeb primární protilátky. Na takto připravenou PVDF membránu byl nanesen roztok primární protilátky proti FoxO3a (1:1000),

NF- κ B (1:1000), p-NF- κ B (1:1000) a β -aktinu (1:1000), v blokovacím roztoku. Tento roztok s primární protilátkou byl s membránou inkubován přes noc při 4 °C. Poté byla PVDF membrána promývána 3 x 10 minut promývacím roztokem PBS/T.

Poté byl na PVDF membránu nanesen roztok sekundární protilátky, značené křenuvou peroxidázou (HRP) (1:10000 – 1:20000) v blokovacím roztoku. Sekundární protilátka se nechala působit 1 hodinu při laboratorní teplotě. Sekundární protilátka se specificky navázala na primární protilátku. Sekundární protilátku bylo také třeba řádně promýt 5 x 5 minut promývacím roztokem.

Na membránu byl přidán SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit (Thermo Scientific), který rozložil bezbarvou a rozpustnou HRP navázanou na sekundární protilátce na nerozpustný, barevný produkt.

Takto připravená PVDF membrána byla zatavena do fólie. A výsledný snímek byl vyvolán ve fotokomoře na rentgenový snímek.

PVDF membránu je možno opakovaně použít. Téže PVDF membrána byla použita k detekci transkripčních faktorů FoxO3a, NF- κ B, p-NF- κ B a referenčního proteinu β -aktinu. Po vyvolání membrány na rentgenový snímek byla membrána promyta promývacím roztokem a poté inkubována 45 minut ve stripovacím pufru (**viz příloha**) při 37 °C. Po 45 minutách byla membrána 4 x 5 minut promyta v promývacím roztoku. Takto připravená membrána byla použita k detekci dalšího sledovaného proteinu v buněčných lyzátech.

6. Výsledky

6.1. Výsledky exprese vybraných genů (*FoxO3a*, *NF-κB*, *TBX21*, *IL-2*, *BCL10*, *PGK1*) provedené pomocí qPCR

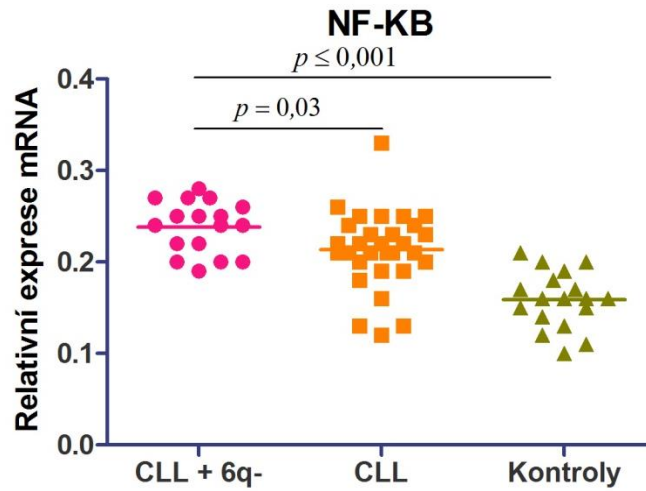
U skupiny pacientů s CLL s del(6q), s CLL bez del(6q) a u kontrolní skupiny jedinců byla provedena reverzní transkripce, PCR a qPCR (viz kapitoly 4.5 a 4.6) u vybraných genů (*NF-κB*, *FoxO3*, *IL-2*, *TBX21* a *BCL10*), které leží v minimální deletované oblasti na dlouhém raménku chromozómu 6 nebo s ní souvisí. Všechny výsledky byly vztaženy k referenčnímu (housekeepingovému) genu *PGK1*.

Porovnání exprese mezi skupinami pacientů a kontrolních jedinců bylo provedeno pomocí neparametrického Mann – Whitney U – testu. Pro analýzu dat byl použit statistický program GraphPad Prism 5.01. Hodnoty $p \leq 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

Nejvíce deregulované geny v minimální deletované oblasti na dlouhém raménku chromozómu 6 u pacientů s CLL a del(6q) byly *NF-κB* a *FoxO3* (**Tabulka 7**).

6.1.1. Výsledky exprese *NF-κB*

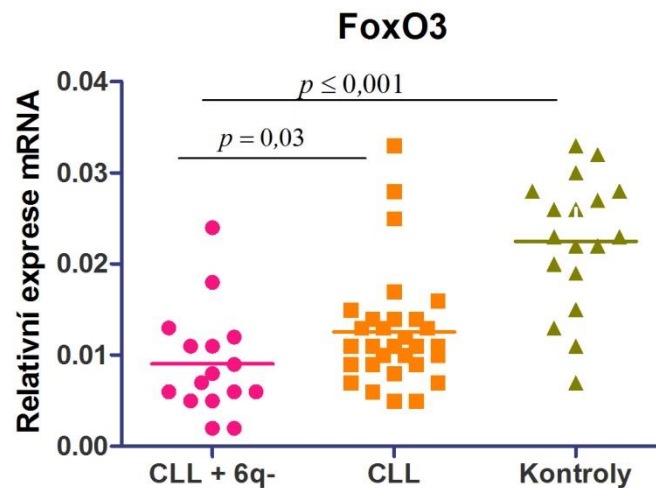
U skupiny pacientů s CLL s del(6q) byla pozorována vyšší exprese transkripčního faktoru *NF-κB* oproti pacientům s CLL bez delece ($p = 0,03$). U skupiny pacientů s CLL s del(6q) byla detekována zvýšená exprese *NF-κB* oproti kontrolní skupině jedinců ($p < 0,0001$) (**Graf 3**).



Graf 3: Výsledky exprese *NF-κB* u pacientů s CLL s delecí 6q (6q-), bez delecce a zdravých kontrolních jedinců.

6.1.2. Výsledky exprese *FoxO3*

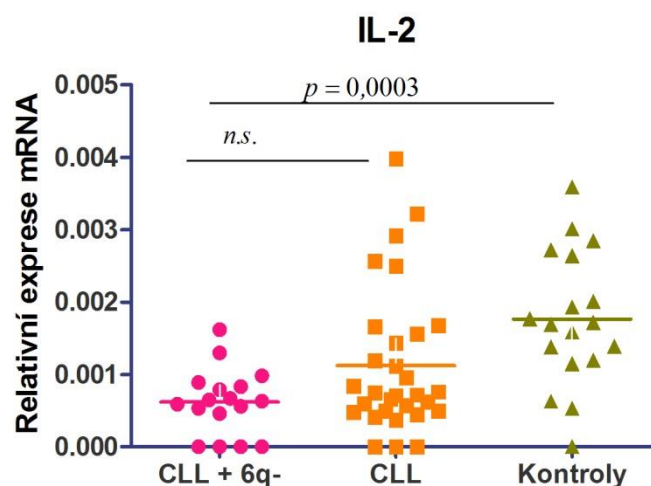
U skupiny pacientů s CLL a del(6q) byla pozorována nižší exprese oproti pacientům s CLL bez delecce ($p = 0,03$). U skupiny pacientů s CLL a del(6q) byla u *FoxO3* také snižená exprese oproti kontrolní skupině jedinců ($p < 0,0001$) (**Graf 4**).



Graf 4: Výsledky exprese *FoxO3* u pacientů s CLL s delecí 6q (6q-), bez delecce a zdravých kontrolních jedinců.

6.1.3. Výsledky exprese *IL-2*

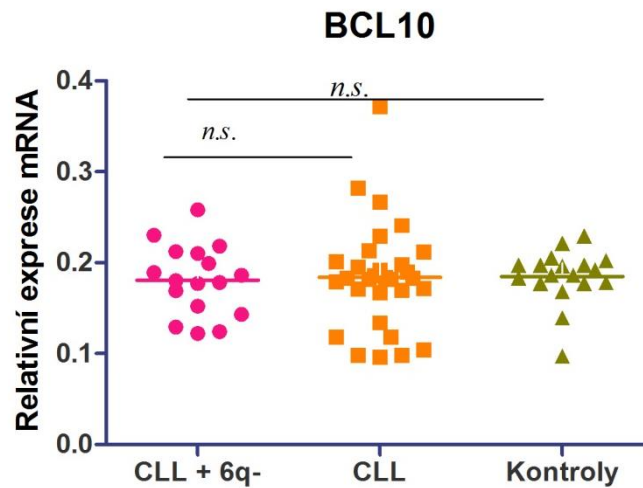
Při porovnání skupin pacientů s CLL s del(6q) a bez del(6q) nebyl pozorován rozdíl v expresi *IL-2* ($p = 0,166$). U skupiny pacientů s CLL s del(6q) byla u *IL-2* pozorována snížená exprese oproti kontrolní skupině jedinců ($p = 0,003$) (**Graf 5**).



Graf 5: Výsledky exprese *IL-2* u pacientů s CLL s delecí 6q (6q-), bez delecce a zdravých kontrolních jedinců.

6.1.4. Výsledky exprese *BCL10*

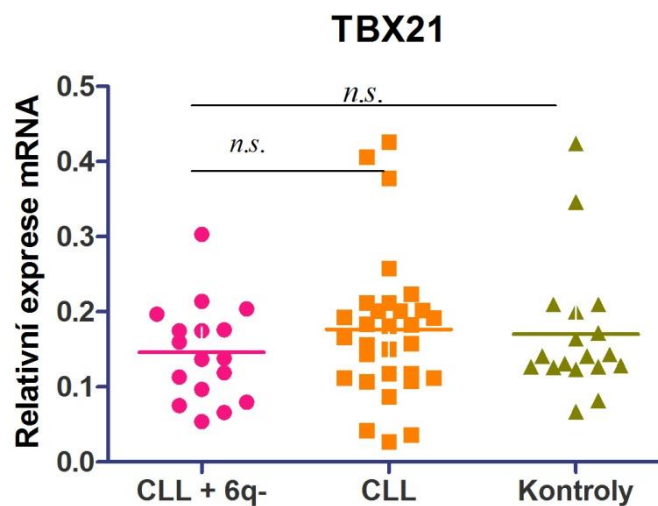
Při porovnání skupin pacientů s CLL s del(6q) a bez delecce nebyl detekován rozdíl v expresi *BCL10* ($p = 0,991$). Exprese *BCL10* se nelišila ani při porovnání skupiny pacientů s CLL s del(6q) se skupinou kontrolních jedinců ($p = 0,692$) (**Graf 6**).



Graf 6: Výsledky exprese *BCL10* u pacientů s CLL s delecí 6q (6q-), bez delece a zdravých kontrolních jedinců.

6.1.5. Výsledky exprese *TBX21*

Expresa *TBX21* se nelišila mezi skupinami pacientů s CLL s del(6q) a bez delece ($p = 0,303$), ani při porovnání skupiny pacientů s CLL s del (6q) s kontrolními jedinci ($p = 0,519$) (**Graf 7**).



Graf 7: Výsledky exprese *TBX21* u pacientů s CLL s delecí 6q (6q-), bez delece a zdravých kontrolních jedinců.

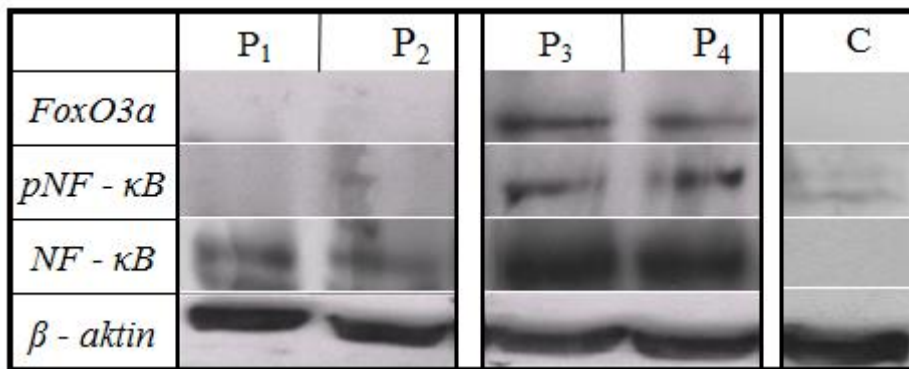
Tabulka 7: Shrnutí výsledků genové exprese u vybraných genů, které leží v minimální deletované oblasti na dlouhém raménku chromozómu 6.

molekula	CLL s del(6q) vs CLL bez del(6q)	CLL s del(6q) vs kontrola
<i>NF-κB</i>	p = 0,03*↑	p < 0,0001*↑
<i>FoxO3</i>	p = 0,03*↓	p < 0,0001*↓
<i>IL-2</i>	p = 0,166	p = 0,003*↓
<i>BCL10</i>	p = 0,991	p = 0,692
<i>TBX21</i>	p = 0,303	p = 0,519

*geny, které byly signifikantně deregulovány, ↑ geny, u kterých byla zvýšená exprese oproti kontrolním jedincům, ↓ geny, u kterých byla snižená exprese oproti kontrolním jedincům.

6.2. Proteinová exprese vybraných molekul (*FoxO3a*, *NF-κB*, *p-NF-κB*) provedená pomocí Western blottingu

Detekce proteinů pomocí metody western blotting byla provedena pouze u těch molekul, které vykazovaly deregulaci genové exprese u pacientů s CLL s del(6q) oproti pacientům s CLL bez del(6q). Z výsledků qPCR vyplývá, že nejvíce deregulovanými geny u pacientů s CLL s del(6q) jsou geny *FoxO3a* a *NF-κB*. Pro ověření těchto výsledků na proteinové úrovni byla provedena metoda Western blotting (viz kapitola 4.7), kdy byla prokázána rozdílná exprese proteinů *FoxO3a*, *p-NF-κB*, *NF-κB*. Exprese jednotlivých proteinů byla porovnána s expresí referenčního proteinu β-aktinu (**Obrázek 9**).



Obrázek 9: Výsledky detekce proteinů FoxO3a, pNF – κB, NF – κB a β–aktinu u pacientů s CLL bez del(6q) (P₁ a P₂), CLL s del(6q) (P₃ a P₄) a kontroly C (reprezentativní obrázek).

6.2.1. *FoxO3*

Z výsledků z qPCR vyplývá, že gen pro *FoxO3a* je u pacientů s CLL s del(6q) méně exprimován než u pacientů s CLL bez del(6q) a kontrolních jedinců.

Po provedení Western blottingu však bylo zjištěno, že protein FoxO3a je naopak exprimován více u pacientů s CLL s del (6q) než u pacientů s CLL bez delece. U kontrolních jedinců nebyl tento protein exprimován vůbec.

6.2.2. *NF–κB* a *p-NF–κB*

Z výsledků qPCR vyplývá, že gen pro *NF–κB* je u pacientů s CLL a del(6q) exprimován více než u pacientů s CLL bez delece a kontrolních jedinců.

Po provedení Western blottingu bylo zjištěno, že protein NF–κB je exprimován u pacientů s CLL s del(6q). I u pacientů s CLL bez delece byl NF–κB detekován, zatímco u kontrolních jedinců nebyl tento protein detekován. Tato proteinová exprese odpovídá výsledkům genové exprese.

U proteinu NF–κB byla detekována pomocí Western blottingu i jeho aktivní, fosforylovaná forma, p-NF–κB, která byla exprimována pouze u pacientů s CLL a del(6q). U pacientů s CLL bez delece a kontrolních jedinců nebyl p-NF–κB exprimován.

7. Diskuse

CLL je lymfoproliferativní onemocnění charakteristické proliferací CD5+ B – lymfocytů. Pro CLL jsou charakteristické genetické změny, zejména delece [del(11q), del(6q), del(17p)] a trisomie 12. Tato práce se zabývala studiem delece dlouhého raménka na chromozómu 6, kde se nachází minimální deletovaná oblast, obsahující řadu genů. (Jarosova et al. 2014). Delece této oblasti, a tedy genů, které v ní leží, by mohla mít funkční dopad na prognózu a vývoj nemoci.

Cílem této práce bylo sledování mRNA expresních profilů vybraných genů (*NF- κ B*, *FoxO3a*, *IL-2*, *TBX21* a *BCL10*), které leží v minimální deletované oblasti na dlouhém raménku chromozómu 6, a jejich porovnání u pacientů s CLL a del(6q), pacientů s CLL bez del(6q) a u kontrolní skupiny jedinců.

První zkoumanou molekulou byl transkripční faktor NF- κ B, u něhož byla pozorována zvýšená mRNA exprese u pacientů s CLL s del(6q) a bez del(6q) v porovnání s kontrolní skupinou jedinců. Exprese NF- κ B na proteinové úrovni korelovala s mRNA expresí: byla detekována zvýšená exprese NF- κ B proteinu u pacientů s CLL s del(6q) v porovnání s pacienty s CLL bez del(6q) a kontrolními jedinci. Aktivní, fosforylovaná forma (p-NF- κ B) byla detekována pouze u pacientů s CLL s del(6q). Vysoké hladiny NF- κ B u B – lymfocytů pacientů s CLL oproti hodnotám detekovaným v B - lymfocytech zdravých jedinců již byly prokázány (Skórka et al. 2014). Zvýšení aktivity NF- κ B vede ke zvýšené proliferaci nádorových buněk a zvýšená aktivita NF- κ B je obecně charakteristická pro CLL (Frenzel et al. 2011b). Exprese NF- κ B byla zvýšena také u pacientů s CLL s del(6q) oproti pacientům bez delece (Jarošová et al. 2014f).

Druhou zkoumanou molekulou byl transkripční faktor FoxO3, u kterého byla pozorována snížená mRNA exprese u pacientů s CLL s del(6q) oproti pacientům s CLL bez delece a kontrolním jedincům. Na proteinové úrovni byl naopak FoxO3a přítomen zejména u pacientů s CLL s del(6q), u pacientů s CLL bez delece a kontrolních jedinců FoxO3a přítomen nebyl. Rozdílná exprese FoxO3 na genové a proteinové úrovni může být způsobena posttranskripčními a posttranslačními regulačními mechanismy (Mehra et al. 2003). FoxO3a se podílí na kontrole buněčného cyklu, DNA opravách, obraně proti stresu, apoptóze a tumorsupresi (Essafi et al. 2011b). Gen pro FoxO3a se nachází na dlouhém raménku chromozómu 6 v oblasti 6q21, jedné z nejčastěji deletovaných oblastí u maligních onemocnění (Karube et al. 2012b). Inaktivací transkripčního faktoru FoxO3a přispívají

homeostatické chemokiny k rezistenci vůči apoptóze a tím ke vzniku maligních onemocnění (Ticchioni et al. 2007c).

Třetí zkoumanou molekulou byl cytokin IL-2. U tohoto genu byla u pacientů s CLL s del(6q) snižená exprese oproti kontrolní skupině jedinců. IL-2 je u CLL významným antiapoptickým faktorem. Transdukce antiapoptického signálu IL-2 probíhá prostřednictvím dalších molekul jako MAP kinázy, PI-3K. Tato transdukce signálu ovlivňuje buněčnou proliferaci a inhibici apoptózy (Decker et al. 2010).

Další zkoumanou molekulou byl transkripční faktor TBX21 (T-bet), u něhož nebyl pozorován rozdíl v expresi mezi podskupinami pacientů a kontrolních jedinců. Jedná se o klíčový transkripční faktor Th1 imunitní odpovědi. Vysoká exprese TBX21 se v lidském těle byla popsána především v Th1 lymfocytech (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/genes/ENSG00000073861>, navštíveno 19. 5. 2014). T-bet transkripční faktory (do podskupiny T-bet patří i zkoumaný gen *TBX21*) jsou exprimovány v neoplazmatech, které jsou odvozeny od paměťových buněk. Tato neoplazmata jsou prekurzory většiny B buněčných lymfoproliferativních onemocnění včetně CLL. T-bet by v budoucnu mohl sloužit jako užitečný prognostický marker při diagnostice B lymfoproliferativních onemocnění (Dorfman et al. 2004).

Následující zkoumanou molekulou byl transkripční faktor BCL10, u něhož nebyl pozorován rozdíl v expresi mezi podskupinami pacientů a kontrolních jedinců. BCL10 se podílí na aktivaci NF- κ B, avšak bylo zjištěno, že BCL10 se zřejmě nepodílí na vývoji CLL (Yuille et al. 1999).

Tato studie prokázala rozdílné expresní profily vybraných molekul u CLL pacientů s del(6q) a bez del(6q) a na základě těchto faktů poukazuje na klíčovou roli deregulovaných genů ležících v minimální deletované oblasti na chromozómu 6 u pacientů s CLL s del(6q) a souvislost těchto genů se špatnou prognózou onemocnění u těchto pacientů. Pro ověření těchto výsledků a vyhodnocení funkčního dopadu delece dlouhého raménka chromozómu 6 a genů v něm obsažených na vývoj a prognózu onemocnění, bude potřeba ještě dalších studií na širším souboru pacientů.

8. Závěr

V teoretické části se tato práce zabývala studiem CLL a funkčního dopadu delece dlouhého raménka na chromozómu 6 na expresi genů u pacientů s CLL.

V praktické části této práce byla provedena qPCR u kandidátních genů (*FoxO3a*, *NF-κB*, *TBX21*, *IL-2* a *BCL10*). U těchto genů byly vyhodnoceny expresní profily u pacientů s CLL s del(6q), pacientů bez del(6q) a kontrolních zdravých jedinců. Největší deregulaci vykazovaly geny *FoxO3* a *NF-κB*. U těchto genů byla ověřena exprese na proteinové úrovni pomocí Western blottingu. U proteinu FoxO3a se nepotvrdila zvýšená exprese u pacientů s CLL s del(6q). U proteinu NF-κB byla naopak potvrzena zvýšená exprese u pacientů s CLL s del(6q) v porovnání s pacienty s CLL bez delece.

9. Literatura

Berndt S. I., Skibola C. F., Joseph V., Camp N. J., Nieters A., Wang Z., Cozen W., Monnereau A., Wang S. S., Kelly R. S., Lan Q., Teras L. R., Chatterjee N., Chung C. C., Yeager M., Brooks-Wilson A. R., Hartge P., Purdue M. P., Birmann B. M., Armstrong B. K., Cocco P., Zhang Y., Severi G., Zeleniuch-Jacquotte A., Lawrence C., Burdette L., Yuenger J., Hutchinson A., Jacobs K. B., Call T. G., Shanafelt T. D., Novak A. J., Kay N. E., Liebow M., Wang A. H., Smedby K. E., Adami H. O., Melbye M., Glimelius B., Chang E. T., Glenn M., Curtin K., Cannon-Albright L. A., Jones B., Diver W. R., Link B. K., Weiner G. J., Conde L., Bracci P. M., Riby J., Holly E. A., Smith M. T., Jackson R. D., Tinker L. F., Benavente Y., Becker N., Boffetta P., Brennan P., Foretova L., Maynadie M., McKay J., Staines A., Rabe K. G., Achenbach S. J., Vachon C. M., Goldin L. R., Strom S. S., Lanasa M. C., Spector L. G., Leis J. F., Cunningham J. M., Weinberg J. B., Morrison V. A., Caporaso N. E., Norman A. D., Linet M. S., De Roos A. J., Morton L. M., Severson R. K., Riboli E., Vineis P., Kaaks R., Trichopoulos D., Masala G., Weiderpass E., Chirlaque M. D., Vermeulen R. C., Travis R. C., Giles G. G., Albanes D., Virtamo J., Weinstein S., Clavel J., Zheng T., Holford T. R., Offit K., Zelenetz A., Klein R. J., Spinelli J. J., Bertrand K. A., Laden F., Giovannucci E., Kraft P., Krickler A., Turner J., Vajdic C. M., Ennas M. G., Ferri G. M., Miligi L., Liang L., Sampson J., Crouch S., Park J. H., North K. E., Cox A., Snowden J. A., Wright J., Carracedo A., Lopez-Otin C., Bea S., Salaverria I., Martin-Garcia D., Campo E., Fraumeni J. F. Jr., de Sanjose S., Hjalgrim H., Cerhan J. R., Chanock S. J., Rothman N., Slager S. L. (2013): Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 45: 868 – 76

Boelens J., Lust S., Vanhoecke B., Offner F. (2009): Chronic lymphocytic leukaemia. *Anticancer Res*, 29(2): 605 - 15

Brown J. R. (2013): Inherited susceptibility to chronic lymphocytic leukemia evidence and prospects for the future. *Ther Adv Hematol*, 4(4): 298 - 308

Caligaris-Cappio F., Bertilaccio M. T., Scielzo C. (2014): How the microenvironment wires the natural history of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol*, 24: 43 - 8

Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M, Bullrich F., Croce C. M. (2002): Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 26,99(24): 15524 – 9

Dalsass A., Mestichelli F., Ruggieri M., Gaspari P., Pezzoni V., Vagnoni D., Angelini M., Angelini S., Bigazzi C., Falcioni S., Troiani E., Alesiani F., Catarini M., Attolico I., Scortechini I., Discepoli G., Galieni P. (2013): 6q deletion detected by fluorescence in situ hybridization using bacterial artificial chromosome in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*, 91(1): 10 – 9

Decker T., Bogner C., Peschel C., Ringshausen I.(2010): Antiapoptotic effect of interleukin-2 (IL-2) in B-CLL cells with low and high affinity IL-2 receptors. *Ann Hematol*, 89(11): 1125 - 32

Decker T., Bogner C., Oelsner M., Peschel C., Ringshausen I. (2004): T-bet, a T-cell-associated transcription factor, is expressed in a subset of B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*, 122(2): 292 – 7

Dong Q. G., Scwabas G. M., Fujioka S., Schmidt C., Peng B., Wu T., Tsao M. S., Evans D. B., Abbruzzese J. L., McDonnell T. J., Chiao P. J. (2002): The function of multiple I κ B : NF- κ B complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. *Oncogene*, 21(42):6510 - 9

Dores G. M., Anderson W. F., Curtis R. E., Landgren O., Ostroumova E., Bluhm E. C., Rabkin C.S., Devesa S. S., Linet M. S. (2007): Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol*, 139(5): 809 - 19

Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Kröber A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P. (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343(26): 1910 - 1916

Essafi M., Baudot A. D., Mouska X., Cassuto J. P., Ticchioni M., Deckert M. (2011): Cell-penetrating TAT-FOXO3 fusion proteins induce apoptotic cell death in leukemic cells. *Mol Cancer Ther*, 10(1): 37 – 46

Finn W. G., Kay N. E., Kroft S. H., Church S., Peterson L. C. (1998): Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of karyotypic instability in 51 patients. *Am J Hematol*, 59: 223 – 229

Frenzel L. P., Claus R., Plume N., Schwamb J., Konermann C., Pallasch C. P., Claasen J., Brinker R., Wollnik B., Plass C., Wendtner C. M. (2011): NF- κ B activity in chronic lymphocytic leukemia is independent of genetic and epigenetic alterations in the TNFAIP3 (A20) locus. *Int J Cancer*, 128(10): 2495 - 500

Gasparini C., Celeghini C., Monasta L., Zauli G. (2014): NF- κ B pathways in hematological malignancies. *Cell Mol Life Sci*, 71(11): 2083 - 102

Hallek M. (2013): Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*, 88(9): 803 - 16

Huang D. B., Vu D., Ghosh G. (2005): NF- κ B RelB forms an intertwined homodimer. *Structure*, 13(9): 1365 - 73

Jarsova M., Hrubá M., Oltová A., Urbanková H., Kruzová L., Kriegová E., Holzerová M., Procházka V., Urbanová R., Papajik T., Doubek M., Vozobulová V., Indrak K. (2014): Targeted arrayCGH used for determining minimally deleted region on chromosome 6q in chronic lymphocytic leukemia patients Milan 19. kongres, European Hematooncology Association 2014

Karube K., Tsuzuki S., Yoshida N., Arita K., Liu F., Kondo E., Ko Y. H., Ohshima K., Nakamura S., Kinoshita T., Seto M. (2012): Lineage-specific growth inhibition of NK cell lines by FOXO3 in association with Akt activation status. *Exp Hematol*, 40(12):1005 - 1015

Kikushige Y., Ishikawa F., Miyamoto T., Shima T., Urata S., Yoshimoto G., Mori Y., Iino T., Yamauchi T., Eto T., Niino H., Iwasaki H., Takenaka K., Akashi K. (2011): Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, 20: 246 – 259

Kozák T. (2008): Chronická lymfocytární leukémie. *Onkologie* 2(3): 156 - 162

Lawce H., Olson S. (2009): FISH testing for deletions of chromosome 6q21 and 6q23 in hematologic neoplastic disorders. *J Assoc Genet Technol*, 35(4): 167 – 9

Mehra A., Lee K. H., Hatzimanikatis (2003): Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: I. Theoretical considerations. *Biotechnol Bioeng.* 30, 84(7): 822 – 3

Mladoševičová B. et al. (2011): Molekulové mechanizmy patogenézy nádorov. ISBN 978-80-8095-069

Papajík T., Vondráková V., Indrák K. (2002): Doporučené postupy pro praktické lékaře, Chronická lymfocytární leukémie, 8

Prasad S., Ravindran J., Aggarwal B. B. (2010): NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem*, 336(1-2):25 - 37

Prokocimer M., Modan M., Lusky A., Hershko C. (1985): Multivariate analysis of prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia, *Med Sci*, 21(6): 490 - 8

Puente X. S., Pinyol M., Quesada V., Conde L., Ordóñez G. R., Villamor N., Escaramis G., Jares P., Beà S., González-Díaz M., Bassaganyas L., Baumann T., Juan M., López-Guerra M., Colomer D., Tubío J. M., López C., Navarro A., Tornador C., Aymerich M., Rozman M., Hernández J. M., Puente D. A., Freije J. M., Velasco G., Gutiérrez-Fernández A., Costa D., Carrió A., Guijarro S., Enjuanes A., Hernández L., Yagüe J., Nicolás P., Romeo-Casabona C. M., Himmelbauer H., Castillo E., Dohm J. C., de Sanjosé S., Piris M. A., de Alava E., San Miguel J., Royo R., Gelpí J. L., Torrents D., Orozco M., Pisano D. G., Valencia A., Guigó R., Bayés M., Heath S., Gut M., Klatt P., Marshall J., Raine K., Stebbings L. A., Futreal P. A., Stratton M. R., Campbell P. J., Gut I., López-Guillermo A., Estivill X., Montserrat E., López-Otín C., Campo E. (2011): Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475: 101 - 5

Rai K. R., Sawitsky A., Cronkite E. P., Chanana A. D., Levy R. N., Pasternack B. S. (1975): Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 46(2): 219 - 34

Rodríguez-Vicente A. E., Díaz M. G., Hernández-Rivas J. M. (2013): Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease. *Cancer Genet*, 206 (3): 49 - 62

Seiffert M., Dietrich S., Jethwa A., Glimm H., Lichter P., Zenz T. (2012): Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 53: 1023 – 1031

Skórka K., Bhattacharya N., Własiuk P., Kowal M., Mertens D., Dmoszyńska A., Giannopoulos K. (2014): Thalidomide regulation of NF-κB proteins limits Tregs activity in chronic lymphocytic leukemia. *Adv Clin Exp Med*, 23(1): 25 - 32

Smida V. (2012): Chromosomal Abnormalities In Lymphoproliferative Disorders (Acute Lymphoblastic Leukemia, Chronic Lymphocytic Leukemia), personální sdělení

Tahrin M., Ping-Chang Y. (2012): Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting, *Med Sci*, 4(9): 429 – 434

Tan P. (2008): Germline polymorphisms as modulators of cancer phenotypes. *BMC Med*, 8: 6 - 27

Ticchioni M., Essafi M., Jeandel P. Y., Davi F., Cassuto J. P., Deckert M., Bernard A. (2007): Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*, 26: 7081 – 7091

Wang L., Lawrence M. S., Wan Y., Stojanov P., Sougnez C., Stevenson K., Werner L., Sivachenko A., DeLuca D. S., Zhang L., Zhang W., Vartanov A. R., Fernandes S. M., Goldstein N. R., Folco E. G., Cibulskis K., Tesar B., Sievers Q. L., Shefler E., Gabriel S., Hacohen N., Reed R., Meyerson M., Golub T. R., Lander E. S., Neuberger D., Brown J. R., Getz G., Wu C. J. (2011): SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 365: 2497 – 506

Wang M., Zhang X., Zhao H., Wang Q., Pan Y. (2009): FoxO gene family evolution in vertebrates. *BMC Evol Biol*, 7: 9 - 222

Yuille M. R., Stone J. G., Bradshaw P. S., Houlston R. S. (1999): Bcl10 in chronic lymphocytic leukaemia and T-cell prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 107(2): 384 - 5

Yuille M. R., Stone J. G., Bradshaw P. S., Houlston R. S. (2010): TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 28: 4473 - 9

Zenz T., Mertens D., Küppers R., Döhner H., Stilgenbauer S. (2010): From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 10: 37 – 50

http://premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html, navštíveno 19. 4. 2015

<http://web.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>, navštíveno dne 19. 4. 2015

<http://www.generi-biotech.com/sondy-dualne-znacene-sondy/>, navštíveno 19. 4. 2015

<http://www.thermoscientificbio.com/applications/basic-rt-qpcr/>, navštíveno 19. 4. 2015

<http://www.komabiotech.com>, navštíveno dne 19. 4. 2015

http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histopathology/blood_cells/chronic_lymphocytic_leukemia_%28cll%29_b-cell.aspx, navštíveno dne 19. 4. 2015

http://www.findingdulcinea.com/guides/Health/Cancer/Leukemia/Chronic-Lymphocytic-Leukemia.pg_01.html, navštíveno dne 19. 4. 2015

<http://pathy.med.nagoya-u.ac.jp/atlas/doc/node64.html>, navštíveno dne 19. 4. 2015

<http://www.ebi.ac.uk/gxa/genes/ENSG00000073861>, navštíveno 19. 4. 2015

Seznam použitých zkratek

ALL – akutní lymfocytární leukémie
AMP – aktivovaná protein kináza
ATM – ataxia telangiectasia mutated
BCL – B – cell lymphoma
CD – antigenní struktury u B - lymfocytů
CLL – chronická lymfocytární leukémie
c-myc – regulační gen kódující transkripční faktory
del(11)- delece na chromozómu 11
del(13)- delece na chromozómu 13
del(17)- delece na chromozómu 17
del(6q), 6q- - delece na dlouhém raménku chromozómu 6
EDTA - ethylendiamintetraoctan sodný
EXP1 – exportin 1
FBXW7 - F-Box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligáza
Ficoll – flotační roztok
FoxO – forkhead box třídy O
CHD2 - chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2
IgVH – těžký řetězec imunoglobulinu
IL-2 – interleukin 2
IL-4 – interleukin 4
INF- α – interferon- α
JNK - c-Jun N-terminal kináza
KLHL6 - kelch-like protein 6
LACE1 – lactacion elevated protein 1
MM – multiplexní myelom
NF- κ B – nuclear factor-kappa B
NHL – non Hodgkinův lymfom
NOTCH1 – translocation- associated homolog 1
OSTM1 - osteopetrosis-associated transmembránový protein
PBS – fosfátový pufr
POT1 – protection of telomerases 1
POT1 - protection of telomeres protein 1
PVDF membrána – membrána z polyvinylfluoridu
RB1 – retinoblastomový protein 1
Re1A, Re1B, c-Re1, P50, p100 – podjednotky NF- κ B
SCML4 - sex comb on midleg-like 4
SEC63 – translokační protein
SF3B1 – splicing factor 3 podjednotka1
SOBP - sine oculis-binding protein
TBX21 – T-box transkripční faktor 21
TNF- α – tumor necrosis factor- α
TP p53 – nádorový protein
WM - Waldenstörmová makroglobulinemie
ZAP-70 – zeta-chain-associated protein kináza 70

Příloha

Roztoky

Tabulka č. 1: Dělicí gel, 10%

Voda	6,25 ml
4x Tris buffer, pH 8,8	3,72 ml
Akrylamid	5 ml
Persíran amonný	75 µl
TEMED	15 µl

Tabulka č. 2: Zaostřovací gel, 4%

Voda	6,5 ml
4x Tris buffer, pH 6,8	2,5 ml
Akrylamid	1,3 ml
Persíran amonný	50 µl
TEMED	10 µl

5x SDS elektrodový pufr

- 15,1 g TRIS (hydroxymetyl)aminomethan, (CalBiochem)
- 79 g glycin (SERVA)
- 5 g SDS (dodecyl síran sodný) (CalBiochem)
- 1 l dd H₂O

Vzorkový pufr

- 50 mM TrisHCl pH=6,8
- 100 mM DTT
- 2% SDS
- 0,01% bromfenolová modř
- 10% glycerol

Promývací roztok PBS – Tween20

- 100 ml 10x PBS 100
- 0,5 ml Tween20
- 899,5 ml destilované vody

Blokovací roztok 1% BSA v roztoku PBS – Tween20

- 1 g BSA
- 100 ml PBS – Tween20

Tobwinův roztok

- 0,09 g Tris
- 43,2 g glycin
- 600 ml metanol

Stripovací pufr

- 7,5 g glycin
- 0,5 g SDS
- 5 ml Tween20
- doplnit do 500 ml ddH₂O
- pH = 2,2

Primární protilátka

- 15 ml 1% BSA v PBS – Tween20
- 15 μ l primární protilátky

Sekundární protilátka

- 30 ml 1% BSA v PBS – Tween20
- 3 μ l sekundární protilátky

4x Tris buffer, pH 8,8

- 45,5 g TRIS (hdroxymetyl)aminomethan, (CalBiochem)
- 1 g SDS (dodecyl síran sodný), (CalBiochem)
- 150 ml dd H₂O
- Doplnit do 250 ml deionizovanou vodou

4 x Tris buffer, pH 6,8

- 15,125 g TRIS (hdroxymetyl)aminomethan, (CalBiochem)
- 1 g SDS (dodecyl síran sodný), (CalBiochem)
- 150 ml dd H₂O
- Doplnit do 250 ml deionizovanou vodou