

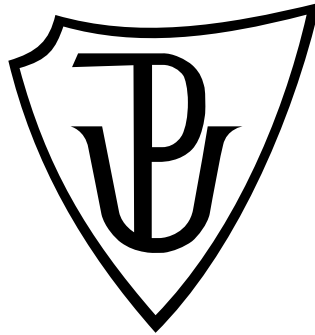
Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2011

Jana Vaníčková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Telomerázová aktivita u Barrettova jícnu

Diplomová práce

Bc. Jana Vaníčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: Ing. Ivo Überall, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
Ing. Iva Überalla, Ph.D. Veškeré literární zdroje a informace, které jsem v práci využila,
jsou v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne 10. května 2011

.....

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Ivu Überallovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, ochotu, trpělivost a pomoc při tvorbě této práce. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Janu Gregarovi (II. Interní klinika FN Olomouc), MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D. (Dětská klinika FN a LF UP v Olomouci) a Mgr. Martinu Mistríkovi, Ph.D. (Laboratoř integrity genomu PřF UP v Olomouci) za poskytnutí vzorků tkáně jícnu, adenokarcinomu a buněk fibroblastů. Děkuji také prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph.D. za mikroskopické vyšetření tkáňových řezů jícnu, za konzultace a podněty, které mi poskytl. A v neposlední řadě děkuji celému kolektivu Ústavu patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za spolupráci a příjemné pracovní prostředí.

SOUHRN

Včasná diagnóza nádorového onemocnění je předpokladem zdárné a účinné léčby. Jednou z možností, jak ho odhalit, je detekce specifických markerů pro daný typ a pokročilost nádorového onemocnění. Barrettův jícn je komplikací refluxní choroby jícnu a v současné době je pokládán za prekancerózní stav, který při podcenění léčby může vést ke vzniku adenokarcinomu jícnu. Jako každé nádorové onemocnění je vznik Barrettova jícnu podmíněn multifaktoriálním řetězcem změn v genomu a proteomu buněk jícnu. Avšak včasné odhalení těchto změn umožní úspěšnější léčbu. Vzhledem k tomu, že se stále více rozšiřuje spektrum nádorových markerů pro Barrettův jícn, byla v diplomové práci sledována změna aktivity telomerázy a exprese hTERT.

Cílem této práce bylo pomocí metod TRAP, Western blot analýzy a imunohistochemie sledovat vztah aktivity telomerázy u Barrettova jícnu a snaha o korelaci aktivity enzymu se stupněm pokročilosti vývoje Barrettova jícnu. Telomeráza je enzym, který buňkám umožňuje prodlužovat konce chromozómů a zajistit jim tak stabilizaci a nesmrtelnost. Metodou TRAP byla prokázána aktivita telomerázy u vzorků Barrettova jícnu, adenokarcinomu (kromě dvou vzorků), karcinoidu, imortalizovaných buněk fibroblastů, buněk MCF-7, tkáně střeva, ale také u tkáně zdravého jícnu. Při sledování exprese proteinu hTERT Western blot analýzou došlo k detekci hTERT u všech vzorků tkáně jícnu (nádorové i nenádorové), u buněčné linie MCF-7, u zdravých a imortalizovaných buněk fibroblastů, avšak nikoliv u vzorků zdravé a nádorové tkáně střeva. Na základě výsledků experimentální části bylo zjištěno, že vyšší aktivita telomerázy neodpovídá vyššímu stupni malignity, a že v případě Barrettova jícnu není telomerázová aktivita vhodným biomarkerem pro stanovení diagnózy tohoto onemocnění.

SUMMARY

Diagnosis on time of cancer disease is an expectation of successful and effective therapy. One of the possibilities how to detect it is a detection of specific markers for certain type and development level of cancer disease. Barrett oesophagus occurs as a consequence of gastrooesophageal reflux disease, it is a precancerous condition and if we underestimate the therapy it can lead to the development of adenocarcinoma. The development of Barrett oesophagus is conditioned by multifactorial chain of changes in genome or proteome of oesophageal cells. However, detection on time of these changes provides a successful therapy. Considering there are still more types of tumor markers for Barrett oesophagus that is why the change of telomerase activity and expression of hTERT were observed in my diploma thesis.

The aim of this thesis was to observe relations of telomerase activity in Barrett oesophagus by methods TRAP, Western blot analysis and immunohistochemistry and if an activity of enzyme correlates with a development level of Barrett oesophagus. Telomerase is an enzyme, which makes it possible to elongate the end of chromosomes of cells and which provide them stabilization and immortality. By method TRAP telomerase activity was found out in samples of Barrett oesophagus, adenocarcinoma (except of two samples), carcinoid, immortalized fibroblast cells, MCF-7 cells, intestinal tissues but also in the normal oesophageal tissue. In observation of hTERT protein expression by Western blot analysis, hTERT was detected in all samples of oesophagus (malignant and non-malignant), cell line MCF-7, normal and immortalized fibroblast cells, nevertheless any non-malignant or malignant intestinal samples. On the basis of results from the experimental part of thesis it was found out that higher telomerase activity is not correlate with higher level of malignancy and in case of Barrett oesophagus telomerase activity is not suitable biomarker for diagnosis of this disease.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	10
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
3.1	Refluxní choroba jícnu (Gastroesophageal reflux disease, GERD)	11
3.2	Infekce <i>Helicobacter pylori</i>	11
3.3	Barrettův jícen	12
3.3.1	Klasifikace.....	13
3.3.2	Diagnóza	14
3.3.3	Progrese Barrettova jícnu	14
3.4	Léčba	16
3.4.1	Léky.....	16
3.4.2	Fundoplikace	17
3.4.3	Nové metody léčby	17
3.5	Telomery.....	18
3.5.1	Struktura telomer.....	18
3.5.2	Zkracování telomer	19
3.5.3	Možnosti udržení délky telomer.....	20
3.6	Aktivita telomerázy a její prognostický význam u Barrettova jícnu	22
3.7	Telomerázová aktivita jako nástroj protinádorové léčby	23
4	MATERIÁL A METODIKA	25
4.1	Příprava buněčných lysátů	25
4.2	Stanovení koncentrace proteinů	26
4.3	Metoda TRAP.....	26
4.3.1	Optimalizace metody TRAP	27
4.3.2	Příprava master mixu	29
4.3.3	Elektroforéza	29
4.4	Western blot analýza	30
4.4.1	Elektroforéza	30
4.4.2	Přenesení proteinů na membránu	31
4.4.3	Imunodetekce	31
4.5	Imunohistochemie	32

4.6 Vybavení laboratoře	33
4.7 Použité roztoky a chemikálie.....	34
4.8 Primární protilátky.....	35
4.9 Sekundární protilátky	35
5 VÝSLEDKY.....	36
5.1 TRAP.....	36
5.2 Western blot analýza	37
5.3 Hodnocení výsledků z TRAP a Western blot analýzy vzhledem k získaným informacím o životním stylu pacientů	42
5.4 Imunohistochemie	49
6 DISKUZE.....	52
7 ZÁVĚR.....	55
8 LITERATURA	56
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	63

1 ÚVOD

Během posledních let došlo k nárůstu diagnóz nádorových onemocnění. Včasné odhalení prekancerózního stavu, popřípadě včasná léčba nádorového onemocnění přispívá nejen k dobrému zdravotnímu stavu populace, ale odráží se i v ekonomických parametrech zdravotní péče. Rakovina je onemocnění, při kterém dochází k nekontrolované proliferaci buněk. Jedním z mechanismů umožňujících buňkám nekontrolovanou proliferaci, je zvýšená aktivita enzymu telomerázy, která je zodpovědná za prodlužování konců chromozómů (telomer). Pokud je tento enzym nadměrně aktivní, dochází k tzv. nesmrtelnosti buněk. U normálních buněk se telomery zkracují během každého buněčného dělení. Jakmile ale telomery dosáhnou kritické délky, buněčný cyklus se zastavuje a dochází ke spuštění senescence či buněčné smrti. Pokud ale nejsou v tomto stupni buněčného cyklu aktivovány kontrolní body, buňky pokračují dále v proliferaci.

Existuje množství studií, které se zaměřují na aktivitu telomerázy v průběhu nádorového onemocnění. Ta byla prokázána v 85 % všech lidských nádorů, v embryonálních tkáních a v zárodečných buňkách. Zásahy do aktivity telomerázy mohou mít význam při léčbě nádorů. Pokud by se zabránilo působení telomerázy, buňky by nemohly neomezeně proliferovat a podléhaly by buněčné smrti. Musíme však také brát v úvahu, že enzym telomeráza není jediným mechanismem prodlužování telomer.

Tato práce se zabývá sledováním telomerázové aktivity (resp. její podjednotky hTERT) jako možného diagnostického a prognostického biomarkeru u Barrettova jícnu. Barrettův jícen je komplikací refluxní choroby jícnu, kdy dochází k dlouhodobému přesunu žaludečního obsahu do jícnu. To vede k poškození sliznice jícnu a náhradě dlaždicovitého epitelu za cylindrický epitel intestinálního typu. Vznik této tzv. metaplazie může u některých pacientů vést k vytvoření dysplastického epitelu, ale také ke vzniku adenokarcinomu. Během experimentální části se vycházelo z předpokladu, že čím vyšší je stupeň malignity, tím vyšší je telomerázová aktivita. A pokud by se tento předpoklad potvrdil, mohla by být v budoucnu aktivita telomerázy využívána jako významný prognostický biomarker stanovení diagnózy a terapie Barrettova jícnu.

Diplomová práce byla prováděna na Ústavu patologie v Laboratoři molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Je také součástí komplexního výzkumného projektu IGA MZ ČR, který se zabývá novými možnostmi predikce karcinogeneze Barrettova jícnu. Na projektu se také podílí klinické pracoviště – II. Interní klinika Fakultní nemocnice Olomouc, kde byly prováděny endoskopické odběry tkání jícnu v různém stupni vývoje onemocnění. Vzorke adenokarcinomu byly získány po ústní dohodě z Dětské kliniky Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UP v Olomouci.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je vypracovat literární rešerši týkající se tématu telomerázová aktivita u Barrettova jícnu. Využít tyto informace v experimentální části, kde je hlavním cílem optimalizace metody TRAP pomocí telomerázového detekčního kitu TRAPEZE[®]. Dále sběr a klasifikace vzorků Barrettova jícnu pacientů Fakultní nemocnice Olomouc. U těchto vzorků metodou TRAP stanovit aktivitu telomerázy, na základě Western blot analýzy určit expresi proteinu hTERT a provést imunohistochemickou detekci na tkáňových řezech. A v závěru se také zaměřit na možné klinické využití telomerázové aktivity při stanovení diagnózy onemocnění Barrettovým jícnem.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Karcinom jícnu patří mezi méně časté nádorové onemocnění. V České republice je incidence 4,0 na 100 000 obyvatel, což znamená 412 nově hlášených onemocnění karcinomu jícnu za jeden rok (Köcher *et* Dlouhý, 2000).

Mezi hlavní rizikové faktory vzniku adenokarcinomu jícnu patří refluxní choroba a přítomnost tzv. Barrettova jícnu. Dalšími faktory mohou být obezita, infekce *Helicobacter pylori*, konzumace alkoholu či kouření (Zhang *et al.*, 2009).

3.1 Refluxní choroba jícnu (Gastroesophageal reflux disease, GERD)

Refluxní choroba jícnu je onemocnění způsobené gastroezofageálním refluxem, klinickými obtížemi nebo histopatologickými změnami. Během gastroezofageálního refluxu dochází k přesunu žaludečního obsahu ze žaludku do jícnu, který je vystlán dlaždicovitým epitelem a není odolný vůči žaludeční kyselině. Při dlouhodobém nebo častém opakování může dojít k patologickému procesu – k poškození jícnu, hltanu, hrtanu či respiračního traktu. Refluxní choroba může být tedy způsobena poruchou kyselé sekrece nebo poruchou motility, dysfunkcí dolního jícnového svěrače a pravděpodobně i hiátovou hernií (Lukáš, 1997; Rybka, 2007).

Hiátová hernie neboli brániční kýla je obvykle stavem získaným. Vzniká přemístěním části jícnu a žaludku do dutiny hrudní nad brániční hiátus. Vztah hiátové hernie k refluxní chorobě jícnu není v současné době zcela znám. U některých pacientů trpících tímto onemocněním se hiátová hernie vyskytuje ve větší míře, u některých však nikoliv (Lukáš *et* Žák, 2007).

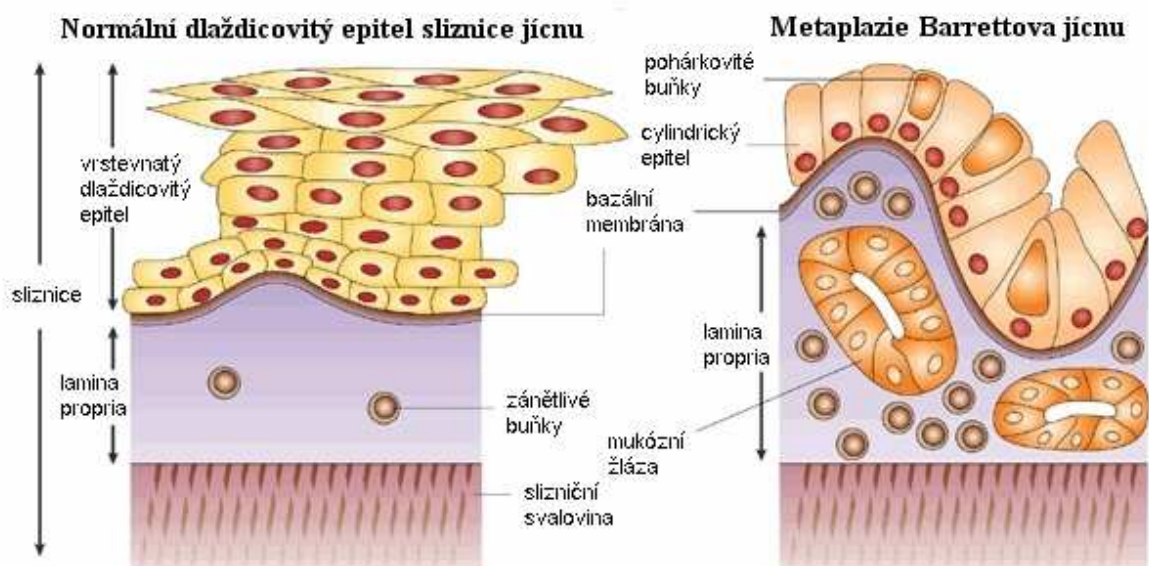
3.2 Infekce *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) je patogenní bakterie, která může napadat sliznici žaludku člověka, není však zcela jasné, zda je predisponujícím či protektivním faktorem u refluxní choroby. Existují názory, které poukazují na protektivní účinky *H. pylori* - dochází ke snížení sekrece žaludeční kyseliny, která zabrání vývoji gastroesofageální refluxní choroby (Zhang *et al.*, 2009). Naopak ale existují názory,

kteřé poukazují na zvýšení žaludeční sekrece díky *H. pylori*, což má za následek poškození funkce dolního jícnového svěrače (Lukáš *et* Žák, 2007).

3.3 Barrettův jícen

Barrettův jícen je komplikací dlouhotrvající refluxní choroby jícnu a je definován jako změněná sliznice jícnu. Dochází k náhradě neboli metaplazii dlaždicovitého plně diferencovaného epitelu sliznice jícnu za cylindrický epitel intestinálního typu (Obr. 1) (Sampliner, 1998). Metaplazie vzniká, je-li sliznice vystavena chronicky škodlivým faktorům jako je reflux kyseliny chlorovodíkové, pepsin, soli žlučových kyselin, pankreatické enzymy, kouření, nadměrné požívání alkoholu, snížený tlak dolního jícnového svěrače či porucha motility.



Obr. 1: Sliznice jícnu (upraveno dle Wild *et* Hardie, 2003).

Barrettův jícen je prekancerózou a zhruba 8-10 % případů toho onemocnění může vést ke vzniku adenokarcinomu. Dalšími možnými komplikacemi může být vytvoření vředu, krvácení z něj, stenóza či dysplazie (Al-Tashi *et al.*, 2007; Lukáš, 2000).

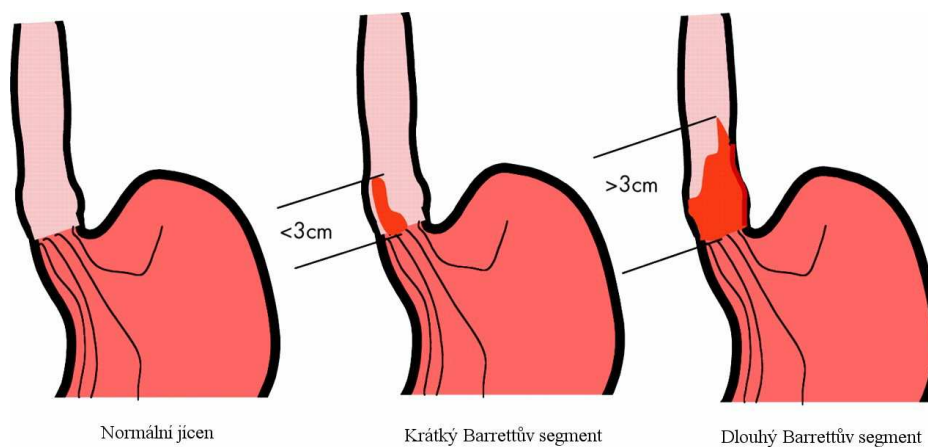
Dysplazie je soubor histologických změn epitelu, které mohou plynule přecházet v neinvazivní karcinom. Tyto změny se hodnotí na základě velikosti a tvaru buněk, vzhledu jader (zvýšený nukleoplazmatický poměr značí výraznější proliferaci buněk), počtu mitóz či uspořádání jednotlivých vrstev epitelu (Mačák *et* Mačáková, 2004; Lukáš, 2005). Dysplazii obvykle dělíme na lehkou (low - grade dysplasia, LGD), střední (moderate - grade dysplasia, MDG) a těžkou (high - grade dysplasia, HGD). Platí zde, že čím vyšší je stupeň dysplazie, tím blíže je k malignitě (Köcher *et* Dlouhý, 2000).

3.3.1 Klasifikace

Barrettův jícen je rozdělován do 4 skupin (Lukáš, 2000):

- *Ultrakrátký Barrettův segment*, kdy cylindrický epitel přiléhá k dlaždicovitému.
- *Krátký Barrettův segment*, kdy dochází ke změně do 3 cm nad Z linií. Z linie je hranice mezi dlaždicovitým epitelem jícnu a cylindrickým epitelem žaludečním (Obr. 2).
- *Dlouhý Barrettův segment*, kdy dochází ke změnám v úseku delším než 3 cm nad Z linií. Jedná se o tzv. klasický Barrettův jícen (Obr. 2).
- *Maligní degenerace*, kdy je dysplazie markerem pro maligní změny v Barrettově epitelu.

(Pokud se vzorek s intestinální metaplazií nachází pod Z linií, jedná se o intestinální metaplazii kardia žaludku, nikoli o Barrettův jícen) (Kaušitz *et al.*, 2003).



Obr. 2: Klasifikace Barrettova jícnu (upraveno dle Malfertheiner *et* Peitz, 2005).

3.3.2 Diagnóza

Diagnostika Barrettova jícnu se opírá o tři, respektive o čtyři typy vyšetření. Základním vyšetřením používaným v klinické praxi je rutinní endoskopická analýza. V poslední době se uplatňuje ve větší míře její modifikace NBI (narrow band imaging), která vede ke zpřesnění výběru místa odběru biospie na základě predikce histologického nálezu v reálném čase. Další nová endoskopická metoda - AFI (autofluorescence imaging) umožňuje v reálném čase odlišit přirozenou autofluorescenci tkáně high-grade dysplazie a časné formy karcinomu.

Druhým přístupem v diagnostice Barrettova jícnu je histochemické vyšetření. V tomto případě se jedná o histochemické barvení mucinů. Pro Barrettův jícn je typická přítomnost kyselých mucinů, které se barví modře. Toto vyšetření však naráží na problémy se specifitou histochemického barvení (Fléjou *et al.*, 2005).

Nejčastěji využívanou metodou je imunohistochemické barvení pomocí specifických protilátek. V případě Barrettova jícnu se využívá barvení na epiteliální cytokeratiny (CK), a to zejména na CK7 a CK20.

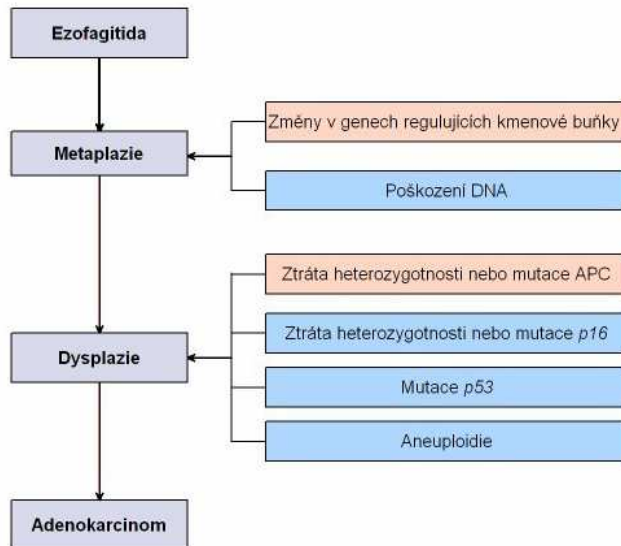
3.3.3 Progrese Barrettova jícnu

V roce 2000 Hanahan a Weinberg popsali 6 hlavních charakteristik nádorových buněk – soběstačnost v produkci růstových signálů, neúčinnost inhibitorů růstových signálů, vyhnutí se programované buněčné smrti (apoptóze), neomezená replikační schopnost, podpora angiogeneze a schopnost tvořit metastázy. Buňky mohou být rezistentní vůči inhibitorům růstových signálů díky inaktivaci tumor supresorových genů a to buď mutací genu, ztrátou heterozygotnosti (loss of heterozygoty, LOH) nebo metylací promotoru. Tumor supresorové geny, které se podílejí na progresi metaplazie Barrettova jícnu v adenokarcinom, byly inaktivovány všemi 3 mechanismy. Příkladem tumor supresorových genů je *p16*, *p53*, *p27* či *APC* (Zhang *et al.*, 2009).

Za standardní model progrese Barrettova jícnu v adenokarcinom je považován model, kdy nejdříve dojde k zánětu jícnu (ezofagitida), poté se vytvoří metaplazie, dysplazie a následuje vznik adenokarcinomu (Schéma 1) (Tab. I). Tento proces zahrnuje genetické a epigenetické zásahy. Mezi genetické změny patří ztráta heterozygotnosti nebo mutace *p16*, poškození DNA, mutace *p53* nebo aneuploidie. Mezi epigenetické

změny řadíme ztrátu heterozygotnosti nebo mutaci APC či změny v genech regulujících kmenové buňky (Jankowski *et al.*, 2010).

Schéma 1: Standardní model progresse Barrettova jícnu v adenokarcinom (upraveno dle Jankowski *et al.*, 2010).



Tab. I: Genetické změny podílející se na progresi Barrettova jícnu (upraveno dle Wijnhoven *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2002).

Stupeň pokročilosti nádoru	Zvýšená exprese	Snížená exprese	Jiná změna
Metaplazie	Cyklin D1, Bcl-2, COX-2, TGF α , p53 + 17p LOH		p16 LOH + methylace
Dysplazie	Růstové faktory a jejich receptory, p27	E-kadherin + β -katenin	Mutace p53 + 17p LOH, 5q LOH, methylace APC
Adenokarcinom	p21, katepsin B, Fas-L	15-Lox-1	p16 LOH + methylace + mutace

Na základě několika studií inaktivace tumor supresorových genů podílejících se na vzniku adenokarcinomu bylo zjištěno, že:

- mutace *p16*, LOH nebo methylace promotoru se vyskytovala v metaplazii Barrettova jícnu přibližně u 80 % případů. To naznačuje, že genetické změny *p16* se dějí již od počátku nádorové progresse Barrettova jícnu (Wong *et al.*, 2001).
- inaktivace *p53* byla pozorována u 50-90 % případů pacientů trpících adenokarcinomem (Hamelin *et al.*, 1994; Galipeau *et al.*, 1999).
- ztráta exprese proteinů pro p27, inhibitoru aktivity cyklinu E, byla pozorována u 83 % adenokarcinomů jícnu (Singh *et al.*, 1998).
- methylace APC se vyskytovala u více než 80 % případů Barrettova jícnu s vysokým stupněm dysplazie nebo adenokarcinomem, a přibližně u 40 % pacientů s metaplazií Barrettova jícnu (Kawakami *et al.*, 2000; Clément *et al.*, 2007).

3.4 Léčba

V současné době neexistují žádné léky, které by zcela vyléčily toto onemocnění. Lze však zpomalit průběh refluxní choroby a zabránit tak vzniku dalších komplikací.

Cílem léčby pacientů je tedy pozastavit vývoj refluxní choroby či již vzniklého Barrettova jícnu a to především eliminací žaludečních šťáv, které poškozují sliznici jícnu. Je proto nutné, aby pacienti na prvním místě pozměnili dosavadní životní styl a omezili konzumaci některých potravin (čokoláda, kofein, tučná jídla, citrusové plody a šťávy, mléko), konzumaci alkoholu a tabákových výrobků, které zvyšují riziko refluxu (Zhang *et al.*, 2009). Dále je možné pacientům podávat léky, provést fundoplikaci či zahájit léčbu novými metodami.

3.4.1 Léky

Existuje 5 léků, tzv. inhibitorů protonové pumpy, které snižují množství kyselin produkovaných v žaludku: omeprazole (Prilosec), esomeprazole (Nexium), lansoprazole (Prevacid), rabeprazole (Aciphex) a pantoprazole (Protonix). Inhibitory

protonové pumpy potlačují sekreci žaludečních šťáv blokádou protonové pumpy (žaludeční ATPázy) (Lukáš, 1997).

3.4.2 Fundoplikace

U některých pacientů je prováděn chirurgický zákrok tzv. fundoplikace, která se provádí laparoskopicky. Oddělí lépe jícen od žaludku a zamezí tak vniknutí žaludečních šťáv do jícnu (Spechler, 1993).

3.4.3 Nové metody léčby

Existují nové metody léčby refluxní choroby či Barrettova jícnu, jejíž podstatou je zničení abnormálních buněk v jícnu různými fyzikálními principy bez velkých chirurgických zásahů.

Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie zahrnuje použití speciálního laserového zařízení. Když je nádorová tkáň vystavena vhodné vlnové délce laserového světla, dojde k cytotoxické reakci, která způsobí buněčnou destrukci (Overholt *et al.*, 2005).

Radiofrekvenční ablace

Radiofrekvenční ablace využívá teplo vznikající z rádiových vln, čímž dojde k destrukci tkáně - zcela zničí abnormální buňky sliznice jícnu u více než 77 % pacientů po léčbě. Radiofrekvenční ablace je mnohem méně invazivní možnost léčby než chirurgický zákrok a v současné době je to jedna z nejefektivnějších metod (Falt *et al.*, 2009; Shaheen *et al.*, 2009).

Kryoterapie

Léčba se provádí na malém segmentu tkáně Barrettova jícnu a to v měsíčních intervalech ve spojení s farmakoterapií pro kontrolu žaludečních šťáv. Tato metoda spočívá v aplikaci tekutého dusíku (-196 °C) při nízkém tlaku, čímž dojde k destrukci Barrettova epitelu celou řadou mechanismů (přímá kryonekróza, apoptóza, transientní ischemie (Falt *et al.*, 2009).

3.5 Telomery

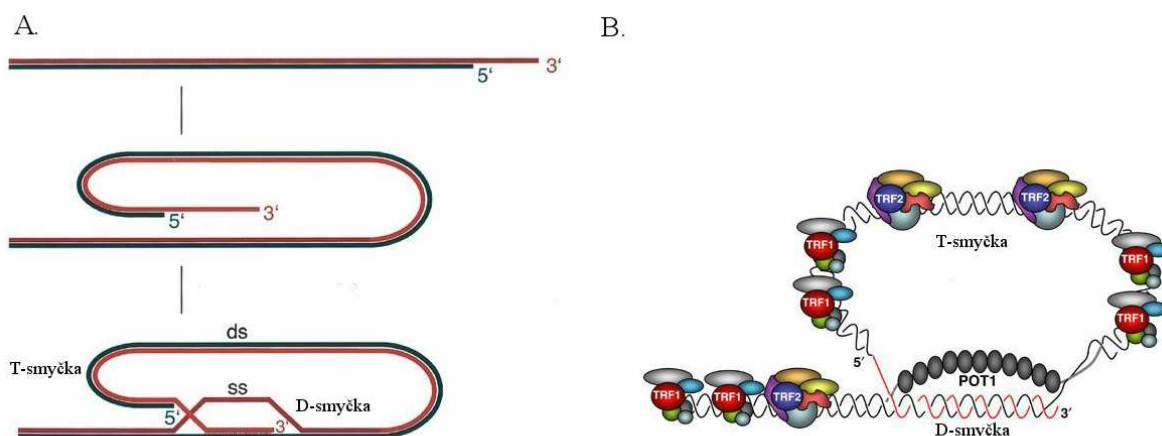
Telomery jsou DNA proteinové struktury, které se nachází především u eukaryot na koncích lineárních chromozómů (Wyatt *et al.*, 2009).

Funkcí telomer je chránit konce chromozómů před degradací či fúzí s jiným koncem chromozómu, udržovat genomickou stabilitu a zamezit aberantní chromozomální rekombinaci. Telomery se také podílejí na prostorové organizaci jádra buňky a separaci buněk během dělení (Dheane *et al.*, 2000, Urquidi *et al.*, 2000).

3.5.1 Struktura telomer

Telomery jsou tvořeny sekvencí DNA tandemově uspořádaných repetitivních jednotek. U různých druhů organismů se tyto sekvence liší – existuje však obecný vzorec pro základní opakující se jednotku: 5'-T₁₋₄A₀₋₁G₁₋₈-3'. U člověka a dalších obratlovců se repetitivní jednotka skládá z hexanukleotidů TTAGGG a její počet kopií se u normálních somatických buněk vyskytuje okolo 500 až 3000 repeticí (Snustad *et Simmons*, 2009).

Na konci lidské telomery je vytvořena tzv. T-smyčka (T-loop), která chrání volný konec molekuly DNA. T-smyčka vzniká zanořením převisu 3' konce telomery do dvouvláknové DNA té samé telomery. Tento jednořetězcový převis se páruje s komplementárním vláknem, přičemž vytěsňuje vlákno původního dvouvláknového řetězce a vznikne tak menší D-smyčka (D-loop) (Obr. 3). Na vytěsňené vlákno se váže protein POT1 (Protection of telomerase-1), který jej obaluje a chrání před degradací. Další telomer-vazebné proteiny, které se podílejí na tvorbě T-smyčky a D-smyčky jsou TRF1 a TRF2 (telomer - repeat binding factor 1; telomer - repeat binding factor 2). Tyto proteiny obsahují Myb-like doménu, která jim umožňuje vázat se na dvouřetězcovou DNA (Dheane *et al.*, 2000, Snustad *et Simmons*, 2009).



Obr. 3: A. Vytvoření T-smyčky a D-smyčky na konci telomery (upraveno dle de Lange, 2005). B. Struktura smyčky s vazebnými proteiny TRF-1, TRF-2 a POT-1 (upraveno dle Blasco, 2005).

3.5.2 Zkracování telomer

Na 5' konci opožďujícího se řetězce nemůže DNA polymeráza dokončit syntézu DNA, protože nemůže nahradit RNA primer po jeho odštěpení. Replikace tak není zcela ukončena, a pokud v buňce neexistuje mechanismus, který by mohl syntézu dokončit, dochází ke zkracování telomer (Snustad *et* Simmons, 2009).

V somatických buňkách během každého buněčného dělení dochází ke zkracování telomer o 50-200 bp (Svenson *et* Roos, 2009). Tento jev replikativního zkracování telomer byl popsán Leonardem Hayflickem v roce 1961 – jedná se o tzv. Hayflickův limit.

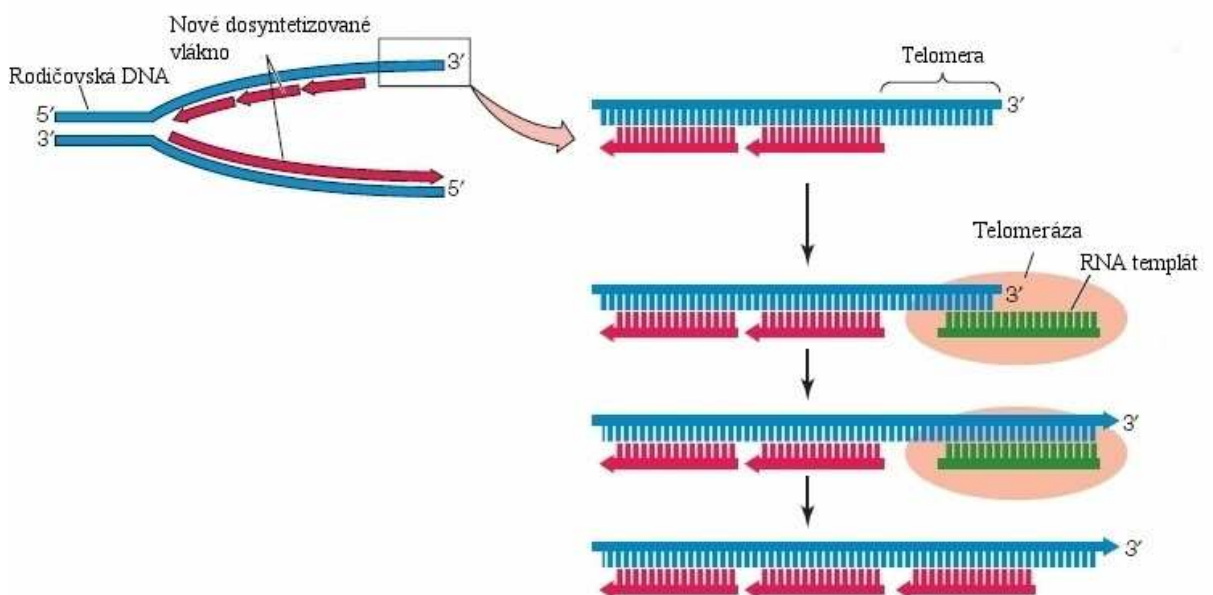
Normální buňka se průměrně dělí asi 50 krát a pokud jsou telomery kratší než jejich kritická délka, zastavuje se buněčný cyklus, jsou aktivovány kontrolní body, indukují se opravné mechanismy buňky a dojde ke spuštění senescence (forma buněčného stárnutí), což může vést až k buněčné smrti (Urquidi *et al.*, 2000). Pokud nejsou kontrolní body v tomto stupni buněčného cyklu aktivovány nebo nejsou přítomny, buňky pokračují v proliferaci dokud telomery nedosáhnou kritické délky. Tyto buňky jsou charakteristické chromozomální nestabilitou kvůli chybné opravě DNA a v důsledku toho se objevují také DNA zlomy, které mohou vzájemně fúzovat a může tak docházet k různým cytologickým abnormalitám (Lešník *et* Ostró, 2010).

3.5.3 Možnosti udržení délky telomer

Existují 2 mechanismy, které umožňují zajistit nesmrtelnost a stabilizaci telomer – enzym telomeráza a alternativní prodlužování telomer.

3.5.3.1 Telomeráza

Telomeráza je ribonukleoproteinový enzym, který byl poprvé identifikován v roce 1985 u nálevníka *Tetrahymena thermophila* Carol Greiderovou a Elizabeth Blackburnovou. Lidská telomeráza je tvořena 2 podjednotkami – z telomerázové RNA (human Telomerase RNA, hTR) a enzymu telomerázové reverzní transkriptázy (human Telomerase Reverse Transkriptase, hTERT). Společně vytváří komplex, ve kterém hTR slouží jako matrice pro obnovu telomerových DNA sekvencí a podjednotka hTERT má katalytickou funkci, kdy procesem reverzní transkripce přidává repetitivní jednotky. Funkcí telomerázy je tedy rozpoznání 3' konce repetitivní telomerické sekvence bohaté na guanin a následné prodloužení postupným přidáváním jednotek ve směru 3' → 5' (Obr. 4) (Snustad *et* Simmons, 2009; Lešník *et* Ostró, 2010). Opožděující se vlákno je poté dosyntetizováno DNA polymerázou (Snustad *et* Simmons, 2009).



Obr. 4: Znárodnění mechanismu prodlužování telomer pomocí telomerázy (upraveno dle O'Connor, 2008).

Podjednotka lidské telomerázy hTERT je kódována genem *hTERT*, který se nachází na krátkém raménku pátého chromozomu (5p15.33) a jeho velikost činí asi 40 kDa. Jeho kódující sekvence je tvořena šestnácti exony a je překládána do proteinu o molekulové hmotnosti 127 kDa (tvořena 1132 aminokyselinami) (Meyerson *et al.*, 1997, Bryce *et al.*, 2000).

Telomerázová aktivita

Dosud byla telomerázová aktivita prokázána v 85 % všech lidských nádorů, v embryonálních tkáních a v zárodečných buňkách (Lešník *et Ostró*, 2010; Jaknecht, 2004).

Nádorové buňky se mohou stát nesmrtelnými, jestliže jsou telomery stabilizovány a neustále prodlužovány. Délka telomer závisí na rovnováze mezi ztrátou telomerických repetitív během replikace DNA v každém buněčném cyklu a prodlužováním díky aktivitě telomerázy. Telomerázová aktivita je závislá na aktivitě hTERT, která může být vyvolána několika způsoby: aktivací promotoru hTERT onkoproteiny, integrací virů nebo ztrátou nádorových supresorů. Tyto studie zabývající se hTERT by v budoucnu mohly mít význam při léčbě rakoviny, kdy bychom zabránili působení telomerázy a buňky by se tak nemohly neomezeně dělit (Jaknecht, 2004). Nebo by se zvýšená telomerázová aktivita dala také využít jako marker poukazující na výskyt nových nádorových buněk (Huang *et al.*, 1999).

3.5.3.2 Alternativní prodlužování telomer

Mechanismy, které zajišťují prodlužování telomer, a na kterých se nepodílí telomeráza, se nazývají alternativní prodlužování telomer (alternative lengthening of telomeres, ALT) (Bryan *et Reddel*, 1997). ALT byl objeven především v lidských nádorech a odvozených nádorových liniích, ale také v imoralizovaných lidských a myších buněčných liniích (Dheane *et al.*, 2000, Henson *et al.*, 2002).

Do mechanismů ALT můžeme řadit – intertelomerickou rekombinaci, intratelomerickou rekombinaci (rekombinaci v rámci T-smyčky), model otáčející kružnice a lineární ECTR (extrachromozomální telomerické repetice) DNA (Henson *et al.*, 2002).

Jedná se o vzácnější mechanismus prodlužování telomer, který se vyskytuje v 5-10 % (Bryan *et al.*, 1997).

3.6 Aktivita telomerázy a její prognostický význam u Barrettova jícnu

Biomarker je ukazatelem patologických procesů přítomných v krvi, nádorové tkáni či moči a lze jej měřit nebo použít pro sledování různých reakcí či léčby. Ideálním biomarkem je snadno detekovatelná látka, která je tvořena pouze nádorovými buňkami, resp. tkáněmi (Zagorowitz *et Jankowski*, 2007).

Vzhledem k tomu, že je aktivita telomerázy přítomna u většiny typů nádorů, může sloužit jako diagnostický a prognostický znak. Shay *et al.* (1997) popsali, že 85 % solidních nádorů vykazuje zvýšenou aktivitu telomerázy. Zvýšená aktivita telomerázového komplexu byla rovněž sledována u preneoplastických lézí, jako je právě Barrettův jícen. Bylo však zjištěno, že telomeráza je také aktivní v nenádorových buňkách jako aktivované lymfocyty nebo kmenové buňky (Shay *et al.*, 1997).

V případě Barrettova jícnu je tedy diagnostický a prognostický význam telomeráz, resp. jejich podjednotek kontradiktorní v závislosti na použité metodice. Existuje několik recentních prací, které poukázali na možnost využití telomeráz a telomerázových podjednotek jako biomarkerů u Barrettova jícnu. Například Lord *et al.* (2000) analyzovali mRNA hTERT a došli k závěru, že exprese hTERT byla zvýšena u všech stádií Barrettova jícnu a nejvyšší byla u adenokarcinomů jícnu. Dále také zjistili, že exprese hTERT byla výrazně vyšší:

- ve všech stádiích Barrettova jícnu včetně intestinální metaplazie ve srovnání s normální tkání pacientů bez nádorů
- u adenokarcinomu a dysplazie v porovnání s intestinální metaplazií
- u tkáně histologicky normálního jícnu pokrytého dlaždicovitými buňkami u pacientů s nádory, než u normálních tkání jícnu zdravých pacientů
- u pacientů s nádorovým onemocněním

Morales *et al.* (1998) prokázali pomocí *in situ* hybridizace telomerázové RNA, že telomerázová RNA byla detekována u 70 % intestinálních metaplazií a u 90 % LGD. Nejvyšší exprese telomerázové RNA byla sledována u HGD a adenokarcinomů.

Gertler *et al.* (2008) studovali expresi hTERT pomocí RT-PCR a Southern blot analýzy. Došli k závěru, že u Barrettova jícnu je zvýšená aktivita telomerázy a zvýšená exprese hTERT.

Tyto výsledky tedy naznačují, že telomerázová aktivita je důležitá pro vznik Barrettova jícnu a adenokarcinomu jícnu, a že velmi vysoká hladina telomerázy by mohla být klinicky užitečným diagnostickým a prognostickým biomarkerem.

Zatímco aktivita telomerázy byla prokázána ve většině lidských nádorů, existují rozporuplné výsledky pro normální tkáně a premaligní léze (Bachor *et al.*, 1999). Na základě studií, kdy se porovnála premaligní léze z Barrettova jícnu, metaplazie jícnu, adenom jícnu s normální sliznicí toho samého pacienta došel Bachor *et al.* (1999) k závěru, že telomerázová aktivita není vyšší v premaligních lézích.

Dále také Hiyama *et Hiyama* (2002) studovali expresi proteinu hTERT u různých typů nádorových tkání. V případě zdravého jícnu byla s využitím TRAP metody pozorována nízká telomerázová aktivita. Podobně jako u ostatních prací se potvrdila exprese u bazálních buněk a aktivovaných lymfocytů. Na základě imunohistochemického vyšetření byl pozorován nízký stupeň exprese podjednotky hTERT.

3.7 Telomerázová aktivita jako nástroj protinádorové léčby

Nárůst znalostí o regulaci aktivity telomerázy v nádorových buňkách umožnil přípravu syntetických inhibitorů telomeráz (Tab. II). V současné době jsou již některé z nich ve fázi klinického zkoušení.

Tab. II: Přehled syntetických inhibitorů telomeráz (Švec, 2006).

Cíl	Název preparátu	Skupina	Mechanismus účinku
hTERT protein	AZT (azidothymidin) a novější deriváty	nukleosidové inhibitory reverzní traskriptázy	blokuje inkorporaci dNTPs do syntetizované DNA
	BIBR 1532	nenukleosidové enzymatické inhibitory	blokují aktivní katalytické centrum enzymu
hTERT mRNA	PNAs (peptide nucleic acids)	antisense terapie	specificky inhibuje telomerázovou mRNA
	siRNA technologie, ribozymy		specifické RNA, katalyzující hydrolyzou fosfodiesterických vazeb cílové RNA
hTR RNA	GRN163L ribosomy, siRNA	antisense terapie	oligonukleotid, blokující templátovou obast hTR
struktura telomer	BRACO-19 (trisubstituovaný akridinový derivát)	G-quadruplex ligandy	stabilizací G-quadruplex struktury 3' konce blokuje elongaci telomer
	Telomestatin (SOT-095)	produkt <i>Streptomyces anulatus</i>	narušuje konformaci 3' konce, a tím i její capping funkci
hTERT derivované peptidy	vakcinační protinádorová imunoterapie proti tumor specifickým antigenům		hTERT RNA transfekované dendritické buňky stimulují specifické cytotoxické T-lymfocyty
genová terapie	tumor-selektivní onkologický adenovirus CG5757 kontrolovaný promotory, odvozenými od humánních genů <i>E2F-1</i> a <i>hTERT</i>		specifická lýza nádorových buněk

4 MATERIÁL A METODIKA

Experimentální část diplomové práce byla prováděna na vzorcích tkáně jícnu (v různém stupni vývoje onemocnění) a tkáně střeva pacientů Fakultní nemocnice Olomouc. Tkáň byla pacientům odebírána endoskopicky MUDr. Janem Gregarem na II. Interní klinice FN Olomouc. V průběhu endoskopického vyšetření bylo odebíráno několik vzorků. Polovina jich byla odesílána na Ústav patologie k histologické diagnostice po barvení H&E. Část byla odesílána na Ústav histologie pro analýzu miRNAs, část byla zamrazována v tekutém dusíku a uchovávána v -80 °C pro následné analýzy telomerázy a hTERT podjednotky. Vzorky adenokarcinomu byly získány operativně MUDr. Josefem Srovnalem, Ph.D. na Dětské klinice FN a LF UP v Olomouci. Protože endoskopické vyšetření, ale také operativní odebrání vzorků nemusí být zcela přesné pro stanovení diagnózy, výsledky byly porovnány s diagnózou z mikroskopického vyšetření prof. MUDr. Jiřím Ehrmannem, Ph.D.

Dále byla také použita buněčná linie MCF-7 (odvozena z adenokarcinomu prsu), zdravé a imortalizované s hTERT lidské předkožkové fibroblasty. Buňky MCF-7 byly získány z American Type Culture Collection (ATTC) a buňky fibroblastů byly dodány Mgr. Martinem Mistríkem z Laboratoře integrity genomu Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci. Kultivace buněčných linií probíhala v 10% DMEM médiu s přidávkem fetálního bovinního séra (FBS), glutaminu, penicilinu, streptomycinu či hygromycinu B. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C a pasážovány zpravidla dvakrát za týden.

4.1 Příprava buněčných lyzátů

Tkáň jícnu (40-100 mg pletiva) byla homogenizována ve 200 μ l pufru CHAPS s inhibitory a inkubována 30 minut na ledu. Poté byly zkumavky vloženy do centrifugy na 20 minut, 12 000 RPM, při 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a použit k dalším analýzám.

Do 60 mm misek s DMEM médiem byly nasazeny buňky MCF-7, zdravé a imortalizované fibroblasty. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C. Poté bylo z misek odsáto DMEM médium a k adhezaním buňkám bylo přidáno 3 ml PBS, čímž došlo k jejich promytí. Po odsátí PBS bylo do každé misky aplikováno 125 μ l lyzačního

pufry NP-40 s inhibitory proteáz a fosfatáz. Následovalo seškrábnutí buněk z misek a přenesení pipetou do zkumavek Eppendorf. Buňky v lyzačním pufry byly inkubovány 1 hodinu na ledu a během této doby byly třikrát zvortexovány. Poté byly vloženy do centrifugy na 30 minut, 15 000 RPM, při 4 °C. Supernatant byl použit k dalším analýzám.

4.2 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena podle metody Bradfordové. Do 96jamkové mikrotitrační destičky byl napipetován standard γ -tubulin v koncentrační řadě 0 μ l, 1 μ l, 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l, 8 μ l a 10 μ l. Do těchto jamek bylo přidáno 10 μ l, 8 μ l, 6 μ l, 4 μ l, 3 μ l a 0 μ l deionizované vody a do každé jamky také 200 μ l Bradfordova činidla. Jednotlivé vzorky buněčných lyzátů byly pipetovány v dupletech po 1 μ l s 9 μ l deionizované vody a 200 μ l Bradfordova činidla.

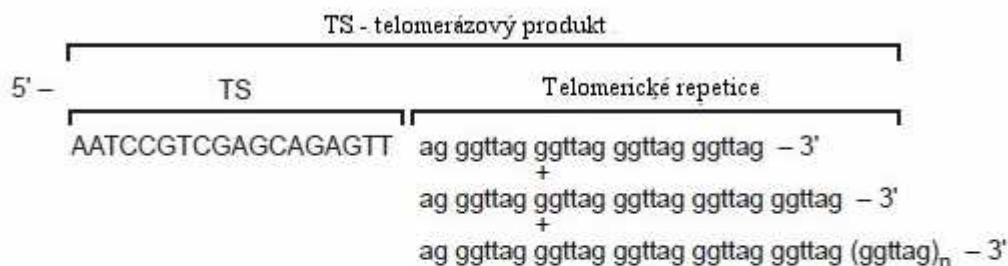
Absorbance jednotlivých vzorků a koncentrační řady byla změřena na spektrofotometru PowerWave XS v programu KC Junior při vlnové délce 595 nm. Poté byla stanovena kalibrační křivka standardu a z ní vypočtena koncentrace proteinů.

4.3 Metoda TRAP

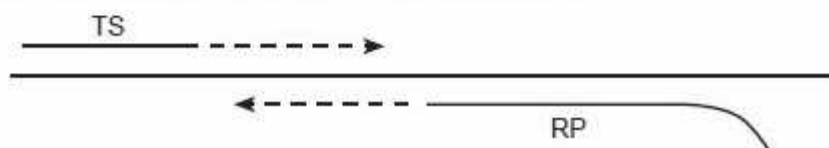
Pro stanovení telomerázové aktivity byl použit kit TRAPEZE[®], který je modifikací metody TRAP popsané Kimem v roce 1994.

Telomeráza nejdříve napojuje telomerické repetitivní sekvence (GGTTAG) na 3' konec TS primeru. V dalším kroku je produkt telomerázové reakce amplifikován pomocí PCR za užití dalšího primeru RP (reverzní primer), který obsahuje sekvence komplementární k vlastnímu telomerázovému produktu (Obr. 5). Po PCR byla provedena elektroforéza, promytí gelu v ethidium bromidu a deionizované vodě a následná vizualizace v transiluminátoru. Amplifikovaný produkt byl zobrazen jako „žebříček“ s narůstajícími zónami vždy o 6 bp.

1. krok: Přidávání telomerických repetitiv telomerázou



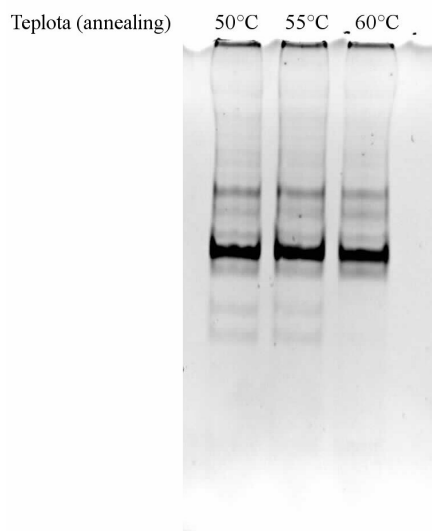
2. krok: Amplifikace TS - telomerázového produktu PCR



Obr. 5: Schéma metody TRAP (upraveno z návodu TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit, Chemicon).

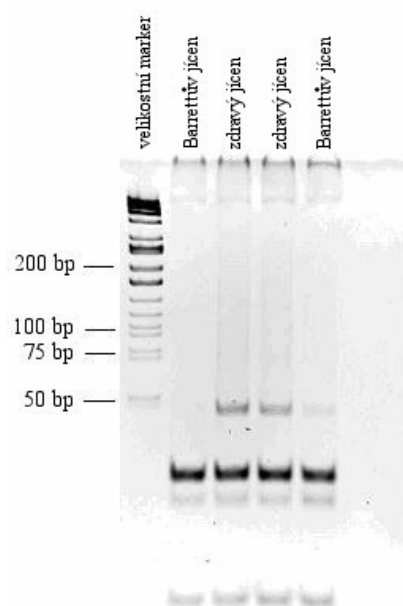
4.3.1 Optimalizace metody TRAP

Podle návodu v kitu TRAPEZE[®] byly připraveny buněčné lyzáty. Poté byla vytvořena PCR reakční směs tzv. master mix, k tomu přidán vzorek a mikrozkušavky vloženy do termocykléru. Byly zkoušeny různé podmínky pro PCR změnou počtu cyklů a teploty během fáze annealingu (Obr. 6). Nakonec byly zvoleny podmínky pro PCR 94 °C/30 sekund, 59 °C/30 sekund, 72 °C/1 minuta a to vše 26 cyklů. Po vytažení mikrozkušavek z termocykléru byl ke vzorkům přidán loudovací pufr a následovalo rozdělení na 12,5% polyakrylamidovém gelu. Po optimalizaci probíhala elektroforéza při 150 V po dobu 50 minut. Pro přehlednější rozdělení „žebříčku“ amplifikovaného produktu bylo lepší nechat probíhat elektroforézu delší dobu. Poté byl gel promýván v ethidium bromidu 30 minut a v deionizované vodě 10 minut. A následně byl gel vyhodnocen v softwarovém programu GeneSnap.



Obr. 6: Vizualizace vzorku Barrettova jícnu po separaci na 12,5% polyakrylamidovém gelu a třech PCR, každá s jinou teplotou ve fázi hybridizace primerů (annealing).

Po objednání druhého stejného kitu TRAPEZE[®] metoda nefungovala. Po vyhodnocení nebyl pozorován žádný „žebříček“, tudíž nedošlo k amplifikaci produktů během PCR (Obr. 7). Chyba byla pravděpodobně v jedné z reagensí. Po několika PCR a výměnou některých komponent bylo zjištěno, že chyba je v RNA inhibitory, které se přidávají do CHAPS pufru při přípravě buněčných lyzátů. Po výměně za nové inhibitory metoda opět fungovala.



Obr. 7: Vizualizace vzorků zdravých jícnu a Barrettových jícnu po PCR, kdy nedošlo k amplifikaci produktů.

4.3.2 Příprava master mixu

Na přípravu master mixu byl potřeba TRAP pufr, nukleotidy, TS primery, TRAP primer Mix, *Taq* polymeráza a deionizovaná voda (Tab. III). Tyto reagenty byly napipetovány do zkumavky, poté byl obsah zkumavek zvortexován a rozdělen do PCR mikrozkušavek po 48 μ l. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 2 μ l vzorku, opět zvortexováno a vloženo do termocykléru, kde proběhla amplifikace PCR produktů (Tab. IV).

Tab. III: Složení master mixu.

Chemikálie	Množství pro 1 vzorek [μ l]
10 \times TRAP pufr	5,0
50 \times dNTPs	1,0
TS primery	1,0
TRAP primer Mix	1,0
<i>Taq</i> polymeráza (1 U/1 μ l)	0,4
ddH ₂ O	39,6
Celkem	48,0

Tab. IV: PCR amplifikace.

PCR amplifikace	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	30	30 min	
Denaturace	94	30 s	26
Annealing (nasednutí primerů)	59	30 s	
Elongace (prodlužování primerů)	72	1 min	
Chlazení	4		

4.3.3 Elektroforéza

Po PCR bylo ke vzorkům přidáno 5 μ l loudovacího pufru. Dále byl připraven 12,5% polyakrylamidový gel (1,5 mm skla, úzké hřebínky). Na přípravu gelu bylo použito 6,25 ml 12,5% akrylamidu, 8,75 ml 0,5 \times TBE, 150 μ l 10% peroxodisíranu amonného (PERS) a 15 μ l N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu (TEMED). Po ztuhnutí gelu bylo do každé jamky aplikováno 10 μ l PCR produktů a 1 μ l markeru. Elektroforetická separace probíhala při 150 V po dobu 50 minut. Poté byl gel promýván na třepačce 30 min v ethidium bromidu a 10 minut v deionizované vodě. Následovala

vizualizace a vyhodnocení pomocí UV transiluminátoru a softwarového programu GeneSnap.

4.4 Western blot analýza

Jedná se o imunochemickou metodu detekce proteinů. Proteiny separované na PAGE gelu byly přeneseny na membránu, následovala identifikace proteinů pomocí imunodetekce (primárních a sekundárních protilátek) a vizualizace na základě chemiluminiscence.

4.4.1 Elektroforéza

10% polyakrylamidový gel byl připraven dle rozpisu Harlowa a Laneho (1998). Na gel byl potřeba 30% akrylamid, deionizovaná voda, 1,5 mol/l TRIS (pH 8,8), 1,0 mol/l TRIS (pH 6,8), 10% SDS, 10% PERS a TEMED (Tab. V). Po ztuhnutí dolního a horního gelu (0,75 mm sklo, široké hřebínky) bylo do jedné jamky napipetováno 1,5 μ l velikostního markeru Full Range Rainbow a do zbylých jamek 20 μ l vzorků buněčných lyzátů, ke kterým byl již předtím přidán LSB 4 \times . Následovala separace proteinů při 110 V po dobu 1,5 hodiny. Proteiny byly rozděleny v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS na základě jejich molekulové hmotnosti. Gel byl poté promýván 20 minut v transfer pufru.

Tab. V: Množství jednotlivých chemikálií pro přípravu 10% polyakrylamidového gelu.

Chemikálie	Množství pro dolní gel [ml]	Množství pro horní gel [ml]
30% směs akrylamidu	6,700	1,000
deionizovaná voda	7,900	4,100
1,5 mol/l TRIS pufr (pH 8,8)	-	0,750
1 mol/l TRIS pufr (pH 6,8)	5,000	-
10% SDS	0,200	0,060
PERS	0,200	0,060
TEMED	0,008	0,006

4.4.2 Přenesení proteinů na membránu

V blotovacím zařízení byla na navlhčený filtrační papír položena nitrocelulósová membrána, na membránu gel s rozdělenými proteiny a na gel byl dán opět navlhčený filtrační papír. Přenos proteinů z gelu na membránu probíhalo při 10 V po dobu 45 minut. Poté byla membrána vyjmuta a následovalo barvení v roztoku Ponceau S 5 minut. Po obarvení se membrána promyla v deionizované vodě.

4.4.3 Imunodetekce

Jednotlivé proteiny byly rozděleny na základě molekulové hmotnosti a podle velikostního markeru lze určit jejich přibližnou velikost. Nitrocelulósová membrána byla nastříhána na jednotlivé části a inkubována 2 hodiny na třepačce v 5% roztoku sušeného mléka s 0,1% Tweenem 20, přičemž došlo k blokování nespecifických míst. Poté byly připraveny primární monoklonální myší a polyklonální králičí protilátky (Tab. VI), které byly nanесeny na membrány a inkubovány přes noc při 4 °C. Další den byly primární protilátky odstraněny a membrány promývány dvakrát 5 minut v PBS pufru s Tweenem 20 a 5 minut v PBS pufru bez Tweenu 20. Poté byly na membrány nanесeny sekundární protilátky – anti-myší (ředění 1:5000) a anti-králičí (ředění 1:5000) po dobu 2 hodin. Protilátky byly odstraněny a membrány promývány dvakrát 5 minut v PBS pufru s Tweenem 20 a 5 minut v PBS pufru bez Tweenu 20. Následovalo nanесení chemiluminiscenční látky Dura (ředění 1:1) na jednotlivé membrány a inkubace 5 minut ve tmě. Chemiluminiscenční signál byl zachycen na fotografickém papíru.

Tab. VI: Seznam použitých protilátek.

Primární protilátka	Velikost [kDa]	Typ	Sekundární protilátka
α -tubulin (ředění 1:4000)	50	myší monoklonální	anti-myšší (ředění 1:5000)
hTERT (ředění 1:175)	127	králičí polyklonální	anti-králičí (ředění 1:5000)

4.5 Imunohistochemie

Parafínové řezy vzorků na podložních sklech byly barveny tzv. imunoperoxidázovou metodou (bylo provedeno laborantkou v Laboratoři imunohistochemie, Ústav patologie).

K odparafinování vzorků byl použit xylen (2 × 10 minut), následovala rehydratace 5 minut v 96% alkoholu B, 5 minut v 80% alkoholu B a 5 minut v 70% alkoholu B. Podložní skla byla opláchnuta destilovanou vodou. V mikrovlnné troubě při 120 °C po dobu 5 minut došlo v citrátovém pufru (pH 6) k předpůsobení. Poté se preparáty nechaly vychladnout a po 20 minutách se opláchly destilovanou vodou. Aktivita endogenní peroxidázy byla zrušena působením 6% vodného roztoku peroxidu vodíku po dobu 15 minut. Následoval oplach v destilované vodě, promytí v TRIS pufru (2 × 5 minut), poté se ještě promývalo TRIS pufrem s Tweenem po dobu 5 minut a byly nanесeny primární protilátky (60 minut) (Tab. VI). Opět se promývalo TRIS pufrem 2 × 5 minut a TRIS pufrem s Tweenem 5 minut a byla nanесena sekundární protilátka (60 minut) (Tab. VI). Následovalo promytí v TRIS pufru 3 × 5 minut a poté byl k vizualizaci použit DAB. Poté se preparáty ještě 3 minuty promývaly vodovodní vodou a barvily v kamencovém hematoxylinu asi 1 minutu. Opláchly se vodovodní vodou, čpavkovou vodou a znovu vodovodní vodou a zkontrolovala se jádra pod mikroskopem. Nakonec se preparáty nechaly odvodnit 96% alkoholem B (3 minuty), acetonem (3 minuty) a acetonem-xylenem (3 minuty), následovalo projasnění xylenem (3 minuty) a použití kanadského balzámu. Podložní skla se vzorky byly sledovány a hodnoceny mikroskopem Olympus BX 50.

4.6 Vybavení laboratoře

- Vertikální elektroforéza (BioRad)
- Termoblok (P-lab)
- Zdroj napětí Power Pack 1000 (BioRad)
- Trans-blot[®] SD Semi dry Transfer cell (BioRad)
- Spektrofotometr PowerWave XS (Bio-Tek)
- Mikrocentrifuga Qualitron (Korea)
- Elektroforetická skla BioRad (tloušťka 0,75 mm; 1,5 mm, BioRad)
- Centrifuga Sigma 3K30 (Pragolab Praha)
- Vortex (P-lab)
- Třepačka OS-10 Orbital Shaker (BioSan)
- Blotovací filtrační papír Extra Thic Blot Paper Protean[®] XI Size (BioRad)
- Blotovací membrána GE Healthcare Amersham[™] - Hybond[™] - ECL
- Kodak Biomax light films (Kodak)
- Mikropipety, 0,1 - 5000 µl (Eppendorf)
- Mikrošpičky, 0,1 - 5000 µl (Eppendorf)
- Petriho misky (60 mm, TPP)
- Zkumavky (Gama Group a.s)
- Zkumavky Eppendorf (Eppendorf)
- 96jamková mikrotitrační destička
- termocyklér Biometra, T personal (Schoeller)
- UV transiluminátor G-BOX (Syngene)
- CO₂ inkubátor Heracell (Heracus)
- Mikroskop Nikon Eclipse TS 100-F (MIKRO spol.)
- Mikroskop Olympus BX 50
- Laminární box AURA VERTICAL SD4 (Biotech)
- Laminární box Schoeller EF4EC (Schoeller Pharma Praha)
- Vývěva (Laboport)
- Software program KC Junior
- Software program GeneSnap

4.7 Použité roztoky a chemikálie

- 1,5 mol/l TRIS pH 8,8 (18,165 g TRIS rozpustit v 85 ml ddH₂O, upravit hodnotu pH 8,8 koncentrovanou HCl, doplnit objem na 100 ml ddH₂O)
- 1 mol/l TRIS pH 6,8 (12,11 g TRIS rozpustit v 85 ml ddH₂O, upravit hodnotu pH 6,8 koncentrovanou HCl, doplnit objem na 100 ml ddH₂O)
- 10% SDS (40 g SDS, doplnit do 400 ml ddH₂O)
- LSB 4× koncentrovaný s β-merkapt ethanolom (3,5 ml ddH₂O, 0,5 ml 1 mol/l TRIS pH 6,8, 1,6 ml glycerol, 1,6 ml 10% SDS, 0,4 ml β-merkapt ethanol, 0,4 ml 0,5% bromfenolová modř)
- PBS 10× (160 g NaCl, 4 g KCl, 64,2 g Na₂HPO₄, 4 g KH₂PO₄, doplnit do 2 l ddH₂O)
- Elektroforetický pufr 5× koncentrovaný (15,1 g TRIS, 5,09 g SDS, 72,0 g glycin, rozpustit v 1 l ddH₂O)
- 20% Transfer pufr (5,8 g glycin; 11,6 g TRIS, 0,74 g SDS, 400 ml metanol, doplnit do 2 l ddH₂O)
- Peroxodisíran amonný (1g peroxodisíran amonný, doplnit do 10 ml ddH₂O) (Sigma)
- Mléko blokovací – 5% mléko v PBS 1× s Tweenem 20 (50 g sušené odtučněné mléko, 1 ml Tween, doplnit do objemu 1 l nesterilním PBS 1×)
- Mléko pro primární a sekundární protilátky – 5% mléko v PBS 1× (25 g sušené odtučněné mléko, doplnit do 500 ml nesterilním PBS 1×)
- Ponceau S[®] solution for electrophoresis (Serva)
- SuperSignal[®] West Duro Extended Duration Substrate (Pierce)
- Full Range Rainbow marker 28925341 (Amersham Bioscience)
- TRAPEze Telomerase Detection Kit (TRAP pufr, dNTPs, TRAP primer, TS primer, *Taq* polymeráza, ddH₂O, CHAPS pufr s inhibitory) (Millipore, Temecula California)
- TBE pufr (54 g TRIS, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5 mol/l EDTA pH 8,0, doplnit do 1 l ddH₂O, upravit pH na 8,1-8,5)
- loudovací pufr na DNA (4 g sacharózy, 2 ml 0,5 mol/l EDTA, 5 g 0,5% bromfenolové modři)
- DNA marker (Top-Bio)

- 70% alkohol B (3,5 l alkohol B 96%, 1,5 l ddH₂O)
- γ -globulin (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Bio-Rad)
- Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)
- TEMED (Serva)
- 30% bis-akrylamid (Serva)
- Tween[®] 20 (Serva)
- TRIS (Serva)
- Nízkoúčinné sušené mléko Laktino (PML, a. s.)
- RNA inhibitory 20 U/ μl (Applied Biosystems)
- DMEM (GIBCO)
- Trypsin (Sigma)
- Fetální bovinní sérum (GIBCO)
- Glutamin, penicilin, streptomycin (GIBCO)
- ethidium bromid (Amresco)

4.8 Primární protilátky

- α -tubulin (Sigma)
- hTERT Y182 (Novus Biologicals)

4.9 Sekundární protilátky

- anti-myší (Santa Cruz)
- anti-králičí (Santa Cruz)

5 VÝSLEDKY

V experimentální části diplomové práce byly použity vzorky pacientů Fakultní nemocnice Olomouc. Diagnóza pacientů byla určena na základě endoskopického vyšetření. Toto vyšetření nemusí být v některých případech dostatečné, a proto bylo provedeno i mikroskopické vyšetření (Tab. VII). Po porovnání obou výsledků se diagnózy téměř shodovaly.

Tab. VII: Diagnóza pacientů určená pomocí endoskopického a mikroskopického vyšetření.

Vzorek číslo	Diagnóza na základě endoskopického vyšetření	Diagnóza na základě mikroskopického vyšetření
4.	Barrettův jícen/karcinoid	Barrettův jícen/karcinoid
5.	Barrettův jícen/karcinoid	HGD
6.	LGD	LGD
7.	Barrettův jícen/karcinoid	Intestinální metaplazie
8.	LGD	LGD
10.	Barrettův jícen	Barrettův jícen
11.	Barrettův jícen	LGD
12.	LGD	LGD
13.	Barrettův jícen	Barrettův jícen
15.	Zdravý jícen	Zdravý jícen
18.	Barrettův jícen	Intestinální metaplazie
19.	Barrettův jícen	Intestinální metaplazie
37.	Barrettův jícen	Intestinální metaplazie
38.	Barrettův jícen	Intestinální metaplazie

Dále byla na vzorcích pacientů provedena TRAP a exprese podjednotky hTERT byla sledována pomocí Western blot analýzy a imunohistochemického barvení tkáňových řezů.

5.1 TRAP

Telomerázová aktivita byla stanovena pomocí metody TRAP, během které dochází k amplifikaci produktů telomerázy. Po PCR následovala elektroforéza a rozdělení produktů na polyakrylamidovém gelu, promytí gelu v ethidium bromidu a vizualizace transiluminátorem. Produkty byly zobrazeny jako „žebříček“ s narůstajícími zónami vždy o 6 bp.

TRAP a Western blot analýza byla provedena u vzorků Barrettova jícnu, karcinoidu, LGD a adenokarcinomu. Jako pozitivní kontrola byla použita firemní kontrola kitu TRAPEZE[®] obsahující pozitivní buňky a dále také byly použity imortalizované s hTERT předkožkové fibroblasty. Jako negativní kontrola sloužila tkáň zdravého jícnu a buňky zdravých fibroblastů. Barrettův jícen je definován jako přeměna dlaždicovitého plně diferencovaného epitelu sliznice jícnu za cylindrický epitel intestinálního typu (Sampliner, 1998). Proto zde byly také použity vzorky zdravé a nádorové tkáně střeva, abychom zjistili, zda-li tam není určitá spojitost. A jako poslední vzorek byla použita buněčná linie MCF-7 (odvozena z adenokarcinomu prsu) (Obr. 8).

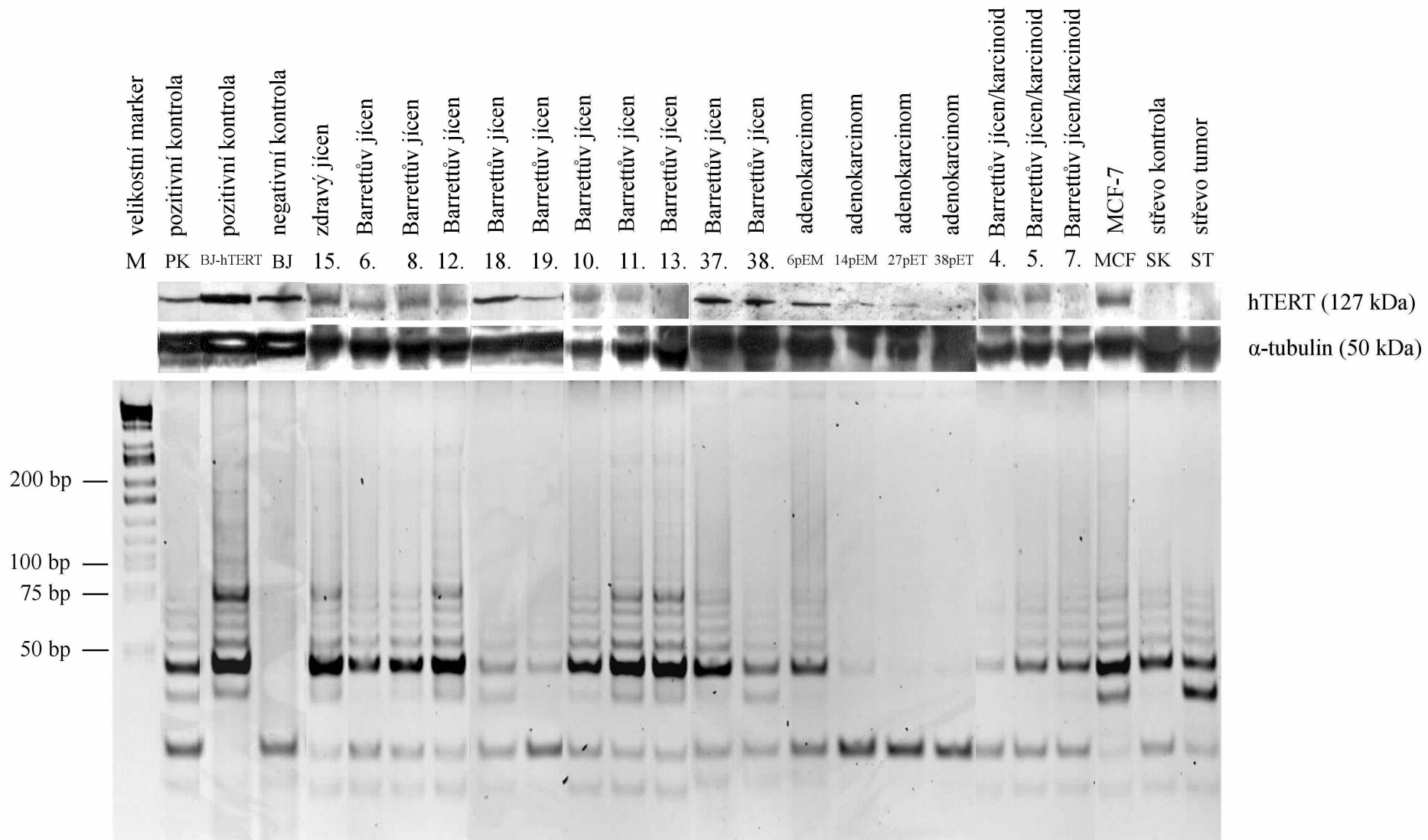
Vycházeli jsme z teoretického předpokladu, že čím je vyšší aktivita telomerázy (v případě TRAP - čím je delší „žebříček“), tím je vyšší stupeň malignity. To se potvrdilo u buněk zdravých fibroblastů, kdy nelze pozorovat žádný „žebříček“, avšak nikoli u vzorku zdravého jícnu, kdy k amplifikaci produktů telomerázy došlo. Také u vzorků LGD, Barrettova jícnu či adenokarcinomu tento předpoklad zcela nekoreloval.

U dvou vzorků adenokarcinomu (27p ET, 38p ET) nedošlo k amplifikaci produktů.

5.2 Western blot analýza

Expresi proteinu hTERT (127 kDa) byla sledována pomocí Western blot analýzy. Jako kontrola pro porovnání přeblovaných proteinů byl použit α -tubulin (50 kDa) (Obr. 8).

Expresi hTERT lze pozorovat téměř u všech vzorků kromě vzorků zdravé a nádorové tkáně střeva. Výrazně vyšší exprese se vyskytovala u imortalizovaných buněk fibroblastů a u buněk MCF-7, což zcela odpovídá také výsledkům z TRAP. Avšak u buněk zdravých fibroblastů a tkáně zdravého jícnu (negativních kontrol), kdy nebyla předpokládána žádná exprese hTERT, byl výsledek také pozitivní.



Obr. 8: Výsledky z TRAP a Western blot analýzy.

Tab VIII: Aktivita telomerázy a exprese hTERT s údaji o životním stylu pacientů.

	Vzorek č.	Telomeráza (TRAP)	hTERT (WB)	Kouření	Alkohol	Obezita	Hernie
Zdravý jícen	15.	vyšší	vyšší				
	6.	nižší	nižší	pozitivní	negativní	negativní	negativní
Barrettův jícen	8.	vyšší	nižší				
	12.	vyšší	vyšší	negativní	negativní	pozitivní	negativní
	18.	nižší	vyšší	pozitivní	negativní	negativní	negativní
	19.	nižší	nižší	pozitivní		pozitivní	pozitivní
	10.	vyšší	vyšší				
	11.	vyšší	nižší	negativní	negativní	pozitivní	pozitivní
	13.	vyšší	nižší				
	37.	vyšší	vyšší				pozitivní
	38.	nižší	vyšší			pozitivní	negativní
	Adenokarcinom	6p EM	nižší	vyšší			
14p EM		nižší	nižší				
27p ET		žádná	nižší				
38p ET		žádná	nižší				
Barrettův jícen - karcinoid	4.	nižší	vyšší	pozitivní	negativní	pozitivní	
	5.	nižší	vyšší	pozitivní	negativní		pozitivní
	7.	nižší	nižší	negativní	negativní	pozitivní	
MCF-7	střevo kontrola	vyšší	žádná				
	střevo tumor	vyšší	žádná				
		vyšší	žádná				



Vyhodnocení výsledků z TRAP a Western blot analýzy s informacemi o životním stylu pacientů (Obr. 8, Tab. VIII):

Pozitivní kontrola (buňky z kitu) – telomeráza je u těchto buněk aktivní a byla detekována také exprese proteinu hTERT.

Pozitivní kontrola (imortalizované fibroblasty) – aktivita telomerázy je výrazně vyšší a exprese hTERT také oproti pozitivní kontrole z kitu.

Negativní kontrola (zdravé fibroblasty) – nevyskytuje se žádná aktivita telomerázy, avšak exprese hTERT ano.

Zdravý jícen (kontrola) – vyskytuje se aktivní telomeráza, ale také exprese hTERT.

Vzorek č. 6 – pacient s diagnózou LGD (Barrettův jícen), telomerázová aktivita a exprese hTERT je oproti kontrole snížena. Pacient kouří, nepije alkohol ve větší míře, netrpí obezitou a ani se u něj nevyskytuje hernie.

Vzorek č. 8 – pacient s diagnózou LGD (Barrettův jícen). Aktivita telomerázy je stejná jako u kontroly, zatímco exprese hTERT je snížena. Pacient netrpí obezitou, ani hernií.

Vzorek č. 12 – pacient s diagnózou LGD (Barrettův jícen). Aktivita telomerázy je zvýšena a exprese hTERT je naopak snížena. U pacienta se nevyskytuje hernie, nekouří, nepije alkohol, avšak trpí obezitou.

Vzorek č. 18 – pacient s diagnózou Barrettův jícen. Aktivita telomerázy je velmi nízká, naopak exprese hTERT je zvýšena. Pacient kouří, nepije alkohol, netrpí obezitou a nevyskytuje se u něj hernie.

Vzorek č. 19 – pacient s diagnózou Barrettův jícen. Aktivita telomerázy je výrazně nižší a exprese hTERT je také nižší než u kontroly. Pacient kouří, trpí obezitou a vyskytuje se u něj hernie.

Vzorek č. 10 – pacient s diagnózou Barrettův jícen. Aktivita telomerázy je stejná a exprese hTERT je vyšší oproti kontrole.

Vzorek č. 11 – pacient s diagnózou Barrettův jícen. Telomerázová aktivita je zvýšena, naopak exprese hTERT je snížena. Pacient nekouří, nepije alkohol, trpí obezitou a vyskytuje se u něj hernie.

Vzorek č. 13 – pacient s diagnózou Barrettův jícen. Telomerázová aktivita je vyšší, ale exprese hTERT je výrazně nižší.

Vzorek č. 37 – pacient s diagnózou Barrettův jícen. Telomerázová aktivita je stejná jako u kontroly a exprese hTERT je zvýšena. U pacienta se vyskytuje hernie.

Vzorek č. 38 – pacient s diagnózou Barrettův jícen. Aktivita telomerázy je snížena, ale exprese hTERT je zvýšena oproti kontrole. Pacient trpí obezitou a nevyskytuje se u něj hernie.

Vzorek 6p EM – pacient s diagnózou adenokarcinom. Telomerázová aktivita je snížena oproti kontrole, exprese hTERT zvýšena.

U adenokarcinomů nebyla známa klinicko-patologická data a přesný odběr vzorku.

Vzorek 14p EM – pacient s diagnózou adenokarcinom. Telomerázová aktivita je výrazně nižší, rovněž exprese hTERT je nižší oproti kontrole.

Vzorek 27p ET – pacient s diagnózou adenokarcinom. Nevyskytuje se žádná aktivita telomerázy, exprese hTERT je výrazně nižší oproti kontrole.

Vzorek 38p ET – pacient s diagnózou adenokarcinom. Nevyskytuje se žádná aktivita telomerázy a exprese hTERT je velmi nízká.

Vzorek č. 4 – pacient s diagnózou Barrettův jícen - karcinoid. Aktivita telomerázy je výrazně nižší a exprese hTERT je stejná jako u kontroly. Pacient nekouří ani nepije alkohol ve větší míře, trpí však obezitou.

Vzorek č. 5 – pacient s diagnózou Barrettův jícen - karcinoid. Telomerázová aktivita je snížena a exprese hTERT je stejná jako u kontroly. Pacient kouří, nepije alkohol a vyskytuje se u něj hernie.

Vzorek č. 7 – pacient s diagnózou Barrettův jícen - karcinoid. Aktivita telomerázy je oproti kontrole snížena, ale také exprese hTERT je výrazně nižší. Pacient nekouří, ani nepije alkohol, ale trpí obezitou.

Byly použity také vzorky MCF-7, zdravá a nádorová tkáň střeva. Tyto vzorky však do následujícího grafického hodnocení nezahrnujeme.

MCF-7 – telomerázová aktivita je oproti kontrole zvýšena, rovněž exprese hTERT je zvýšena.

Střevo kontrola – telomerázová aktivita je stejná jako u kontroly, avšak exprese hTERT se nevyskytuje žádná.

Střevo tumor – telomerázová aktivita je stejná jako u kontroly. Exprese hTERT se nevyskytuje.

Obecně můžeme z výsledků říci, že skupina vzorků s diagnózou Barrettův jícen je velmi heterogenní, a že výsledky z TRAP a Western blot analýzy spolu téměř nekorelují. Zatímco u skupiny vzorků s diagnózou adenokarcinom se vyskytuje pouze nízká nebo žádná aktivita telomerázy a až na jeden případ pouze nízká exprese hTERT. Také u skupiny vzorků s diagnózou Barrettův jícen-karcinoid se vyskytuje pouze nízká aktivita telomerázy a stejná či nízká exprese hTERT. Z toho vyplývá, že nízká aktivita telomerázy a nízká exprese hTERT by mohla být indikátorem progresu Barrettova jícnu v adenokarcinom. Pokud by tomu tak bylo, pacienti, u kterých byl diagnostikován Barrettův jícen a vyskytuje se u nich nízká aktivita telomerázy a hTERT (v našem případě vzorky č. 6, 8, 19), by se měli i nadále více sledovat, protože je u nich největší pravděpodobnost progresu Barrettova jícnu v adenokarcinom.

5.3 Hodnocení výsledků z TRAP a Western blot analýzy vzhledem k získaným informacím o životním stylu pacientů

Výsledky z TRAP a Western blot analýzy byly spolu s údaji o životním stylu pacientů zpracovány graficky (Tab. IX, Graf 1, Tab. X, Graf 2). Bylo spočítáno procentuální zastoupení pacientů vzhledem k výsledkům z TRAP (zvýšená, stejná či snížená aktivita telomerázy) a Western blot analýzy (zvýšená, stejná, snížená exprese hTERT) a tyto výsledky byly ještě vztaženy k faktorům: kouření - nekouření, alkohol - abstinence, obezita - normal, hernie - normal. Vše bylo vyneseno do grafu. Byly zde zahrnuti pouze pacienti, u kterých byly uvedeny údaje týkající faktorů životního stylu.

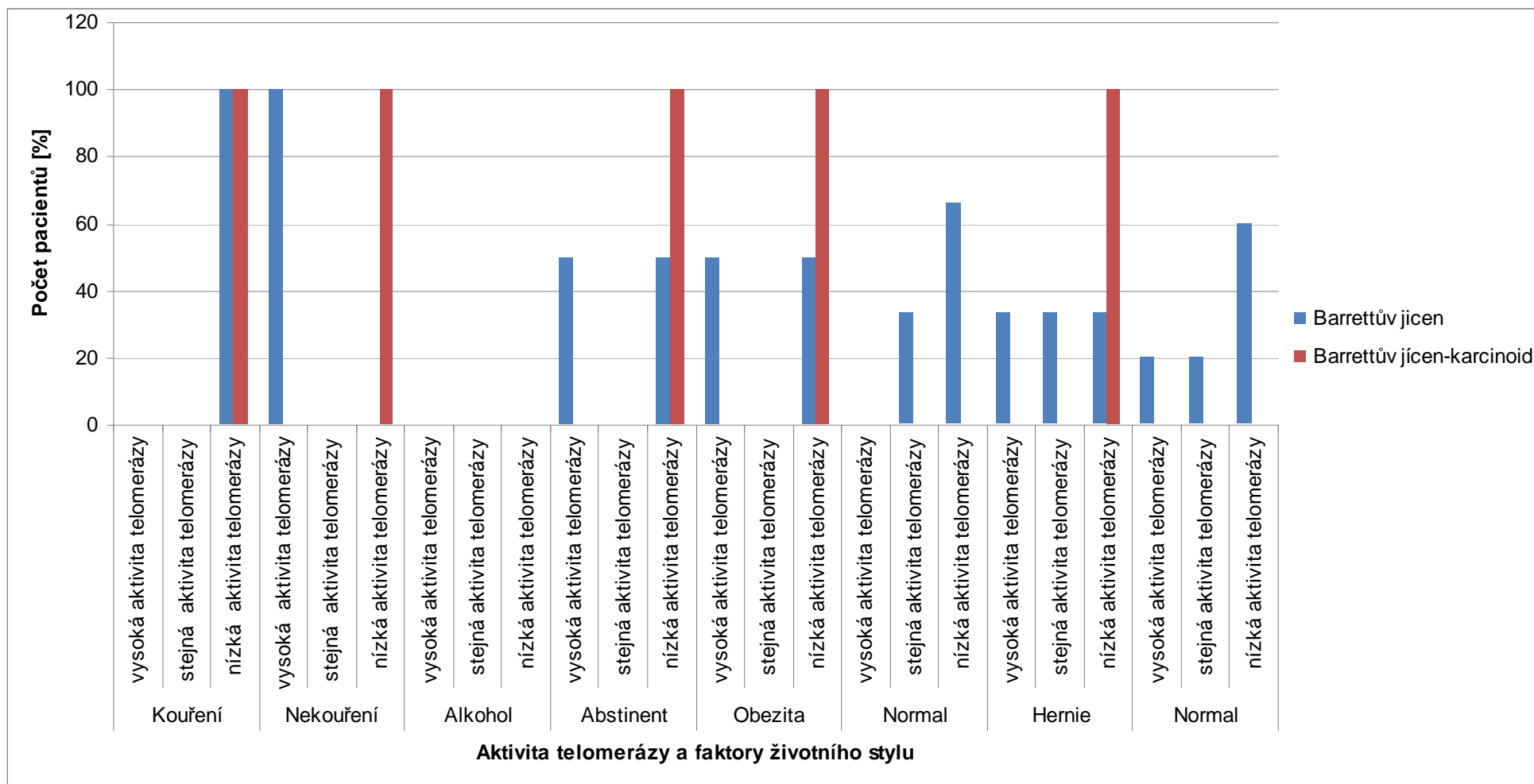
Tab. IX: Procentuální zastoupení pacientů s diagnózou Barrettův jícnem nebo karcinoid vzhledem k aktivitě telomerázy a k faktorům: kouření - nekouření, alkohol - abstinent, obezita - normal, hernie - normal.

	Aktivita telomerázy	Počet pacientů (diagnóza: Barrettův jícen) [%]	Počet pacientů (diagnóza: Barrettův jícen-karcinoid) [%]
Kouření	vysoká		
	stejná		
	nízká	100	100
Nekouření	vysoká	100	
	stejná		
	nízká		100
Alkohol	vysoká		
	stejná		
	nízká		
Abstinent	vysoká	50	
	stejná		
	nízká	50	100
Obezita	vysoká	50	
	stejná		
	nízká	50	100
Normal	vysoká		
	stejná	33	
	nízká	67	
Hernie	vysoká	33	
	stejná	33	
	nízká	33	100
Normal	vysoká	20	
	stejná	20	
	nízká	60	

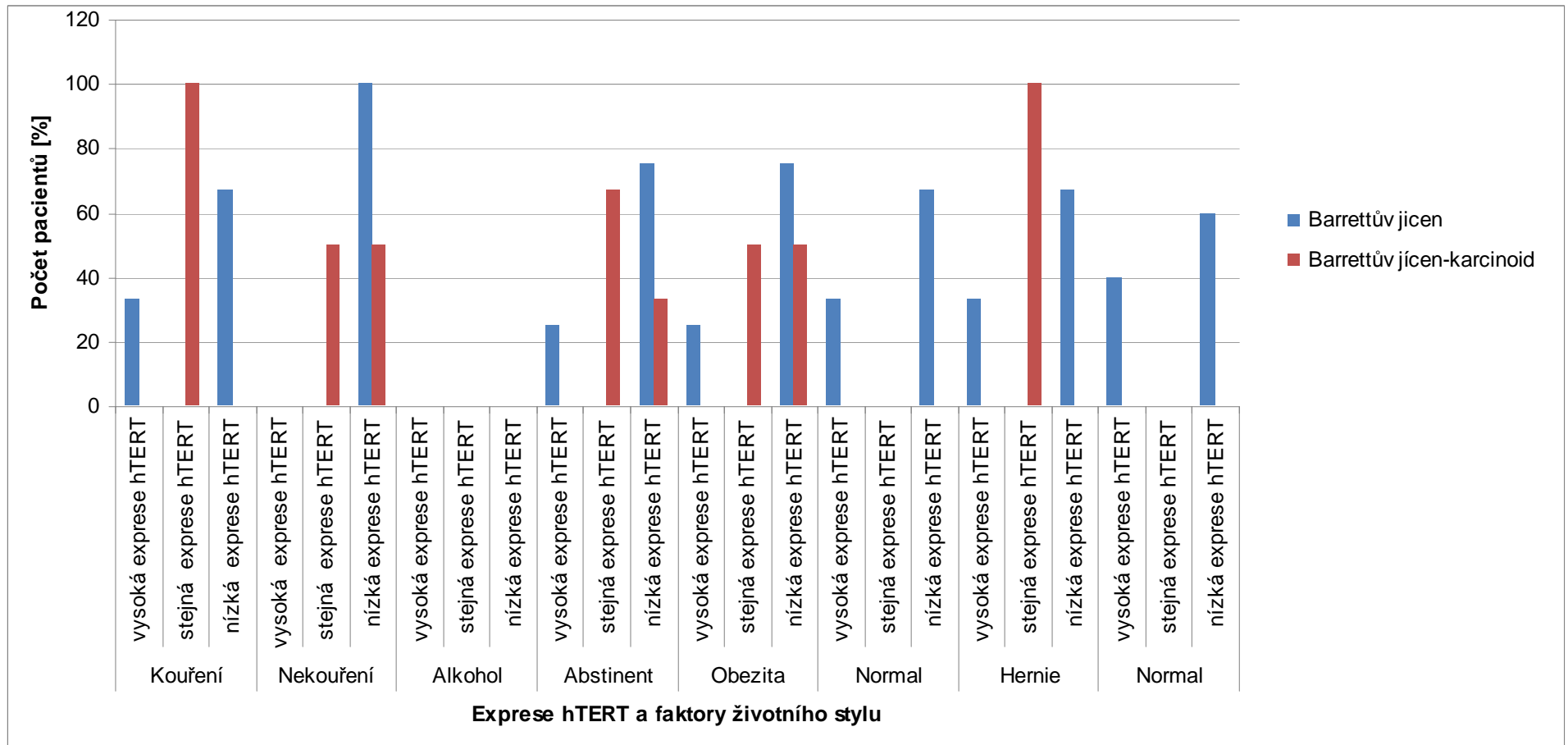
Tab. X: Procentuální zastoupení pacientů s diagnózou Barrettův jícnem nebo karcinoid vzhledem k expresi hTERT a k faktorům: kouření - nekouření, alkohol - abstinent, obezita - normal, hernie - normal.

	Expresie hTERT	Počet pacientů (diagnóza: Barrettův jícnem) [%]	Počet pacientů (diagnóza: Barrettův jícnem - karcinoid) [%]
Kouření	vysoká	33	
	stejná		100
	nízká	67	
Nekouření	vysoká		
	stejná		50
	nízká	100	50
Alkohol	vysoká		
	stejná		
	nízká		
Abstinent	vysoká	25	
	stejná		67
	nízká	75	33
Obezita	vysoká	25	
	stejná		50
	nízká	75	50
Normal	vysoká	33	
	stejná		
	nízká	67	
Hernie	vysoká	33	
	stejná		100
	nízká	67	
Normal	vysoká	40	
	stejná		
	nízká	60	

Graf 1: Závislost aktivity telomerázy a faktorů životního stylu (kouření - nekouření, alkohol - abstinent, obezita - normal, hernie – normal) k počtu pacientů s diagnózou Barrettův jícen či karcinoid v procentech.



Graf 2: Závislost exprese hTERT a faktorů životního stylu (kouření - nekouření, alkohol - abstinent, obezita - normal, hernie – normal) k počtu pacientů s diagnózou Barrettův jícen či karcinoid v procentech.



Vyhodnocení grafů (Graf 1, Graf 2):

U pacientů s diagnózou Barrettův jícen má rizikový faktor kouření vliv na nízkou aktivitu telomerázy u 100 % případů, vysokou expresi hTERT u 33 % a nízkou expresi hTERT u 67 % případů. U pacientů s diagnózou karcinoid byly výsledky rozdílné. Kouření má vliv u 100 % pacientů na nízkou aktivitu telomerázy a u 100 % na stejnou expresi hTERT.

U pacientů, kteří nekouří a byl u nich diagnostikován Barrettův jícen, se vyskytovala vysoká aktivita telomerázy a nízká exprese hTERT u 100 % případů. U pacientů s karcinoidem má nekouření vliv na nízkou aktivitu telomerázy u 100 % pacientů a u 50 % pacientů na stejnou a nízkou expresi hTERT.

Konzumace alkoholu ve větší míře nemá u pacientů vliv ani na aktivitu telomerázy, ani na expresi hTERT.

U pacientů s diagnózou Barrettův jícen, kteří nepijí alkohol, se vyskytovala vysoká a nízká aktivita telomerázy u 50 % případů, zatímco vysoká exprese hTERT se vyskytovala u 33 % a nízká exprese hTERT u 67 %. U pacientů s karcinoidem se nízká aktivita telomerázy vyskytovala u 100 %, stejná exprese hTERT u 67 % a nízká exprese hTERT u 33 % případů.

U pacientů s diagnózou Barrettův jícen má obezita vliv na vysokou a nízkou aktivitu telomerázy u 50 %, vysokou expresi hTERT u 33 % a nízkou expresi hTERT u 67 % případů. U pacientů s diagnózou karcinoid se obezita podílí u 100 % případů na nízké aktivitě telomerázy a u 50 % na stejné a nízké expresi hTERT.

U pacientů s Barrettovým jícnem, kteří netrpí obezitou, se stejná aktivita telomerázy vyskytovala u 33 % a nízká u 67 % případů. Vysoká exprese hTERT se vyskytovala u 33 % a nízká exprese hTERT u 67 %.

Výskyt hernie u pacientů s diagnózou Barrettův jícen se podílí na vysoké, stejné a nízké aktivitě telomerázy u 33 %, na vysoké expresi hTERT u 33 % a nízké expresi hTERT u 67 % případů. U pacientů s diagnózou karcinoid se výskyt hernie podílí u 100 % na nízké aktivitě telomerázy a u 100 % na stejné expresi hTERT.

Zatímco u pacientů s Barrettovým jícnem, u kterých se hernie nevyskytovala, byla vysoká a stejná aktivita telomerázy u 20 % a nízká u 60 %. Vysoká exprese hTERT se vyskytovala u 40 % a nízká u 60 % případů.

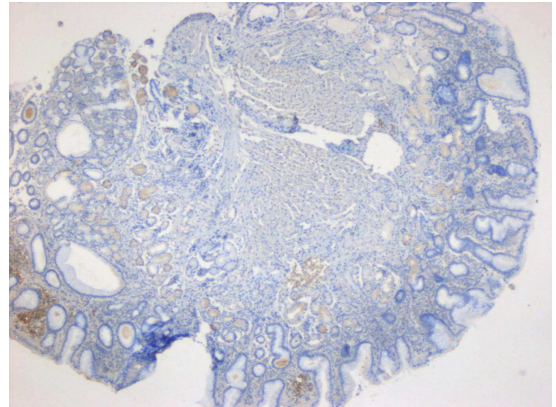
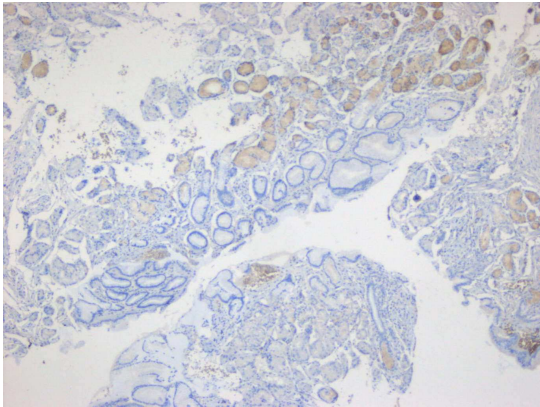
Z výsledků vyplývá, že faktor kouření má v našem souboru pacientů s diagnózou Barrettův jícn vliv na nízkou aktivitu telomerázy a pokud pacienti nekouří vyskytuje se u nich vysoká aktivita telomerázy. Jak již bylo zmíněno výše, u souboru pacientů s diagnózou adenokarcinom a karcinoid se vyskytovala nízká aktivita telomerázy. Mohli bychom tak kouření považovat za rizikový faktor, který by mohl mít vliv na progresi Barretova jícnu v adenokarcinom. Avšak exprese telomerázové podjednotky hTERT se vyskytovala nízká především u souboru pacientů s diagnózou Barrettův jícn, kteří nekouří. Výsledky tudíž nekorelují. U pacientů s diagnózou karcinoid se na výskytu nízké aktivity telomerázy podílí faktory kouření, nekouření, abstinence, obezita a hernie.

Nízká exprese hTERT se vyskytovala především v našem souboru pacientů s diagnózou Barrettův jícn, kteří nekouří a nepijí alkohol. A u pacientů s diagnózou karcinoid, kteří kouří, nepijí alkohol a mají hernii, se vyskytovala stejná exprese hTERT jako u zdravého jícnu. Tudíž by tyto faktory u tohoto souboru pacientů neměly mít vliv na další progresi onemocnění.

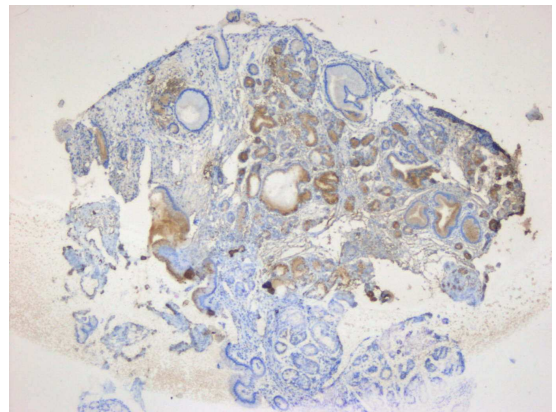
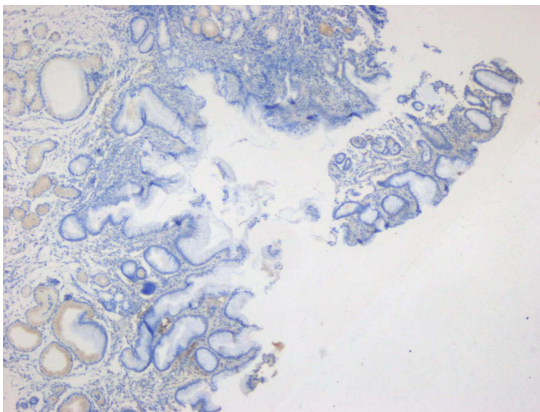
Můžeme také říci, že nadměrné pití alkoholu není v našem případě u pacientů považováno za rizikový faktor.

5.4 Imunohistochemie

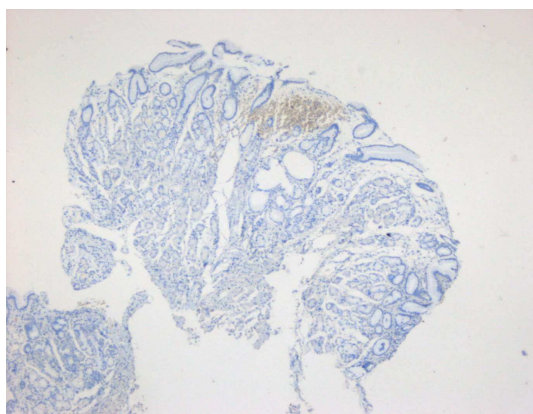
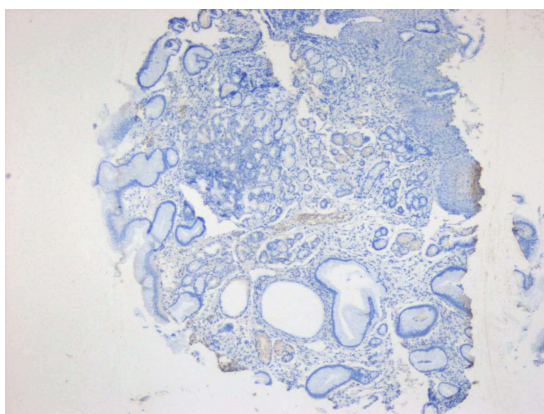
U jedenácti vzorků bylo provedeno imunohistochemické barvení tkáňových řezů pomocí imunoperoxidázové metody. Použitá protilátka proti hTERT však nefungovala, nedošlo k vizualizaci jaderné pozitivity hTERT, a proto byly všechny výsledky negativní (Obr. 9, Obr. 10, Obr. 11, Obr. 12, Obr. 13, Obr. 14).



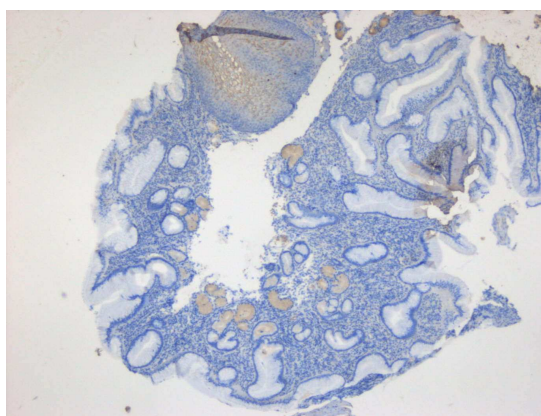
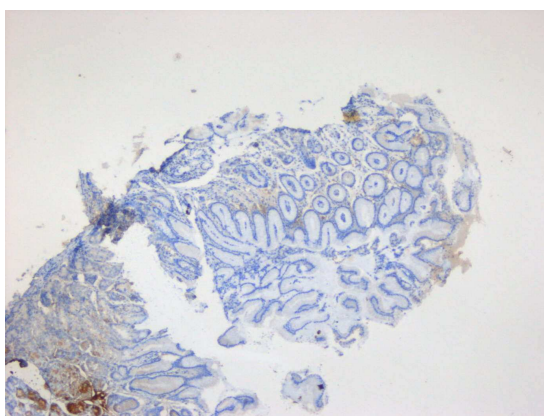
Obr. 9: Imunohistochemická detekce hTERT na tkáňovém řezu vzorku č. 6 – diagnóza: LGD (vlevo) a vzorku č. 8 – diagnóza: LGD (vpravo) (zvětšení 40×) .



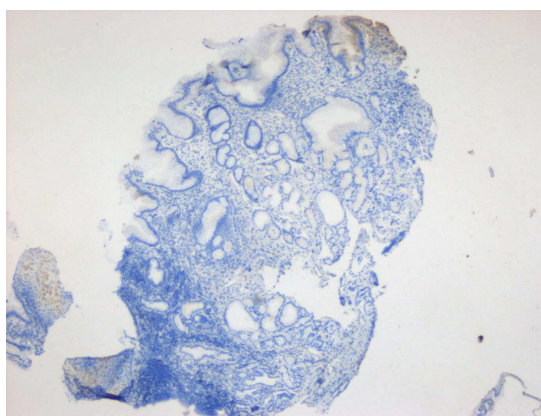
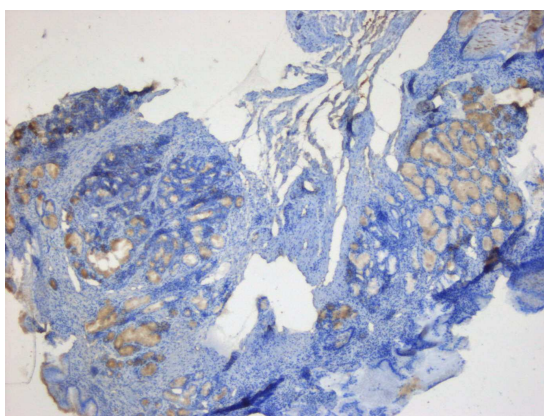
Obr. 10: Imunohistochemická detekce hTERT na tkáňovém řezu vzorku č. 12 – diagnóza: LGD (vlevo) a vzorku č. 10 – diagnóza: Barrettův jícen (vpravo) (zvětšení 40×).



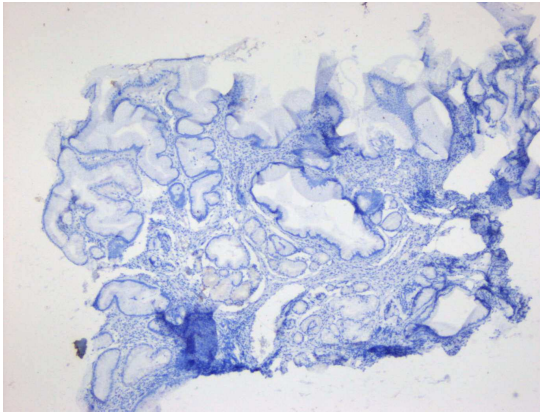
Obr. 11: Imunohistochemická detekce hTERT na tkáňovém řezu vzorku č. 11 – diagnóza: Barrettův jícen (vlevo) a vzorku č. 8 – diagnóza: Barrettův jícen (vpravo) (zvětšení 40×).



Obr. 12: Imunohistochemická detekce hTERT na tkáňovém řezu vzorku č. 37 – diagnóza: Barrettův jícen (vlevo) a vzorku č. 38 – diagnóza: Barrettův jícen (vpravo) (zvětšení 40×).



Obr. 13: Imunohistochemická detekce hTERT na tkáňovém řezu vzorku č. 4 – diagnóza: Barrettův jícen/karcinoid a vzorku č. 5 (vlevo) – diagnóza: Barrettův jícen/karcinoid (vpravo) (zvětšení 40×).



Obr. 14: Imunohistochemická detekce hTERT na tkáňovém řezu vzorku č. 7 –
diagnóza: Barrettův jícen/karcinoid (zvětšení 40×).

6 DISKUZE

V experimentální části diplomové práce jsem pracovala především se vzorky tkáně jícnu (v různém stupni vývoje onemocnění), které byly pacientům odebrány endoskopicky (MUDr. Jan Gregar, II. Interní klinika) a vzorky adenokarcinomu byly odebrány během operace jícnu (MUDr. Josef Srovnal, Ph.D., Dětská klinika). U těchto vzorů byla sledována aktivita telomerázy (TRAP) a změny exprese proteinu hTERT (Western blot analýza a imunohistochemické barvení tkáňových řezů). Odběr vzorků je náročný nejen na manuální zručnost endoskopisty a operátora, ale rovněž na výbornou znalost histologie jícnu. Ne vždy jsou tyto podmínky zachovány. Ve většině případů je změna výstelky jícnu obtížně lokalizovatelná, takže zdárný odběr tkáně může být zatížen chybou, která následně ovlivňuje validnost získaných výsledků.

Enzym telomeráza umožňuje koncům chromozómů prodlužovat je a zajistit jim stabilizaci a nesmrtelnost. Ke sledování aktivity byla zvolena metoda TRAP (byl použit kit TRAPEZE[®]), při které dochází k amplifikaci produktů telomerázy a ty jsou poté rozděleny na polyakrylamidovém gelu během elektroforézy. Existuje také několik modifikací metody TRAP. Pokud bychom tedy chtěli přesněji sledovat aktivitu telomerázy, mohli bychom využít například metody identifikace telomerázové aktivity přímo v buňce (*in situ* TRAP) nebo kvantifikaci produktů telomerázy (real-time TRAP) (Fajkus, 2006).

Výsledkem metody TRAP bylo vyobrazení amplifikovaného produktu jako „žebříčku“ různé délky. Vycházela jsem z předpokladu, že čím je vyšší aktivita telomerázy (je delší „žebříček“), tím je vyšší stupeň malignity (Kumar *et al.*, 2005). To se však u většiny vzorků nepotvrdilo. Souhlasilo to pouze u buněk MCF-7 a immortalizovaných buněk fibroblastů. Naopak u adenokarcinomů vyšla nízká nebo žádná aktivita telomerázy. Také u negativních kontrol došlo k rozporupným výsledkům. U buněk zdravých fibroblastů nebyla pozorována žádná telomerázová aktivita, výsledek tedy potvrdoval teoretický předpoklad. Avšak u vzorků zdravých jícnu došlo k amplifikaci produktu a při vizualizaci gelu byl vyobrazen „žebříček“, telomeráza byla tudíž aktivní. Vzorky jícnu byly odebrány endoskopicky a operativně, proto bychom měli brát v úvahu, že nemusí být zcela jisté, zda byla odebrána pouze požadovaná diagnostikovaná tkáň jícnu stejného charakteru. Zatímco buňky fibroblastů, které byly dodány Mgr. Martinem Mistríkem, Ph.D., byly zakoupeny ve firmě ATCC.

Jedná se tedy o komerční produkt a je pravděpodobné, že obsahuje pouze požadované buňky. Výsledky by tudíž měly odpovídat. Měli bychom se ale také zamyslet, zda není možné, že i u normální tkáně zdravého jícnu jsou fylogeneticky telomery dlouhé a telomeráza je aktivní (Ehrmann - osobní konzultace, 2011). Existuje také názor, že by mohla aktivita telomerázy korelovat se schopností regenerace buněk (Bachor *et al.*, 1999). U gastrointestinálního traktu, žaludku a střev se buňky obnovují za 2-6 dní, u jícnu přibližně za 7 dní (Eastwood, 1997). Pokud bychom se k těmto názorům přiklonili, odpovídaly by tomu i výsledky z Western blot analýzy. Zvýšená exprese proteinu hTERT se vyskytovala jak u zdravého jícnu, tak u zdravých fibroblastů. Také tomuto předpokladu odpovídají výsledky u skupiny vzorků s diagnózou adenokarcinom a karcinoid. U nich se obecně vyskytovala nízká nebo žádná aktivita telomerázy a stejná nebo nízká exprese hTERT oproti tkáni zdravého jícnu. Z těchto výsledků by se dalo předpokládat, že nízká aktivita telomerázy a nízká exprese hTERT by mohla být indikátorem progresu Barrettova jícnu v adenokarcinom. Tyto studie jsou však prvotní a byla použita malá skupina vzorků pacientů. Proto by bylo třeba provést tyto analýzy na větším počtu pacientů a výsledky případně potvrdit či vyvrátit.

V publikovaných člancích zabývajících se podobnou problematikou autoři také diskutují nad alternativou přítomnosti nádorových kmenových buněk (Wicha *et al.*, 2006; Dalerba *et al.*, 2007). Avšak po osobní konzultaci s Mgr. Martinem Mistríkem, Ph.D. (2011) byla tato možnost v našem případě zavržena, z důvodu malého počtu nádorových buněk. Metoda TRAP je příliš robustní pro detekci takto malého počtu buněk. Western blot analýza při použití specifických protilátek proti hTERT podjednotce je sice citlivější, otázkou však zůstává specifita komerčně dodávaných protilátek. To se projevilo při imunohistochemickém vyšetření, které ač byla protilátka deklarována jak na Western blot analýzu, tak pro imunohistochemii, nedošlo k vizualizaci jaderné pozitivivity hTERT. Naopak v některých případech byla pozorována pozitivita cytoplazmatická, která byla hodnocena jako falešná, resp. negativní. Snaha o zakoupení nové protilátky se nezdařila. Jediná firma, která poskytuje tyto protilátky proti hTERT (fa Baria – Acris Antibodies, Novus Biologicals), nabídla sice alternativní protilátku, nicméně s odlišným detekčním systémem, který nebyl na pracovišti zpracovávané diplomové práce akceptován.

U jedenácti pacientů, u kterých byly známy informace týkající se jejich životního stylu (kouření, alkohol, obezita) a výskytu hernie, byly tyto údaje porovnány s výsledky z TRAP a Western blot analýzy. Vzhledem k tomu, že soubor pacientů nebyl

příliš velký a ne u všech pacientů byly známy všechny údaje, nelze vyvozovat jednoznačné závěry. Pouze, že nadměrné pití alkoholu v našem souboru pacientů nemělo žádný vliv na aktivitu telomerázy a ani expresi hTERT. I přes malý soubor pacientů bychom ale měli stále považovat kouření, nadměrnou konzumci alkoholu a obezitu za možné rizikové faktory přispívající ke vzniku nádorového onemocnění.

V několika článcích je zmiňován názor, že telomerázová aktivita by se dala využít jako budoucí biomarker pro stanovení diagnózy nádorového onemocnění či onemocnění Barrettovým jícnem (Lord *et al.*, 2000; Gertler *et al.*, 2008). Avšak například Bachor *et al.* (1999) došli k názoru, že v případě Barrettova jícnu je nižší aktivita telomerázy ve srovnání s normálním jícnem, a to při použití metodiky TRAP. Na základě našich výsledků, kdy se exprese hTERT vyskytovala jak u tkáně zdravého jícnu, tak Barrettova jícnu, se přikláníme k názoru a výsledkům práce Fléjou (2005), že telomerázová aktivita není vhodným prognostickým a diagnostickým markerem pro Barrettův jícen.

7 ZÁVĚR

Telomeráza je enzym vyskytující se především u eukaryotických buněk, umožňující udržovat jejich délku telomer a zabránit tak buněčné smrti. Existuje několik studií, které se zabývají sledováním aktivity telomerázy u nádorových onemocnění a aplikací těchto výsledků na nádorovou terapii.

Telomerázová aktivita u Barrettova jícnu a u ostatních vzorků byla sledována pomocí metody TRAP. Její výskyt byl pozitivní u všech vzorků Barrettova jícnu, adenokarcinomu (kromě 2 vzorků), karcinoidu, imortalizovaných buněk fibroblastů, MCF-7, tkání střeva, ale také u vzorku zdravého jícnu. Dále pomocí Western blot analýzy byla sledována exprese telomerázové podjednotky hTERT, která byla pozitivní u všech vzorků kromě nádorové a nenádorové tkáně střeva. Nebyl tak potvrzen teoretický předpoklad, že vyšší aktivita telomerázy odpovídá vyšší malignitě. Naopak z výsledků u souboru pacientů s diagnózou adenokarcinom či karcinoid by se dalo předpokládat, že nízká aktivita telomerázy a nízká exprese hTERT, by mohla být indikátorem progresu Barrettova jícnu v adenokarcinom. Dále z výsledků také vyplývá, že aktivita telomerázy jako prognostický biomarker pro stanovení diagnózy onemocnění Barrettovým jícnem není zcela vhodný. Je zde však mnoho faktorů, které bychom měli brát v úvahu při vyslovení těchto závěrů. Například, že enzym telomeráza není jediným mechanismem prodlužování telomer. Existuje také jiný mechanismus a to alternativní prodlužování telomer. Dále bychom také neměli opomenout, že vzorky buněk MCF-7, fibroblastů, tkáně jícnu a střeva jsou různého původu, různé histologie a byly odebrány jinými způsoby. Odběry tkání během endoskopického vyšetření a operace jícnu mohou být nepřesné a nemusí být zcela jisté, že se jedná pouze o požadovanou tkáň stejného charakteru. V neposlední řadě bychom také měli brát v úvahu, že tato práce je pilotní a byla prováděna na nevelkém počtu pacientů. Výsledky proto nejsou statisticky validní. Jedná se však o dlouhodobý projekt a předpokládá se, že se bude ve výzkumu telomerázové aktivity u Barrettova jícnu i nadále pokračovat.

8 LITERATURA

Al-Tashi, M., Rejchrt, S., Tyčová, V., Bureš, J. (2007): Barrettův jícen. Lékařské zprávy Léařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové 52: 191-205.

Bachor, C., Bachor, O.A., Boukamp, P. (1999): Telomerase is active in normal gastrointestinal mucosa and not up-regulated in precancerous lesions. Journal of Cancer Research & Clinical Oncology 125: 453-460.

Blasco, M.A. (2005): Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. The EMBO Journal 24: 1095-1103.

Bryan, T.M., Reddel, R.R. (1997): Telomere dynamics and telomerase activity in *in vitro* immortalised human cells. European Journal of Cancer 33: 767-773.

Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A., Reddel, R.R. (1997): Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. Nature Medicine 3:1271-1274.

Bryce, L.A., Morrison, N., Hoare, S.F., Muir, S., Keith, W.N. (2000): Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, *hTERT*, to chromosome 5p15.33 by fluorescence *in situ* hybridization. Neoplasia 2: 197-201.

Clément, G., Jablons, D.M., Benhattar, J. (2007): Targeting the Wnt signaling pathway to treat Barrett's esophagus. Expert Opinion on Therapeutic Targets 11: 375-389.

Dalerba, P., Cho, R.W., Clarke, M.F. (2007): Cancer stem cells: models and concepts. The Annual Review of Medicine 58: 267-284.

de Lange, T. (2005): Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes & Development 19: 2100-2110.

Dhaene, K., Marck, E.V., Parwaresch, R. (2000): Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Archiv* 437: 1-16.

Eastwood, G.E. (1997): Gastrointestinal epithelial renewal. *Gastroenterology* 72: 962-975.

Fajkus, J. (2006): Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clinica Chimica Acta* 371: 25-31.

Falt, P., Urban, O., Fojtík, P., Kliment, M. (2009): Radiofrekvenční ablace v terapii Barrettova jícnu – naše první zkušenosti. *Endoskopie* 18: 118-123.

Fléjou, J.F. (2005): Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut* 54: i6-i12.

Galipeau, P.C., Prevo, L.J., Sanchez, C.A., Longton, G.M., Reid, B.J. (1999): Clonal expansion and loss of heterozygosity at chromosomes 9p and 17p in premalignant esophageal (Barrett's) tissue. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 2087-2095.

Gertler, R., Doll, D., Maak, M., Feith, M., Rosenberg, R. (2008): Telomere length and telomerase subunits as diagnostic and prognostic biomarkers in Barrett carcinoma. *Cancer* 112: 2173-2180.

Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405 - 413.

Hamelin, R., Fléjou, J.F., Muzeau, F., Potet, F., Laurent-Puig, P., Fékété, F., Thomas, G. (1994): TP53 gene mutations and p53 protein immunoreactivity in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 107: 1012-1018.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Harlow, E., Lane, D. (1998): Using antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Hayflick, L., Moorhead, P.S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 25: 585-621.

Henson, J.D, Neumann, A.A., Yeager, T.R., Reddel, R.R. (2002): Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 21: 598-610.

Hiyama, E., Hiyama, K. (2002): Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* 21: 643-649.

Huang, F., Kanno, H., Yamamoto, I., Lin, Y., Kubota, Y. (1999): Correlation of clinical features and telomerase activity in human gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 43: 137-142.

Jaknecht, R. (2004): On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Letters* 564: 9-13.

Jankowski, J., Barr, H., Wang, K., Delaney, B. (2010): Diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *British Medical Journal* 341: 597-602.

Kaušitz, J., Altaner, Č. a kolektiv autorov (2003): *Onkológia*, pp. 326-330, Veda, Bratislava.

Kawakami, K., Brabender, J., Lord, R.V., Groshen, S., Greenwald, B.D., Krasna, M.J., Yin, J., Fleisher, A.S., Abraham, J.M., Beer, D.G., Sidransky, D., Huss, H.T., DeMeester, T.R., Eads, C., Laird, P.W., Ilson, D.H., Kelsen, D.P., Harpole, D., Moore, M.B., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Meltzer, S.J. (2000): Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 1805–1811.

Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015.

Köcher, M., Dlouhý, M. (2000): Stenty v řešení maligních procesů jícnu, pp. 4-7, Hradec Králové: Olga Štambergová-Grafické a reklamní studio.

Kumar, S.K.S., Zain, R.B., Ismail, S.M., Cheong, S.C. (2005): Human telomerase reverse transcriptase expression in oral carcinogenesis - a preliminary report. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 24: 639-646.

Lešník, F., Ostró, A. (2010): Teloméry, telomeráza, starnutie a rakovina. *Lékařské listy*. Košice.

Lord, R.V., Salonga, D., Danenberg, K.D., Peters, J.H., DeMeester, T.R., Park, J.M., Johansson, J., Skinner, K.A., Chandrasoma, P., DeMeester, S.R., Bremner, C.G., Tsai, P.I., Danenberg, P.V. (2000): Telomerase reverse transcriptase expression is increased early in the Barrett's metaplasia, dysplasia, adenocarcinoma sequence. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 4: 135-142.

Lukáš, K. (1997): Refluxní choroba: minimum pro praxi, pp. 11-29, Triton, Praha.

Lukáš, K. (2000): Barrettův jícen z pohledu gastroenterologa. *Novinky z gastroenterologie* 1: 3-6.

Lukáš, K. (2005): Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry, pp. 180-185, Grada Publishing, Praha.

Lukáš, K., Žák, A. (2007): Gastroenterologie a hepatologie – učebnice, pp. 81-88, Grada Publishing, Praha.

Mačák, J., Mačáková, J. (2004): Patologie, pp. 88-89, Grada Publishing, Praha.

Malfertheiner, P., Peitz, U. (2005): The interplay between *Helicobacter pylori*, gastro-oesophageal reflux disease, and intestinal metaplasia. *Gut* 54: i13-i20.

Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, O., Bacchetti, S., Haber, D.A., Weinberg, R.A. (1997): *hEST2*, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90: 785-795.

Morales, C.P., Lee, E.L., Shay, J.W. (1998): *In situ* hybridization for the detection of telomerase RNA in the progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Cancer* 83: 652-659.

Morales, C.P., Souza, R.F., Spechler, S.J. (2002): Hallmarks of cancer progression in Barrett's esophagus. *The Lancet* 360: 1587-1589.

O'Connor, C. (2008): Telomeres of human chromosomes. *Nature Education* 1.

Overholt, B.F., Lightdale, C.J., Wang, K.K., Canto, M.I., Burdick, S., Haggitt, R.C., Bronner, M.P., Taylor, S.L., Grace, M.G., Depot, M. (2005): Photodynamic therapy (PDT) with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: international, partially blinded randomized phase III trial. *Gastrointestinal Endoscopy* 62: 488-498.

Rybka, J. (2007): Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění. Diagnostické a léčebné postupy, pp. 205-209, Grada Publishing, Praha.

Sampliner, R.E. (1998): Practice guidelines on the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *The American Journal of Gastroenterology* 93: 1028-1032.

Shaheen, N.J., Sharma, P., Overholt, B.F., Wolfsen, H.C., Sampliner, R.E., Wang, K.K., Galanko, J.A., Bronner, M.P., Goldblum, J.R., Bennett, A.E., Jobe, B.E., Eisen, G.M., Fennerty, M.B., Hunter, J.G., Fleischer, D.E., Sharma, V.K., Hawes, R.H., Hoffman, B.J., Rothstein, R.I., Gordon, S.R., Mashimo, H., Chang, K.J., Muthusamy, V.R., Edmundowicz, S.A., Spechler, S.J., Siddiqui, A.A., Souza, R.F., Infantolino, A., Falk, G.W., Kimmey, M.B., Madanick, R.D., Chak, A., Lightdale, C.J. (2009): Radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia. *The New England Journal of Medicine* 360: 2277-2288.

Shay, J.W., Bacchetti, S. (1997): A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer* 33: 787-791.

Singh, S.P., Lipman, J., Goldman, H., Ellis, F.H.Jr., Aizenman, L., Cangj, M.G., Signoretti, S., Chiaur, D.S., Pagano, M., Loda, M. (1998): Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Research* 58: 1730-1735.

Spechler, S.J. (1993): Laser photoablation of Barrett's epithelium: burning issues about burning tissues. *Gastroenterology* 104: 1855-1858.

Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009): *Genetika*, pp. 237-283, Masarykova Univerzita, Brno.

Svenson, U., Roos, G. (2009): Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1792: 317-323.

Švec, J. (2006): Telomery, telomerázový komplex a kolorektální karcinom. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie* 60: 263-270.

Urquidi, V., Tarin, D., Goodison, D. (2000): Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *The Annual Review of Medicine* 51: 65-79.

Wicha, M.S., Liu, S., Dontu, G. (2006): Cancer stem cells: an old idea – a paradigm shift. *Cancer Research* 66: 1883-1890.

Wijnhoven, B.P.L., Tilanus, H.W., Dinjens, W.N.M. (2001): Molecular Biology of Barrett's adenocarcinoma. *Annals of Surgery* 233: 322-337.

Wild, C.P., Hardie, L.J. (2003): Reflux, Barrett's oesophagus and adenocarcinoma: burning questions. *Nature Reviews Cancer* 3: 676-684.

Wong, D.J., Paulson, T.G., Prevo, L.J., Galipeau, P.C., Longton, G., Blount, P.L., Reid, B.J. (2001): p16(INK4a) lesions are common, early abnormalities that undergo clonal expansion in Barrett's metaplastic epithelium. *Cancer Research* 61: 8284-8289.

Wyatt, H.D.M., Tsang, A.R., Lobb, D.A., Beattie, T.L. (2009): Telomerase reverse transcriptase (hTERT) Q169 is essential for telomerase function *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE* 4: e7176.

Zagorowitz, E., Jankowski, J. (2007): Molecular changes in progression of Barrett's oesophagus. *Postgraduate Medical Journal* 83: 529-535.

Zhang, H.Y., Splechler, S.J., Souza, R.F. (2009): Esophageal adenocarcinoma arising in Barrett Esophagus. *Cancer Letters* 275: 170-177.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFI	autofluorescenční zobrazování (autofluorescence imaging)
APC	tumor supresorový gen lokalizován na chromozomu 5q (adenomatous polyposis coli)
ALT	alternativní prodlužování telomer (alternative lengthening of telomeres)
ATCC	American Type Culture Collection
CK	cytokeratin
DAB	3,3'- diaminobenzidin
DMEM	Eaglovo médium modifikované dle Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	směs deoxyribonukleosid trifosfátů
ECTR	extrachromozomální telomerické repetice
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
GERD	refluxní choroba jícnu (Gastroesophageal reflux disease)
H&E	hematoxylin-eozin
HGD	těžká dysplazie (high - grade dysplasia)
hTR	telomerázová RNA (human Telomerase RNA)
hTERT	telomerázová reverzní transkriptáza (human Telomerase Reverse Transkriptase)
CHAPS	(3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonát)
LGD	lehká dysplazie (low - grade dysplasia)
LOH	ztráta heterozygotnosti (loss of heterozygoty)
LSB	Laemmli sample buffer
MDG	střední dysplazie (moderate - grade dysplasia)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
miRNAs	mikroRNA
NBI	úzkopásmové zobrazení (narrow band imaging)
NP-40	nonyl fenoxylpolyethoxyethanol
<i>p16</i>	tumor supresorový gen lokalizován na chromozomu 9p

<i>p27</i>	tumor supresorový gen lokalizován na chromozomu 14q
<i>p53</i>	tumor supresorový gen lokalizován na chromozomu 17p
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza (polyacrylamide gel electrophoresis)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
PERS	peroxodisíran amonný
POT1	telomer - vazebný protein (Protection of telomerase-1)
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	otáčky za minutu (revolutions per minute)
RT-PCR	real-time PCR
<i>Taq</i>	<i>Thermus aqaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
TRAP	telomere repeat amplification protocol
TRF1	telomer - vazebný protein (telomer - repeat binding factor 1)
TRF2	telomer - vazebný protein (telomer - repeat binding factor 2)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminometan
SDS	lauryl síran sodný (sodium dodecyl sulphate)