

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Eliška Růžičková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Real-time PCR a jeho využití pro subtypizaci difúzního
velkobuněčného lymfomu**

Bakalářská práce

Eliška Růžičková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Mgr. Jana Kučerová

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury a za pomoci vedoucí práce.“

V Olomouci dne.....

.....

Eliška Růžičková

Souhrn

Polymerázová řetězová reakce je revoluční vynález, o který se zasloužil Kary B. Mullis. O deset let později od tohoto objevu mu byla udělena Nobelova cena. Princip polymerázové řetězové reakce je založen na replikaci nukleových kyselin *in vitro*. Dochází při ní k amplifikaci požadovaného úseku DNA či RNA, přičemž jeho množství po každém cyklu amplifikace exponenciálně roste. Po ukončení standardní polymerázové řetězové reakce lze produkt např. kvalitativně detekovat pomocí gelové elektroforézy. Existuje řada modifikací polymerázové řetězové reakce, metoda real-time pak umožňuje i kvantitativní detekci.

Real-time polymerázová řetězová reakce se od té klasické liší v možnosti sledovat nárůst produktu v každém cyklu amplifikace, tedy v reálném čase. Produkt se detekuje nejčastěji fluorescenčně v průběhu reakce, je však také možné hodnotit fluorescenci až po ukončení amplifikace. K vyhodnocení není zapotřebí gelové elektroforézy. Výsledky jsou analyzovány počítačem, který zobrazí graf amplifikační křivky a vyhodnotí její parametry. Real-time polymerázová řetězová reakce má různé aplikace – je možné provádět relativní a absolutní kvantifikaci nebo např. genotypizaci High Resolution Melting analýzou.

Relativní kvantifikací lze analyzovat genovou expresi. Ta umožňuje identifikovat geny zodpovědné za průběh řady nemocí, jedním z příkladů je i difuzní velkobuněčný lymfom. Je to nejčastěji diagnostikovaný typ non-Hodgkinských lymfomů vyznačující se velkou heterogenitou a poměrně agresivním průběhem. Difuzní velkobuněčný lymfom má řadu subtypů odlišně reagujících na klasickou léčbu. Rozlišení jednotlivých subtypů umožňuje určit odpovídající léčebný postup. V současnosti je snaha nově přistupovat k subtypizaci, protože současné rozdělení subtypů často neodpovídá prognóze. Existuje řada studií, zabývajících se modely predikce celkového přežití pacientů, založených na expresi určitých genů.

Summary

The polymerase chain reaction is a revolutionary invention, that was realized by Kary B. Mullis. He was awarded the Nobel Prize ten years later. The principle of polymerase chain reaction is based on replication of nucleic acids *in vitro*. A specific section of DNA or RNA can be amplified. The quantity of product grows exponentially in each cycle of amplification. After the standard polymerase chain reaction ends, it can be qualitatively detected by gel electrophoresis. There are many modifications of polymerase chain reaction, real-time PCR allows a quantitative detection.

Real-time polymerase chain reaction differ from the classic polymerase chain reaction. As the name suggests, the increase in product can be observed in each cycle of amplification. Fluorescent detection is usually used during the amplification, however end-point analysis is also possible, e.g. in case of genotyping. Gel electrophoresis is not needed for visualisation of the results. The results are analyzed by the computer, which displays amplification curve in a graph. Real-time polymerase chain reaction has several applications – it's possible to perform relative and absolute quantification or genotyping by High Resolution Melting analysis.

Gene expression can be analyzed by relative quantification. It allows identification of genes involved in progression of diseases such as diffuse large B-cell lymphoma for example. DLBCL is the most frequently diagnosed type of non-Hodgkin's lymphoma, characterized by the large heterogeneity and relatively aggressive course of the disease. Diffuse large B-cell lymphoma has several subtypes that react differently to the classical treatment. Ability to distinguish between the individual subtypes makes it possible to determine the appropriate treatment. At present, search for new ways of subtyping is in progress, because contemporary classification into subtypes often isn't in accordance with prognosis. Series of studies were published dealing with models of prediction of overall survival based on the expression of specific genes.

Cíl práce

Vypracovat literární rešerši na téma PCR, real-time PCR a subtypizace difúzního velkobuněčného lymfomu. Změřit expresi genu *BLIMP1* u vzorků s klinicky diagnostikovaným difúzním velkobuněčným lymfomem pomocí real-time PCR. Ověřit použitelnost měření exprese u formalinem fixovaných parafínových bločků. Pokusit se určit vztah změn v expresi genu k subtypům difúzního velkobuněčného lymfomu a prognostickým skupinám.

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Janě Kučerové za odborné vedení, cenné rady, ochotu a velkou trpělivost, kterou mi při řešení této bakalářské práce věnovala. Děkuji i pracovníkům Ústavu biologie LF UPOL za to, že mi umožnili vypracovat bakalářskou práci na svém pracovišti, jmenovitě i doc. RNDr. Vladimíru Divokému, Ph.D., přednostovi tohoto ústavu. Za konzultaci ohledně difuzního velkobuněčného lymfomu děkuji prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc. Práce byla podporována grantem MZČR IGA NT 11103.

Obsah

1. Úvod	10
2. Standardní polymerázová řetězová reakce	11
2.1. Objev a vývoj PCR	11
2.2. Princip PCR.....	11
2.3. Chemické složení reakční směsi pro PCR.....	14
2.4. Vlastnosti <i>Taq</i> DNA polymerázy	15
2.5. Design primerů	16
2.5.1. Primery využívající nukleotidové analogy	19
2.6. Faktory ovlivňující PCR	19
2.7. Metody využívající princip PCR.....	20
2.7.1. Reverse transcription PCR (RT-PCR).....	21
2.7.2. Nested PCR	21
2.7.3. Inverzní PCR.....	22
2.7.4. Další metody využívající princip PCR	22
2.7.5. Next generation PCR	23
3. Real-time PCR	24
3.1. Rozdíl ve složení reakční směsi oproti standardní PCR.....	24
3.2. Způsoby detekce signálu.....	25
3.2.1. dsDNA interkalační barviva.....	25
3.2.2. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	26
3.2.2.1 FRET sondy.....	26
3.2.2.2 Hydrolyzační oligonukleotidové sondy (TaqMan sondy)	27
3.2.2.3 Molecular beacons neboli molekulární majáky.....	28
3.2.2.4 Scorpion primery.....	29
3.2.3. Light-up sondy.....	30

3.2.4.	LUX primery a další.....	30
3.2.5.	Universal ProbeLibrary Systém (UPL systém)	31
3.2.6.	Přístroje pro real-time PCR	31
3.3.	One-step a Two-step real-time RT-PCR.....	32
3.4.	Multiplex real-time PCR.....	33
4.	Využití real-time PCR.....	34
4.1.	Kvantifikace	34
4.1.1.	Absolutní kvantifikace	35
4.1.2.	Relativní kvantifikace	36
4.2.	Analýza křivky tání.....	37
4.3.	High Resolution Melting analýza (HRM).....	38
4.4.	Alelická diskriminace	38
5.	Využití real-time PCR pro subtypizaci difuzního velkobuněčného lymfomu	40
6.	Materiál a metodika.....	43
6.1.	Klinický materiál.....	43
6.2.	Izolace RNA z formalinem fixovaných parafínových bločků.....	43
6.3.	Přepis RNA na cDNA	44
6.4.	Real-time PCR.....	45
7.	Výsledky a diskuze	47
8.	Závěr	51
	Použitá literatura	52
	Seznam použitých zkratk.....	57

1. Úvod

Jednou z revolučních technik molekulární biologie je polymerázová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction (PCR). PCR je metoda umožňující amplifikaci specifických úseků DNA, čímž dovoluje studium genů, analýzu jejich exprese, detekci a kvantifikaci virové infekce či determinaci molekulární podstaty chorob. Tímto PCR zasahuje do mnoha oborů, jako je forenzní věda, archeologie, biologie a v současné době především medicína.

PCR od svého objevu prošla mnoha inovacemi. Bylo vyvinuto velké množství variant, které se vyznačují modifikací enzymů, primerů nebo podmínek. Tyto metody mají široké využití.

V současné době je v diagnostice i ve výzkumu nepostradatelná PCR v reálném čase. Metoda aplikovatelná nejen na detekci patogenů, mutantních alel a genotypizaci. Nejčastěji se používá pro určení exprese genů, čímž lze například objasnit původ nádorových a jiných onemocnění, určit rizikové faktory, rozčlenit pacienty do rizikových skupin a předpovědět celkové přežití.

2. Standardní polymerázová řetězová reakce

2.1. Objev a vývoj PCR

Polymerázová řetězová reakce byla poprvé provedena v roce 1983. O tento vynález se zasloužil americký vědec Kary B. Mullis, který v té době pracoval pro Cetus Corporation v Emeryville, jednu z prvních biotechnologických společností. K. B. Mullisovi byla 8. prosince 1993 udělena Nobelova cena za chemii (<http://www.nobelprize.org>; Mullis, 1990).

Bez předcházejících objevů by však K. B. Mullis jen těžko dokázal uvést do praxe polymerázovou řetězovou reakci, a tím způsobit převrat v molekulární biologii. Nedílnou součástí PCR reakce je enzym DNA polymeráza nezbytná pro replikaci DNA. Byla objevena už v roce 1955 Arthurem Kornbergem ze Standfordské Univerzity, purifikovat se jí však podařilo až v roce 1958. Pochopení mechanismu jejího účinku a zjištění, že oligonukleotidy mohou sloužit jako primery pro determinaci specifických nukleotidových sekvencí nebo genů, byl poslední nutný poznatek k realizaci PCR (Mullis, 1990).

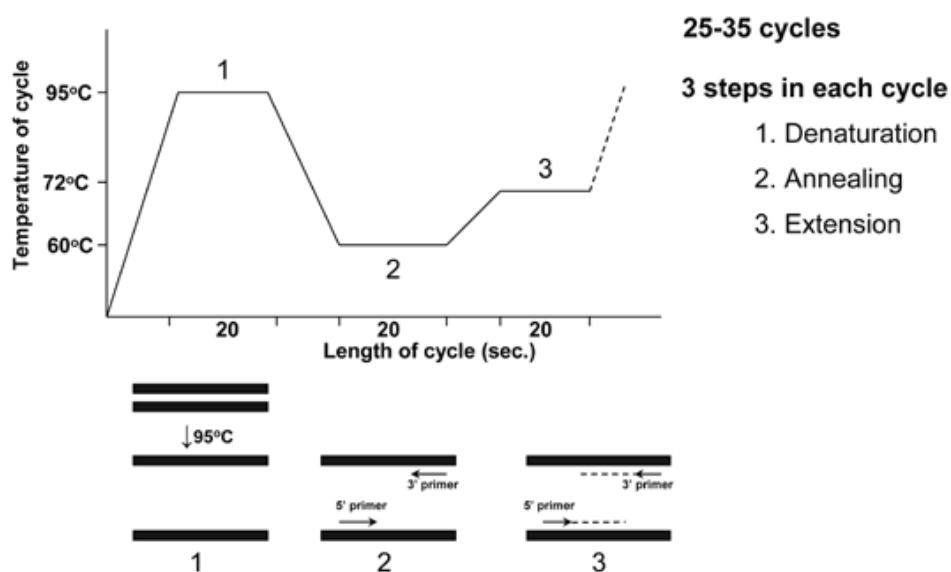
Dnes se PCR podstatně liší od té původní. PCR na svých počátcích k amplifikaci DNA využívala Klenowův fragment, součást DNA polymerázy I, purifikované z *Escherichia coli*. PCR byla řízena manuálně, což byl velmi zdlouhavý a náročný proces, protože denaturační krok nutný pro oddělení dvojřetězcové DNA (dsDNA) také denaturoval polymerázu, která pracovala při 37 °C. Z tohoto důvodu musel být enzym do reakce přidáván po každém cyklu. Tato nevýhoda byla překonána nahrazením Klenowova fragmentu termostabilní DNA polymerázou z bakterie *Thermus aquaticus*, neboli *Taq* DNA polymerázou, purifikovanou už dříve v roce 1976. Využití této termostabilní polymerázy, která nepodléhá denaturaci ani při 95 °C, zvýšilo senzitivitu a specifitu reakce a také množství a délku produktů. Vědci ze Cetus Corporation v roce 1992 PCR automatizovali konstrukcí prvního thermocycleru (Garcia, Shwu-Fan Ma, 2005).

2.2. Princip PCR

Polymerázová řetězová reakce je založena na replikaci nukleových kyselin *in vitro*. PCR vede k selektivní amplifikaci vybraných úseků DNA prostřednictvím enzymu DNA polymerázy. Na specifickou část templátového řetězce nasedají primery,

kteře jsou rozpoznávány DNA polymerázou a od kterých se DNA syntéza zahajuje. Polymeráza používaná k syntéze musí být termostabilní, aby odolávala vysokým denaturačním teplotám DNA. Tyto polymerázy se izolují z termofilních mikroorganismů, jakým je např. již výše zmíněná bakterie *Thermus aquaticus*. Replikace probíhá opakovaně v cyklech. Na množství cyklů závisí výsledná koncentrace produktu (Šmarda *et al.*, 2005).

Tento proces probíhá v přístroji zvaném thermocycler, který automaticky udržuje naprogramované teploty po čas nezbytný pro jednotlivé kroky PCR. Reakce je zahájena počáteční denurací, na kterou obvykle navazuje cyklus tří teplot, ve kterých probíhá denaturace, nasedání primerů (annealing) a extenze templátového řetězce, jak je podrobněji uvedeno níže. Amplifikace je ukončena terminální elongací, kdy dochází ke kompletnímu dosyntetizování PCR produktů. Obrázek 1 graficky znázorňuje postup při jednom PCR cyklu.



Obr. 1: Princip PCR amplifikace. 1) Denaturace dsDNA na jednotlivé řetězce při teplotě 95 °C. 2) Nasedání primerů na jednořetězcovou DNA (ssDNA) při teplotě pohybující se mezi 55 a 65 °C. 3) Syntéza dvouřetězcových kopií templátové DNA při 72 °C (Hue-Roye, Vege, 2008).

Prvním krokem je úplná denaturace DNA na jednořetězcové úseky, která probíhá při 95 °C. Pro počáteční denuraci dostačuje 2 – 5 min. Pokud by se templát denaturoval jen částečně, molekuly by opět rychle renaturovaly, což by mělo za následek nižší amplifikační efektivitu. V každém dalším cyklu probíhá denaturace

obvykle mezi 15 a 45 s při teplotě 95 °C (Hue-Roye, Vege, 2008; Šmarda *et al.*, 2005).

Následuje ochlazení na 55 až 65 °C po dobu 30 – 60 s. V tomto kroku se oligonukleotidové primery váží ke komplementárním jednořetězcovým úsekům DNA templátu. Proto je nutná jeho úplná denaturace. Teplota pro nasedání (hybridizaci) primerů se označuje jako T_a (annealing temperature). Je to důležitý faktor, protože specificita reakce je na ní závislá. Nastavuje se podle délky a poměru GC/AT bází primerů. Ideální teplota musí být dostatečně nízká, aby došlo k hybridizaci mezi primerem a templátem a současně dostatečně vysoká na to, aby nedocházelo k nespecifickému nasedání primerů, a tím tvorbě nežádoucích produktů. Tuto teplotu určíme z tzv. teploty tání (T_m , melting temperature) hybridu mezi primerem a templátem. Teplota tání je teplota, při které je polovina hybridů primeru a templátu v disociovaném stavu. Teplota 1 – 2 °C pod teplotou tání by měla být dostatečná pro specifickou hybridizaci primerů a minimální tvorbu nespecifických produktů. T_m lze určit experimentálně, ale častěji se pro její výpočet využívají vzorce (Brown, 2007; Hue-Roye, Vege, 2008; Šmarda *et al.*, 2005).

Po hybridizaci primerů se teplota zvyšuje na 72 °C. Tento krok se označuje jako extenzní a teplota se udržuje přibližně 1 min. Doba se upravuje podle délky produktu. Obecným pravidlem je, že na 1000 bp je dostatečných asi 60 s. *Taq* DNA polymeráza nasedá na templát a syntetizuje řetězec mezi dvěma primery. DNA polymerázy syntetizují různou rychlostí (např. *Taq* 60 bází/s). V případě, že je sekvence bohatá na AT páry, je vhodnější elongaci provádět při 68 °C, při níž polymeráza postupuje pomaleji a je potřebná optimalizace doby elongace. PCR amplifikace je ukončena terminální elongací po dobu 7 min. Výsledným produktem PCR jsou amplikony, úseky dlouhé desítky až tisíce párů bází (bp) (Hue-Roye, Vege, 2008; Šmarda *et al.*, 2005).

Tyto tři kroky (denaturace, annealing a extenze) se opakují 25 - 35 krát. Příliš mnoho cyklů zvyšuje množství nespecifických produktů. Počet kopií po prvním cyklu exponenciálně roste (2^n , n = počet cyklů). Vytváří se tak až miliarda kopií vybraného úseku DNA. V pozdních cyklech však dochází ke zpomalování a následnému zastavení PCR amplifikace, a to z důvodu inhibice reakce přílišným množstvím PCR produktu, vyčerpáním reagensů, jako jsou dNTP nebo primery,

nebo kvůli ztrátě aktivity DNA polymerázy. Použití těchto tří teplotních kroků se označuje jako three-step PCR. Používá se hlavně v případech, kdy je T_a nižší než 60 °C, templát má vyšší obsah GC párů bází a/nebo sekundární struktury. Kroky nasedání primerů a extenzní mohou být spojeny v jeden, tzv. two-step PCR. Přednostně se volí, pokud je T_a vyšší než 60 °C. V tomto spojeném kroku se teplota pohybuje od 60 do 70 °C po dobu přibližně 1 minuty. Doba musí být dostatečně dlouhá pro hybridizaci primerů s molekulou templátu i následnou extenzi DNA řetězce (Brown, 2007; <http://www3.appliedbiosystems.com>; Hue-Roye, Vege, 2008; Šmarda *et al.*, 2005).

Vzniklé amplikony se analyzují např. elektroforézou na agarózovém gelu, kde se oddělí fragmenty podle délky. Ty se vizualizují barvivy, jako je ethidium bromid, pod UV světlem. Po amplifikaci může navazovat analýza PCR produktů např. sekvenováním nebo se vzniklý produkt může například zaklonovat. PCR má širokou škálu využití a patří dnes mezi základní molekulárně-biologické techniky (Brown, 2007; Šmarda *et al.*, 2005).

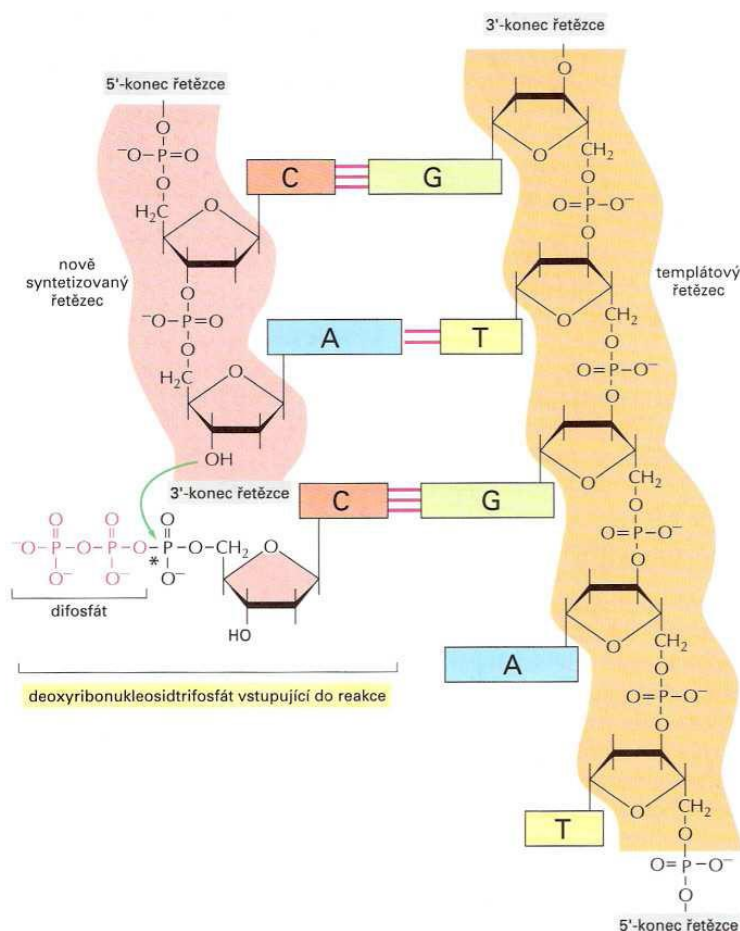
2.3. Chemické složení reakční směsi pro PCR

Reakční směs pro PCR vyžaduje určité komponenty. Koncentrace složek směsi musí být vyvážená, aby se tvořil požadovaný specifický produkt, reakce měla správný výtěžek a nedocházelo k chybám. Kromě oligonukleotidových primerů komplementárních k cílovému úseku DNA, termostabilní DNA polymerázy a templátové DNA se do reakce přidává pufr, který by měl zajišťovat vhodné prostředí pro optimální aktivitu a stabilitu DNA polymerázy. Existuje řada pufrů obdobného složení nabízených různými společnostmi. Může obsahovat Tris-HCl a KCl o různých koncentracích udržující optimální pH. Reakční směs také obsahuje 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP, N = Guanosin, Adenosin, Thymidin nebo Cytidin), které se stanou součástí nově syntetizovaných DNA řetězců. Dále jsou přítomny bivalentní kationty, využívá se především hořečnatý iont ve formě chloridu hořečnatého ($MgCl_2$) (Hue-Roye, Vege, 2008; <http://tools.invitrogen.com> 2. 2. 2012; <http://www3.appliedbiosystems.com>). Hořečnaté ionty ve směsi slouží jako kofaktor, který tvoří rozpustný komplex s dNTP rozpoznávaný DNA polymerázou. Jejich koncentraci je nutné upravovat u jednotlivých případů amplifikace, protože Mg^{2+} ionty tvoří kromě dNTP také komplexy s primery, templátovou DNA, EDTA a jinými chelatačními činidly, které se v reakční směsi

mohou vyskytovat, např. z důvodu nedostatečné purifikace DNA. EDTA je součástí pufrů rozpouštějící DNA, působí jako inhibitor nukleáz (Šmarda *et al.*, 2005).

2.4. Vlastnosti *Taq* DNA polymerázy

Replikace není bezchybný proces. Všechny DNA polymerázy, stejně jako *Taq* DNA polymeráza využívaná v PCR, občas do nově syntetizovaného vlákna integrují nesprávný nukleotid. Řada z nich tyto chyby dokáže opravit. Před zařazením nového nukleotidu do syntetizovaného řetězce DNA polymeráza zkontroluje, zda je daný nukleotid správně spárován. Pokud ano, pokračuje v přidávání nukleotidů na 3' konec rostoucího řetězce, tzn. že se vytváří fosfodiesterová vazba mezi 3' hydroxylovou skupinou stávajícího řetězce a 5' fosfátovou skupinou nukleotidu. Syntéza každého řetězce tedy probíhá ve směru 5'→3'. Schéma syntézy je zobrazeno na obrázku 2.



Obr. 2: Schéma syntézy DNA řetězce ve směru 5'→3'. 5' konec je tvořen fosfátovou skupinou nukleotidu a 3' konec hydroxylovou skupinou. Na 3' konec nově syntetizovaného řetězce jsou DNA polymerázou přidávány nukleotidy svým 5' koncem (Alberts *et al.*, 2005).

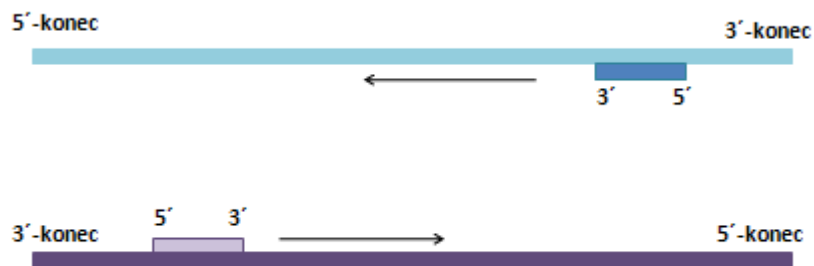
Pokud není zařazený správný nukleotid, řada DNA polymeráz má možnost ho sama odstranit rozštěpením fosfodiesterové vazby a nahradit jiným nukleotidem. DNA polymeráza tedy může disponovat dvěma vlastnostmi. Ve směru 5'→3' funkcí polymerační a ve směru 3'→5' exonukleázovou, tedy opravnou, aktivitou. *Taq* DNA polymeráza však tuto opravnou schopnost nemá. Řada DNA polymeráz má i 5'→3' exonukleázovou aktivitu, která je využívána např. u detekce produktu pomocí hydrolyzačních sond u real-time PCR (viz kapitola 3.2.2.2). Frekvence chyb *Taq* DNA polymerázy se odhaduje přibližně na 1 chybu na 9000 nukleotidů. Je třeba však mít na paměti, že každý cyklus PCR znásobuje počet chybně řazených nukleotidů. Pro řadu aplikací vysoký počet chyb neznamena závažný problém, protože vznik vyššího počtu molekul DNA se stejnou chybou je málo pravděpodobný. To ovšem neplatí, pokud jsou PCR produkty např. klonovány. Každý klon je totiž odvozen od jediné molekuly (Alberts *et al.*, 2005; Brown, 2007; Šmarda *et al.*, 2005).

Do praxe byly také zavedeny termostabilní DNA polymerázy, které mají 3'→5' exonukleázovou aktivitu. Byly izolovány z různých druhů pyrokoků, např. *Pfu* DNA polymeráza z *Pyrococcus furiosus*, hypertermofilního mikroorganismu s teplotním optimem 100 °C, nebo *Pwo* DNA polymeráza z *Pirococcus woesei*. Chybovost u těchto polymeráz je 2 – 6 krát nižší než u *Taq* DNA polymerázy. Problémem však zůstává, že 3' exonukleázová aktivita nejen napravuje způsobené chyby v párování, ale také často degraduje jednořetězcové primery. Ukázalo se výhodné používat tyto polymerázy v kombinaci s *Taq* DNA polymerázou pro amplifikaci dlouhých úseků DNA. Hlavní využití však mají při klonování a sekvenování, kde každá chyba v replikaci může znamenat chybné výsledky (Cline *et al.*, 1996; Šmarda *et al.*, 2005).

2.5. Design primerů

Pro PCR amplifikaci jsou klíčové primery. Jsou to uměle syntetizované oligonukleotidy, tedy krátké jednovláknové úseky DNA, které jsou komplementární k cílovému úseku DNA. Od 3' konce primerů započíná syntéza nového DNA řetězce. Pokud je známa sekvence templátového vlákna, lze navrhnout vhodné primery, které s ním budou hybridizovat. Správným navržením dojde k amplifikaci pouze požadovaného fragmentu DNA. Pokud se nepodaří navrhnout dostatečně specifické primery, dochází k amplifikaci jiného než požadovaného fragmentu

DNA, k amplifikaci několika fragmentů nebo k amplifikaci nedochází vůbec. Proto je velmi důležité, aby se primery specificky vázaly ke koncovým částem cílového úseku DNA. Každý primer nasedá na komplementární sekvenci jednoho řetězce denaturované DNA, jak je znázorněno na obrázku 3.



Obr. 3: Schéma nasedání primerů na komplementární sekvence jednovláknového templátu po denuraci DNA. Primery hybridizují na antiparalelních vláknech. Šipky znázorňují směr amplifikace řetězce DNA polymerázou, která ke 3' konci primeru přiřazuje volné dNTP.

Primer, který nasedá na kódující (pozitivní) vlákno DNA řetězce, se označuje jako forward nebo také upstream primer. Druhý primer nasedající na antikódující (negativní) vlákno se nazývá reverse nebo downstream primer. Klasické PCR metody umožňují amplifikovat fragmenty do 10 kilobází (kb), s délkou však klesá účinnost. Optimální velikost produktu je do 3 kb. Speciálními technikami lze amplifikovat i úseky do délky 40 kb (Brown, 2007).

Při návrhu primerů je třeba brát v úvahu několik pravidel. Délka by měla být nejlépe mezi 18 a 25 nukleotidy. Pokud by primery byly moc krátké, mohly by hybridizovat s jinými fragmenty než je cílový úsek DNA, protože tyto primery by nebyly dostatečně specifické. V genomu se předpokládá existence více vazebných míst. Např. pro 8 nukleotidový primer se v lidském genomu předpokládá v průměru 1 vazebné místo na 4^8 bp, tj. je asi 46000 možných vazebných míst. Je tedy nepravděpodobné, že by došlo ke vzniku pouze jedné specifické vazby. Délka 18 – 25 nukleotidů by měla být dostatečná k tvorbě jediného specifického produktu, ke speciálním účelům se však mohou navrhovat i delší primery (Brown, 2007; Šmarda *et al.*, 2005).

Dalším pravidlem je, že obsah guaninu a cytosinu (G + C) v primeru by se měl pohybovat mezi 40 a 60 %, a to z důvodu maximalizace specifické vazby k templátu. Primer by měl mít rovnoměrně rozložené oblasti bohaté na G/C a A/T

páry a neměl by obsahovat vnitřní sekundární struktury, např. vlásenky. T_m primerů by měla být podobná a mít alespoň 50 °C k zajištění nasedání obou primerů. Pro zajištění silnější vazby na klíčovém 3' konci primeru se někdy doporučuje, aby konec obsahoval 1 až 2 zbytky G nebo C. Oba primery by neměly mít vzájemně komplementární sekvence, aby spolu neinteragovaly a nedocházelo k tvorbě duplexů neboli primer-dimerů. Ty by v PCR reakční směsi mohly tvořit artefakty a nespecifické produkty. Pokud by primery tvořily stabilní dimery z důvodu i jen částečné komplementarity, jejich párování by převažovalo nad hybridizací s templátovou DNA. Buď by nedocházelo k PCR amplifikaci, nebo by probíhala s daleko nižší efektivitou. Primery také mohou tvořit vlásenky. To se stává v případě, kdy koncové oblasti téhož primeru jsou komplementární. Vyřazení jednoho z primerů opět znamená, že PCR proběhne s nižší efektivitou. K tvorbě primer-dimerů může přispívat i nesprávná annealing teplota či vysoká koncentrace primerů (Brown, 2007; Dahiya *et al.*, 1995; <http://biologie.upol.cz>; Šmarda *et al.*, 2005).

Pokud není známa přesná sekvence templátu, je možné navrhnout tzv. degenerate primery. Je to směs primerů, která má různé báze v jedné či několika nukleotidových pozicích. Využívají se např. pokud je známá pouze aminokyselinová sekvence, nikoliv nukleotidová, dále pro identifikaci nebo amplifikaci homologních genů odlišných druhů. Navrhují se i primery, které jsou schopny inkorporovat do PCR produktu mutaci (delece, inserce, jednonukleotidové záměny), tzv. mutagenesis primery. Navržené primery nesou ve své sekvenci mutaci, která je následně vnesena i do vznikajícího PCR produktu (Kwok *et al.*, 1994).

Pro návrh primerů existuje celá řada počítačových programů a webových stránek. Jedním z těchto programů je Primer3, využívající algoritmus pro design několika vhodných primerů pro požadované sekvence. Parametry jsou zadávány samotným uživatelem. K ověření, zda takovýto primer bude hybridizovat pouze na jednom místě DNA řetězce, slouží program zvaný BLAST. Ten porovnává zadané sekvence s databází všech sekvencí a určí sekvence podobné. Tyto dva kroky je možné spojit použitím webové stránky Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>; <http://simgene.com/Primer3>).

2.5.1. Primery využívající nukleotidové analogy

Nukleotidové analogy mají mnoho využití, nejen u PCR. Dochází u nich k modifikacím bází, sacharidové složky nebo fosfodiesterových vazeb. Jednou z nejpoužívanějších modifikací RNA nukleotidů je LNA (Locked Nucleic Acid). Tento analog má vyšší afinitu k DNA i RNA než standardní DNA oligonukleotid. Zvyšuje tak stabilitu syntetizovaných produktů. Tato modifikace nukleotidu se také využívá u real-time PCR. LNA dovoluje upravit hodnoty T_m primerů a sond, zvyšuje se tím senzitivita a specificita reakce (Karkare, Bhatnagar, 2006).

Jedním z významných analogů DNA nukleotidů používaných pro syntézu primerů a sond je uměle syntetizovaný PNA (Peptide Nucleic Acid). Na rozdíl od DNA a jiných nukleotidových DNA analogů, nemá PNA ve své struktuře pentózu ani fosfátové skupiny. Strukturně se PNA podobá peptidům, a to svým N' koncem tvořeným aminoskupinou (NH_3) a C' koncem tvořeným karboxylovou skupinou ($COOH$). Vazba mezi PNA a DNA je daleko silnější než mezi klasickými DNA řetězci. PNA je také odolný vůči nukleásám a proteásám, čímž činí primery a sondy odolné vůči degradaci (Karkare, Bhatnagar, 2006).

2.6. Faktory ovlivňující PCR

Proces PCR může být negativně ovlivněn mnoha způsoby. DNA polymeráza, která syntetizuje nová vlákna cílové DNA, katalyzuje i prodlužování nehybridizovaných primerů. Můžou tak vznikat nespecifické produkty, jako už zmíněné primer-dimery, a to především v případech, kdy je templátové DNA nedostatek. Nespecifickou amplifikaci je možné výrazně omezit použitím modifikace zvané Hot start PCR. Při tomto postupu mohou určité komponenty reakce být odděleny od ostatních do doby nasedání primerů ($55 - 65\text{ }^{\circ}C$) nebo může být DNA polymeráza inaktivována. Nedochozí tak k prodlužování primerů. Existuje celá řada způsobů separace důležitých složek. DNA polymeráza nebo Mg^{2+} ionty se mohou přidat až po dosažení teploty $70\text{ }^{\circ}C$ a více. Nebo se reakční složky rozdělí fyzikální bariérou, např. voskovou přepážkou, která při počáteční denaturaci roztaje. Další z možností je přidání teplotně nestabilních protilátek, které se navážou na DNA polymerázu, a tím jí dočasně inaktivují. Tato metoda je dnes převažující (Dahiya *et al.*, 1995; Šmarda *et al.*, 2005).

PCR je velmi citlivá metoda, takže i malé množství nežádoucí DNA může mít vliv na konečný výsledek. Často se k prevenci amplifikace kontaminující DNA z předešlých PCR reakcí využívá uracil-N-glykosyláza. V každé reakční směsi se dTTP (2'-deoxytymidin-5'-trifosfát) nahradí dUTP (2'-deoxyuridin-5'-trifosfát). Při PCR s novou templátovou DNA, ještě před zahájením amplifikace, kdy dTTP ještě není nahrazen dUTP, je použita uracil-N-glykosyláza k rozštěpení řetězců obsahujících dU, přičemž templátová DNA a volný dUTP zůstanou nezměněny. Při denaturačním kroku PCR pak je takto narušená a termolabilní DNA hydrolyzována na malé fragmenty, které se dále neamplifikují (Longo *et al.*, 1990; Šmarda *et al.*, 2005).

Ve vzorcích biologických materiálů se může vyskytovat i celá řada inhibitorů, které mohou zpomalit nebo úplně zastavit amplifikaci, a tím způsobit falešně negativní výsledky. Nedostatečná purifikace nukleových kyselin z biologických materiálů obsahující tyto inhibitory pak může přímo ovlivnit výsledky PCR. I přítomnost pouhých 0,004 % lidské krve v reakční směsi úplně inhibuje *Taq* DNA polymerázu. Hemoglobin, IgG a laktoferrin jsou nejsilnější inhibitory přítomné v krvi. Také deriváty hemoglobinu, jako bilirubin nebo žlučové soli, inhibují PCR. Mezi další inhibitory pak patří i komplexní polysacharidy, kolagen, melanin a myoglobin nebo močovina. Inhibici lze zmírnit naředěním vzorku vodou, případně použitím aditiv (facilitátorů), jak je popsáno níže. (Rådström *et al.*, 2004).

Občas se také do reakční směsi přidávají tzv. facilitátory, které zvyšují účinnost amplifikace. Patří k nim např. proteiny vyvazující inhibitory jako BSA (bovinní sérový albumin) a kapsidový protein gp32 produkovaný bakteriofágem T4 nebo organická rozpouštědla jako DMSO (dimetylsulfoxid) a formamid, které ovlivňují teplotní stabilitu primerů a aktivitu polymerázy, čímž zvyšují specifitu amplifikace. Někdy se *Taq* DNA polymeráza nahrazuje *Tth* a rekombinantní *Tth* DNA polymerázou z *Thermus thermophilus* nebo DNA polymerázu z *T. Brockianus*, a to z důvodu jejich větší odolnosti vůči inhibitorům reakce (Abu Al-Soud, Rådström, 2000; Rådström *et al.*, 2004).

2.7. Metody využívající princip PCR

Polymerázová řetězová reakce má mnoho variant, které mohou dále rozšiřovat možnosti jejího využití, ať už se jedná o amplifikaci velmi vzácně zastoupených

sekvencí, amplifikaci RNA nebo neznámých úseků, a mnohé další. Níže zmíněno je jen několik z široké řady modifikací a variant.

2.7.1. Reverse transcription PCR (RT-PCR)

RT-PCR využívá přepisu RNA do cDNA (komplementární DNA) prostřednictvím enzymu reverzní transkriptáza. RNA nemůže být použita jako templát pro PCR syntézu, proto je třeba ji nejprve převést na cDNA a až poté amplifikovat klasickým postupem. Použitím random hexamer primerů u reverzní transkripce se přepíše do cDNA kompletní obsah RNA, u oligo d(T)₁₈ (oligo deoxythimidin) primerů se přepíše mRNA a při použití genově specifických primerů se přepíše pouze požadované úseky RNA. Reverzní transkripce a PCR amplifikace mohou být reakčně odděleny, tzv. two-step RT-PCR nebo mohou probíhat v jedné zkumavce, tzv. one-step RT-PCR. (více v kapitole 3.3.) Pro one-step RT-PCR lze využít např. termostabilní *Tth* DNA polymerázu izolovanou z *Thermus thermophilus*. Vyznačuje se RNA dependentní DNA polymerázovou aktivitou. Ta je v přítomnosti iontů Mn²⁺, při teplotě 72 °C, schopná RNA převést na jednořetězcovou cDNA. Její RNázová aktivita pak degraduje RNA v hybridech DNA. Může pak dojít k nasedání primerů a syntéze druhého vlákna stejnou polymerázou. Po tomto procesu navazuje stejný postup jako u standardní PCR. RT-PCR se používá především ke studiu genové exprese, studiu virového genomu nebo např. k identifikaci intronů a exonů (Myers, Gelfand, 1991; Šmarda *et al.*, 2005).

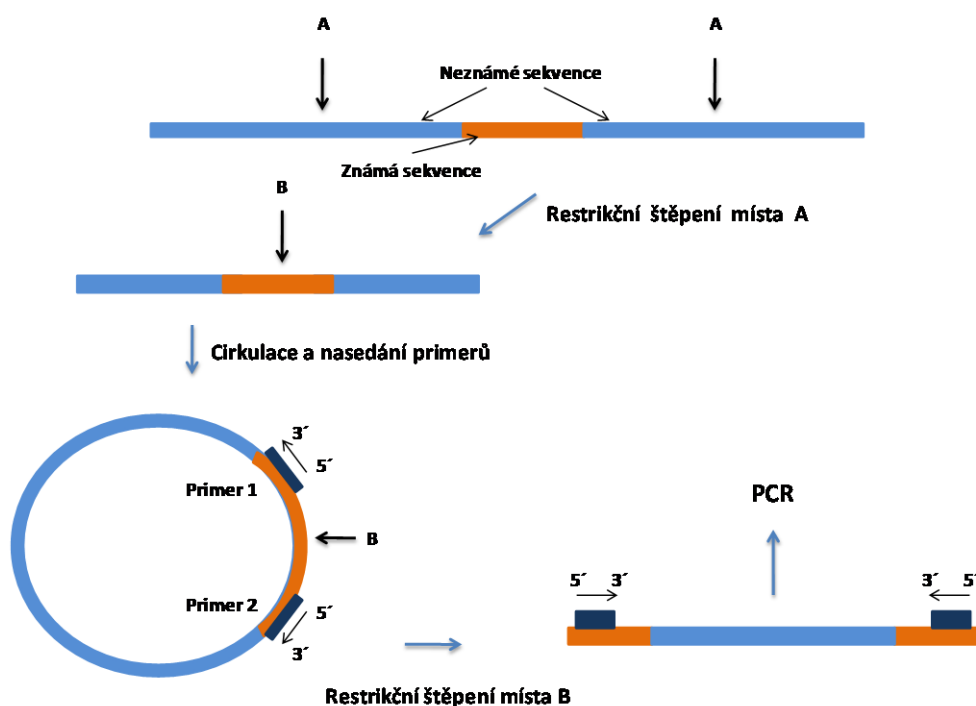
2.7.2. Nested PCR

Nested PCR, neboli odstupňovaná PCR, využívá modifikovaný postup. Je oproti klasické PCR daleko citlivější, umožňuje detekovat i jedinou templátovou molekulu DNA. Používá tzv. vnitřních a vnějších primerů ve dvou krocích. První zahrnuje 15-30 cyklů s vnějšími primery. Vzniklý produkt o delší sekvenci je převeden do nové zkumavky s vnitřními primery, případně naředěn, a následně amplifikován po dalších 15-30 cyklů. Tento postup se označuje jako dvoufázová nested PCR. Ta umožňuje zředění inhibitorů, které se standardní izolací nedaří odstranit. Je zde však vyšší citlivost na kontaminaci vzniklým produktem, a proto se v rutinní diagnostice často využívá tzv. single-tube nested PCR. Složky reakcí mohou být odděleny např. přepážkou z minerálního oleje. Po centrifugaci se přepážka odstraní a obsah se znovu amplifikuje. Častější však je použití vnějších a vnitřních primerů s velmi odlišnou T_m. Konečným výsledkem je kratší vnitřní sekvence

cílové DNA. Nested PCR je často úspěšnější při specifické amplifikaci dlouhých DNA produktů než klasická PCR (Šmarda *et al.*, 2005; Yourno, 1992).

2.7.3. Inverzní PCR

Jednou ze speciálních PCR technik je inverzní PCR, založena na amplifikaci neznámého úseku DNA, který je na obou koncích ohraničen úseky o známých sekvencích. Princip je znázorněn na obrázku 4. Inverzní PCR se využívá hlavně v případech, kdy je třeba určit sekvence obklopující genomický insert (Ochman *at al.*, 1995).



Obr. 4: Princip inverzní PCR. Dochází ke štěpení míst o neznámých sekvencích (A) restrikčními endonukleázami, cirkulaci fragmentů, ligaci a nasedání primerů. Dále je štěpeno místo o známé sekvenci (B) mezi primery, fragmenty se linearizují a neznámé sekvence se amplifikují klasickým postupem (Ochman *at al.*, 1995).

2.7.4. Další metody využívající princip PCR

Existuje velké množství dalších modifikací a variant PCR, které mají využití nejen v základním a aplikovaném výzkumu. Již zmíněná degenerate PCR (např. k identifikaci nebo amplifikaci homologních genů odlišných druhů, viz kapitola 2.5.), multiplex PCR (k amplifikaci více různých produktů různými páry primerů) či *in situ* PCR neboli PRINS (k lokalizaci určitých sekvencí uvnitř jednotlivých buněk

s využitím *in situ* hybridizace). Další z mnoha variant je alelově specifická PCR (k detekci SNP ve dvou nebo více reakcích za použití primerů pro wild-type a mutantní sekvenci) nebo např. asymetrická PCR (amplifikace za využití mnohonásobně vyšší koncentrace jednoho z primerů, při které vzniká převážně jeden řetězec, což se využívá např. pro Sangerovo sekvenování). Jednou z velmi využívaných technik je PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) pro stanovení sekvenčního polymorfizmu požadovaného genu za využití restričních endonukleáz (Birmingham, Luettich, 2003).

2.7.5. Next generation PCR

Next generation PCR využívá nové přístupy k PCR amplifikaci i následné detekci produktů. Příkladem je digital PCR, poprvé popsána Sykesem *et al.* v roce 1992, dnes již mnohokrát modernizovaná. Principem je rozdělení a nařazení vzorku tak, aby teoreticky obsahoval přibližně jednu molekulu DNA. Vzorek je poté amplifikován v mnoha replikátech. K detekci produktů se využívají sondy, určuje se zde pouze přítomnost či nepřítomnost amplifikace (signál pozitivní označen jako 1, signál negativní jako 0; odtud název digital PCR), což je následně kvantitativně zhodnoceno. Slouží převážně k detekci a kvantifikaci mutací, které jsou ve vzorku zastoupeny s velmi nízkou frekvencí (Pohl, Shih, 2004; Sykes *et al.*, 1992).

Zajímavou variantou je i CAST-PCR neboli Comparative Allele Specific TaqMan PCR. Umožňuje detekci 0,1 % mutantních alel z wild-type sekvencí. Principem je potlačení nespecifické amplifikace wild-type alely tzv. MGB (minor groove binder) blokátorem. Při použití modifikovaného alelově specifického primeru je následně detekována mutantní alela s vysokou citlivostí (<http://www.appliedbiosystems.com>).

3. Real-time PCR

Higuchi *et al.* v roce 1992 zkonstruovali detekční systém, který monitoroval PCR produkty v průběhu jejich amplifikace. Je to modifikace klasické PCR zvaná real-time PCR (rtPCR). Ke sledování využili dnes pro rtPCR téměř nepoužívané fluorescenční barvivo ethidium bromid, které se preferenčně váže na dvoušroubovici produktu. Se zvyšujícím se množstvím produktu pak docházelo ke zvyšování fluorescence. V reálném čase je tedy možné pozorovat nárůst fluorescenčního signálu v každém cyklu amplifikace. Lze tak získat mimo jiné i kvantitativní informaci o produktu na rozdíl od klasické PCR, kde se určuje převážně přítomnost nebo absence specifického produktu gelovou elektroforézou. Za použití elektroforézy sice je možné provádět i částečnou kvantifikaci, což bylo dříve běžné, ale tato technika je značně nepřesná. Real-time PCR má mnoho aplikací. Kvantitativní detekce se využívá např. ke studiu genové exprese nebo lze hodnotit fluorescenci rtPCR produktů až po ukončení amplifikace (jako tomu je u standardní PCR) např. pro genotypizaci (viz kapitola 4.) (Kaltenboeck, Wang, 2005).

Předchůdcem kvantitativní RT-PCR byl Northern blotting, poprvé použitý v roce 1977. I dnes se často využívá ke studiu degradace RNA a délky transkriptu (VanGuilder *et al.*, 2008).

3.1. Rozdíl ve složení reakční směsi oproti standardní PCR

Základní složení reakční směsi pro rtPCR se od klasické PCR výrazně neliší. Společnými složkami jsou termostabilní DNA polymeráza, nukleotidy (dNTP), oligonukleotidové primery, hořčičnaté ionty, templátová DNA a případně i uracil-N-glykosyláza a facilitátory. Reakční směs pro rtPCR navíc obsahuje dsDNA interkalační barviva, fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy nebo fluorescenčně značené primery pro detekci narůstajícího množství PCR produktu v každém cyklu amplifikace. Využívají se také nukleotidové analogy, jako už zmíněné LNA a PNA, které mohou být použity v primerech nebo např. duálně značených sondách (Kaltenboeck, Wang, 2005).

Protože design sond je často náročný proces, je v současné době na trhu k dispozici množství prevalidovaných, testovaných, expresních assayí, které

umožňují amplifikaci (primery) a detekci (sondy) víceméně každého lidského genu a genů řady modelových organismů. Je možné využít prevalidované assaye pro genotypizaci nebo dokonce předpipetované destičky pro vybrané geny, což významně usnadňuje a urychluje analýzu (www.allgenes.com).

3.2. Způsoby detekce signálu

Existuje několik způsobů, jak zaznamenat nárůst množství PCR produktu v jednotlivých cyklech amplifikace. Nejjednodušší je použití fluorescenčních barviv, která se váží na dsDNA, tzv. interkalační barviva. Detekce signálu však není v tomto případě specifická. Další možností je využití fluorescenčně značených oligonukleotidových sond, které specificky hybridizují s jednovláknovou DNA a různými mechanismy dochází k emisi jejich fluorescence. Detekovaná fluorescence je přímo úměrná množství templátu. Použití fluorescenčně značených sond umožňuje vyšší specifitu detekce. Využívá se také fluorescenčně značených primerů.

3.2.1. dsDNA interkalační barviva

Interkalační barviva jsou nespecifická vůči nukleotidové sekvenci, váží se tedy na jakékoliv místo v DNA dvoušroubovici, což v přítomnosti primer-dimerů a jiných nespecifických produktů může vést k nepřesným výsledkům. Prvním interkalačním barvivem použitým pro rtPCR byl ethidium bromid (EtBr), který vydává fluorescenci po navázání na dsDNA. Z důvodu jeho mutagenních účinků a malé senzitivity se však dnes již nepoužívá. Ve vyšších koncentracích se sice senzitivita EtBr zvyšuje, ale tyto koncentrace inhibují PCR reakci. Nejpoužívanější a nejznámější je SYBR Green I, který je více než 100 x citlivější než EtBr. Známá jsou také barviva BEBO, YO-PRO-1, YOYO-1 či TOTO. (Kaltenboeck, Wang, 2005).

SYBR Green I je asymetrické kyaninové barvivo. Má dva pozitivní náboje, a právě díky nim má SYBR Green I velkou afinitu k dsDNA, která je negativně nabitá. Váže se na malý žlábek dsDNA produktu. Tato barviva se označují jako MGB (minor groove binder) (Zipper *et al.*, 2004).

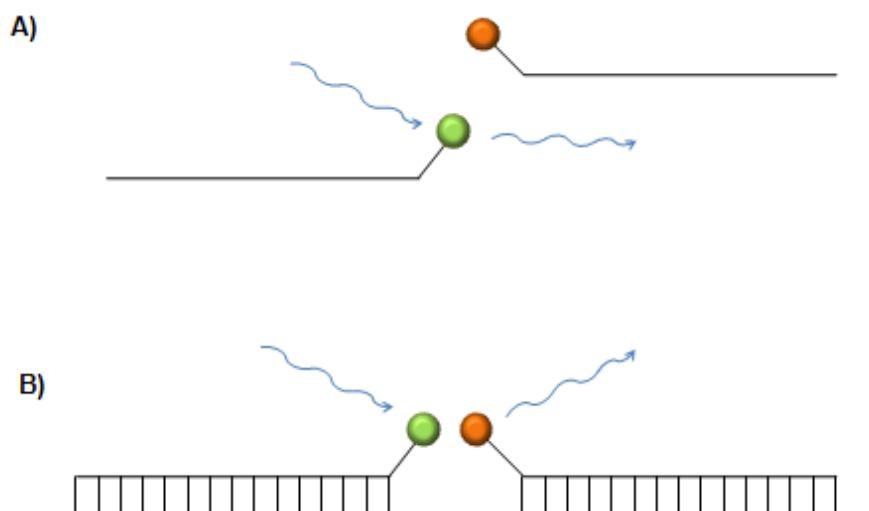
K HRM (High Resolution Melting) analýzám se využívají tzv. HRM barviva (viz kapitola 4.3.), u kterých se vyžaduje vyšší rozlišení (<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>).

3.2.2. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) neboli fluorescenční rezonanční přenos energie je princip, na kterém funguje většina sond používaných pro real-time PCR. Tyto sondy jsou opatřeny dvěma typy fluorescenčních značek – reportérem a zhášedčem (quencher). Zhášedč pohlcuje excitovanou energii specifické vlnové délky v blízkosti reportéru, který pak není schopen emitovat fluorescenci. Pokud se zhášedč od reportéru dostatečně vzdálí, emise může probíhat. Aby však mohlo k FRET jevu docházet, nesmí být vzdálenost mezi fluorescenčními značkami větší než 100 Å (1 Ångström = 0,1 nm), emisní spektrum zhášedče se musí překrývat s excitačním (absorpčním) spektrem reportéru a musí mít stejné dipólové momenty. Dvojice fluoroforů se většinou vyskytují společně na duálně značených sondách. Výjimkou jsou FRET sondy, viz níže (Didenko, 2001).

3.2.2.1 FRET sondy

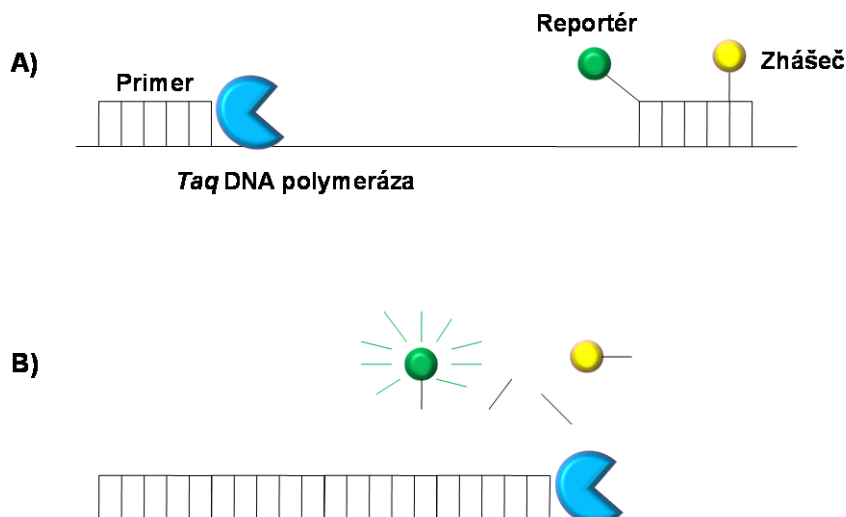
FRET sondy nebo také sousedící sondy jsou speciálním podtypem sond, které pracují na FRET principu. Jsou designovány tak, aby hybridizovaly vedle sebe na sousedící nukleotidové sekvence, nejčastěji oddělené dvoubázovou mezerou. První sonda bývá na 3' konci značena fluoresceinem nebo fluoroforem s excitačním maximem okolo 480 nm, zvaným donor. Druhá sonda je značena některým z mnoha barviv s vyšším excitačním a emisním maximem, jako kyaninová barviva Cy3 nebo TAMRA. Tato sonda je označována jako akceptor. Musí být na 3' konci blokována, aby nedocházelo k prodlužování sondy DNA polymerázou během PCR reakce. Pokud jsou sondy volně v roztoku, fluorescein donorové sondy emituje zelené záření o vlnové délce 480 nm. Po hybridizaci obou sond s DNA řetězcem donor přenese energii na akceptor, který emituje fluorescenční záření o vyšší vlnové délce. Při annealing kroku tedy dochází k nárůstu fluorescence o vyšší vlnové délce. FRET sondy nejsou degradovány na rozdíl od hydrolyzačních sond (viz další kapitola) a jejich fluorescence je reverzibilní. Princip je zobrazen na obrázku 5 (Kaltenboeck, Wang, 2005).



Obr. 5: Schéma principu FRET sond. A) Volně v roztoku emituje sonda s donorovou molekulou fluoresceinu záření o nižší vlnové délce. B) Po hybridizaci sond s cílovými sekvencemi DNA řetězce donor přenáší energii na akceptor druhé sondy, ta emituje záření o vyšší vlnové délce.

3.2.2.2 Hydrolyzační oligonukleotidové sondy (TaqMan sondy)

TaqMan sondy jsou oligonukleotidy, které mají na 3' konci zhášec a na 5' konci reportér. Využívají 5'→3' exonukleázové aktivity *Taq* DNA polymerázy. TaqMan sondy původně nevyužívaly principu FRET, ale byly založeny na radioaktivním značení. Sonda se váže na sekvenci mezi oběma primery. Zhášec v bezprostřední blízkosti reportéru téměř úplně redukuje jeho fluorescenci. Během amplifikace *Taq* DNA polymeráza přiřazuje volné dNTP od primeru směrem k navázané sondě, kterou od 5' konce štěpí (odtud název hydrolyzační sondy), čímž dojde k přerušení vlivu zhášec na reportér, který následně emituje fluorescenci. Princip je znázorněn na obrázku 6. Výhodou těchto sond je, že k fluorescenci dochází pouze po hybridizaci na specifické místo uvnitř plánovaného amplikonu, a proto případná tvorba primer-dimerů a jiných nescifických produktů neovlivňuje výsledné hodnoty. TaqMan sondy mohou být značeny různými barvivy, a proto je možné detekovat amplifikaci různých produktů v jedné PCR reakci (multiplex PCR) (Didenko, 2001; <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>).

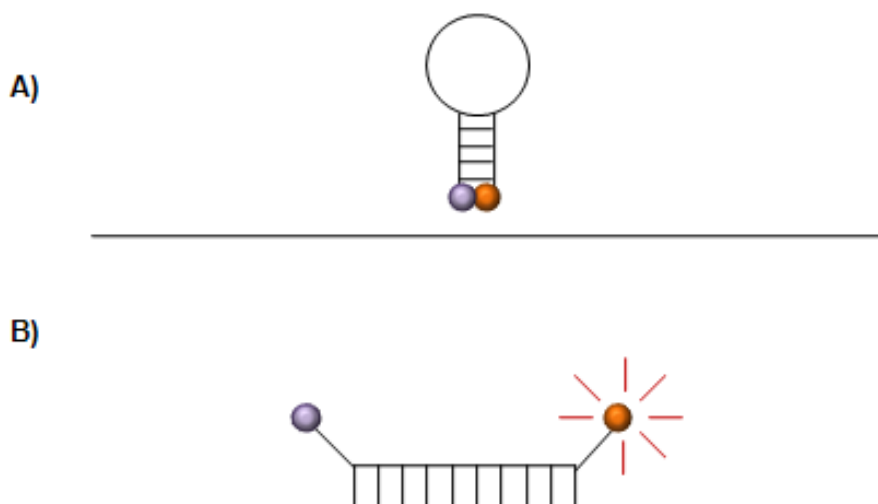


Obr. 6: Schéma principu TaqMan sond. A) Sonda je navázána na cílové sekvenci DNA řetězce. Zhášeč potlačuje fluorescenci reportéru. B) *Taq* DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec, svou 5'→3' exonukleázovou aktivitou štěpí sondu, reportér se dostává z vlivu zhášeče a emituje fluorescenci.

3.2.2.3 Molecular beacons neboli molekulární majáky

Molecular beacons, či jinak řečeno molekulární majáky, jsou sondy, které vytváří tzv. vlásenku se smyčkou. Vlásenka je tvořena vzájemně komplementárními řetězci, smyčka je komplementární s cílovými sekvencemi. Sonda je značená na 5' konci reportérem a na 3' konci zhášečem jako je tomu u ostatních sond. Po navázání na DNA prodělávají sondy strukturální změnu. V původní konformaci zhášeč v bezprostřední blízkosti reportéru absorbuje jeho emitovanou energii a k emisi fluorescence tak nedochází. Po hybridizaci s cílovou molekulou DNA, v annealing kroku PCR reakce, se reportér dostává z dosahu zhášeče a emituje fluorescenci. Princip je zobrazen na obrázku 7 (<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>).

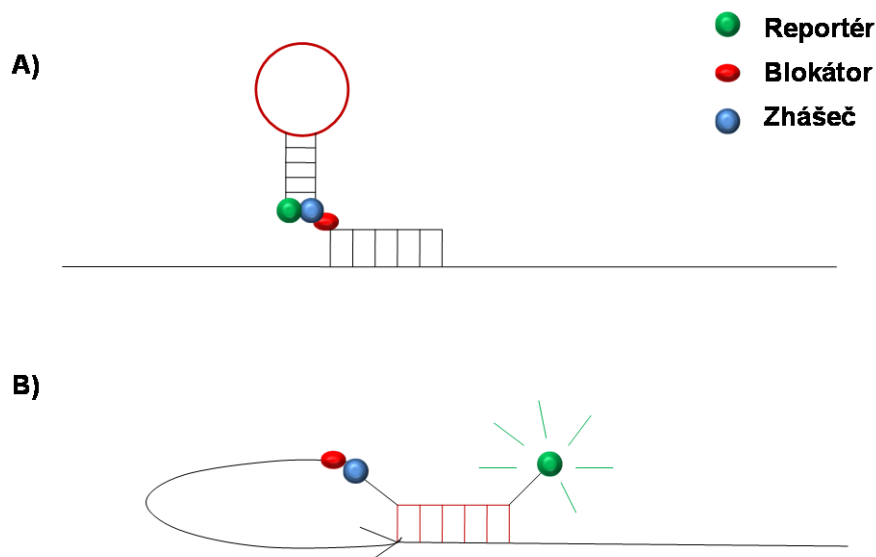
Molekulární majáky mohou, ale nemusí využívat principu FRET. Např. při použití DABCYL u jako zhášeče a EDANS jako fluoroforu se nevyužívá fluorescenčního rezonančního přenosu energie. EDANS emituje fluorescenci po ozáření UV světlem, kdežto DABCYL je nefluorescentní chromofor, který rozptyluje energii pohlcenou EDANS. V jejich dostatečné vzdálenosti pak dochází k emisi fluorescence. Molecular beacons se stejně jako TaqMan sondy využívají v multiplex PCR (Tyagi, Kramer, 1996).



Obr. 7: Schéma principu molecular beacons. A) Sonda je tvořena vlásenkou se smyčkou komplementární s cílovou sekvencí DNA řetězce, značená na obou koncích zhášedčem a reportérem. Zhášedč absorbuje fluorescenci reportéru. B) Po hybridizaci sondy se reportér dostává z vlivu zhášedče a dochází k emisi fluorescence.

3.2.2.4 Scorpion primery

Scorpion primery jsou podobné molekulárním majákům. Také tvoří smyčku a vlásenku s reportérem na 5' konci a zhášedčem na 3' konci, na rozdíl do molecular beacons jsou však spojeny s primerem. K 5' konci primeru je smyčka 3' koncem připojena nejčastěji tzv. HEG (hexethylene glycol) blokátorem, který zabraňuje extenzi řetězce od tohoto místa k 5' konci smyčky. Po prvním cyklu během extenze primeru DNA polymerázou smyčka hybridizuje s komplementární sekvencí řetězce, na kterém se nachází, dochází k uvolnění vlivu zhášedče na reportér a k emisi fluorescence. Případné primer-dimery tak netvoří fluorescenční signál. Princip je zobrazen na obrázku 8. Pokud se emisní a excitační spektra zhášedče a reportéru překrývají, dochází k fluorescenčnímu rezonančnímu přenosu energie. Podmínkou to ale není. Na trhu jsou dostupné i duplex Scorpion primery, které neobsahují smyčku, ale dvě oddělené molekuly. Molekula s navázaným reportérem hybridizuje s DNA řetězcem a molekula se zhášedčem se odděluje (<http://www.molecular-beacons.org>; Whitcombe *et al.*, 1999).



Obr. 8: Schéma principu Scorpion primerů. A) Scorpion primer v prvním cyklu amplifikace nasedá na templátovou DNA, dochází k extenzi řetězce. B) V dalším cyklu amplifikace v denaturačním kroku dochází k rozvolnění smyčky a po ochlazení její komplementární sekvence s DNA řetězcem hybridizují. Dochází k emisi fluorescence.

V porovnání s molecular beacons a TaqMan sondami dávají Scorpion primery silnější signál a působí rychleji. Enzymatické štěpení není nutné, což redukuje čas oproti TaqMan sondám. Design Scorpion primerů je však poměrně komplikovaný, proto se využívají především v komerčních kitech (Thelwell *et al.*, 2000).

3.2.3. Light-up sondy

Light-up sondy se skládají z nukleotidového analogu PNA, na který je navázané asymetrické kyaninové barvivo, např thiazol orange (TO). Po vazbě na cílovou ssDNA dochází k výraznému zvýšení emise fluorescence. Light-up sondy se mohou používat k real-time monitorování i end-point detekci (po ukončení PCR). Nedochází k jejich degradaci jako u TaqMan sond, ani ke konformačním změnám jako u molecular beacons. Protože jsou light-up sondy založeny na PNA, jejich vazba je daleko silnější a probíhá rychleji než u ostatních oligonukleotidových sond (Svanvik *et al.*, 2000).

3.2.4. LUX primery a další

LUX (Light Upon eXtension) primery jsou oligonukleotidy tvořící smyčku, které jsou značené fluoroforem na 3' konci. Díky této konformaci je fluorescence inaktivována. Po denaturačním kroku dochází k linearizaci LUX primeru a

v annealing kroku k hybridizaci s templátovou DNA. Během extenze po prodloužení primeru dochází k emisi fluorescence dsDNA produktu. Pokud produkt denaturuje nebo se LUX primer vyskytuje v jednořetězcové formě, intenzita fluorescence klesá. Výhodou těchto primerů je jejich nízká cena oproti duálně značeným sondám. Dokážou detekovat 10 a méně kopií templátové DNA, jsou vhodné pro multiplex PCR a pro analýzy křivek tání (viz kapitola 4.2.) (<http://tools.invitrogen.com>, 8. 2. 2012).

Je celá řada sond a primerů, které pracující či mohou pracovat na FRET principu. Často se od sebe svými mechanismy výrazně neliší. Dalším příkladem jsou Amplifluor primery, Sunrise primery, Qual sondy a mnoho jiných (<http://www.molecular-beacons.org>).

3.2.5. Universal ProbeLibrary Systém (UPL systém)

UPL systém původně vyvinutý firmou Exiqon je tvořen 165 sondami, které obsahují LNA nukleotidy. Díky obsahu LNA mohou být hydrolyzační sondy velmi krátké (8 až 9 nukleotidů) při zachování potřebné T_m . Jsou značeny na 5' konci fluoresceinem (FAM) a na 3' konci zhášedčem. Díky redukované délce a výběru nejvíce prevalentních sekvencí (klasické sondy jsou tvořeny obvykle 25-30 nukleotidy) se každá sonda váže přibližně na 7000 transkriptů, přičemž každý transkript je detekován průměrně asi 16 sondami. Volně dostupný software ProbeFinder pak navrhne specifickou kombinaci primerů a sondy pro požadovanou sekvenci. Primery je nutné nově nasyntetizovat, ale sondy mohou být předpřipravené i přímo na pracovišti, což výrazně urychluje a zlevňuje návrh většího počtu real-time assayí. UPL systém pokrývá lidský genom z asi 99 %, díky své univerzálnosti mají podobně vysoká pokrytí i další modelové a jinak významné organismy a použití u jiných je omezeno pouze výskytem sekvencí komplementárních k sondám (<http://www.exiqon.com/universal-probe-library>).

3.2.6. Přístroje pro real-time PCR

Na světovém trhu je velká škála výrobců zaměřených na real-time PCR přístroje, tzv. cyclery. Mezi nejvýznamnější firmy v tomto oboru patří Life Technologies (dříve Applied Biosystems) s řadou modelů a Roche s LightCyclery, dále např. Stratagene (modely Mx), Cepheid (SmartCycler), Corbett (Rotor-Gene), Eppendorf (Mastercycler ep realplex) či BioRad (Opticon atd.) (<http://www.horizonpress.com>).

Cyclery spojují vlastnosti klasického thermocycleru pro PCR amplifikaci požadovaného templátu a fluorimetru pro zaznamenávání nárůstu produktů během každého cyklu reakce. Součástí každého cycleru je excitační lamp a fluorescenční filtr, který propouští záření o vlnové délce typické pro určité fluorescenční barvivo. Většina modelů má k dispozici filtrů několik, např. filtr pro SYBR Green I/FAM, HEX/VIC, Cy5 barviva a další. Existují dva hlavní způsoby, jak kontrolovat teplotu: tradiční heat block založený na Peltier článku a ohřev vzduchem. Za zmínku stojí i méně známá nezávislá elektronická kontrola teploty pro každou individuální reakční jamku, čehož využívá jen malá část z komerčně dostupných cyclerů. Nevýhodou heat blocků je jejich sklon k nerovnoměrné distribuci požadované teploty, zejména v okrajových částech. Modely cyclerů s ohřevem vzduchu a s elektronickou kontrolou teploty tímto problémem netrpí. Využívají nižší reakční objem, disponují rychlým tepelným přechodem a rychlým ustálením teploty. Tím dochází ke zvýšení specifity PCR a ke zkrácení doby jednotlivých cyklů. Nevýhodou vzduchem ohřivaných cyclerů je nutnost používat speciální reakční zkumavky – tenké kapiláry, v nichž dochází k efektivnímu přenosu tepla ze vzduchové komory. Manipulace s těmito kapilárami je ovšem komplikovanější, než s klasickými PCR zkumavkami (<http://www.horizonpress.com>; Kaltenboeck, Wang, 2005; Zuna *et al.*, 2002).

3.3. One-step a Two-step real-time RT-PCR

Real-time PCR se stala velmi rozšířenou metodou k analýze genové exprese. Nutným krokem je reverzní transkripce mRNA na cDNA, která může probíhat v jedné zkumavce společně s amplifikací DNA, tj. one-step real-time RT-PCR, nebo ve dvou zkumavkách odděleně, tzv. two-step real time RT-PCR. Každá metoda má své výhody a nevýhody a každá je vhodnější pro jinou aplikaci (<http://www.bioline.com>).

Z hlediska rychlosti a jednoduchosti je výhodnější one-step real-time RT-PCR, protože snížením počtu kroků se také snižuje množství kontaminace a chyb při pipetování. Nevýhodou je, že dochází ke znehodnocení cDNA, kterou pak není možné uchovat pro další pokusy. U toho postupu lze použít pouze specifické primery vázající se na požadovaný transkript. Tabulka I znázorňuje výhody a nevýhody one-step real-time RT-PCR v porovnání s two-step real-time RT-PCR. Two-step real-time RT-PCR je vysoce senzitivní, ale má časově náročnější

postup. Teoreticky má vyšší účinnost, protože je možné využít 3 typy primerů - random primery, oligo d(T)₁₈ a genově specifické primery. Při zvolení tohoto postupu je možné uchovat cDNA pro další reakce, ale existuje vyšší riziko kontaminace a je nutná lepší optimalizace reakce (<http://www.bioline.com>).

Tab. I: Porovnání one-step a two-step real-time RT-PCR (<http://www.bioline.com>).

	One-step real-time RT-PCR	Two-step real-time RT-PCR
Popis	RT a real-time PCR amplifikace v jedné zkumavce	RT a real-time PCR amplifikace ve dvou zkumavkách
Výhody	<ul style="list-style-type: none"> • Jednoduché a rychlé • Méně pipetování, tzn. nižší možnost chyb a kontaminace • Menší potřeba optimalizace 	<ul style="list-style-type: none"> • Vysoce senzitivní • Možnost uchovat cDNA pro další pokusy • Vyšší účinnost díky možnosti použít náhodné primery a oligo d(T)₁₈
Nevýhody	<ul style="list-style-type: none"> • Obvykle méně senzitivní • Znehodnocení cDNA • Možnost užití jen specifické primery 	<ul style="list-style-type: none"> • Časově náročnější • Vyšší možnost kontaminace • Lepší potřeba optimalizace

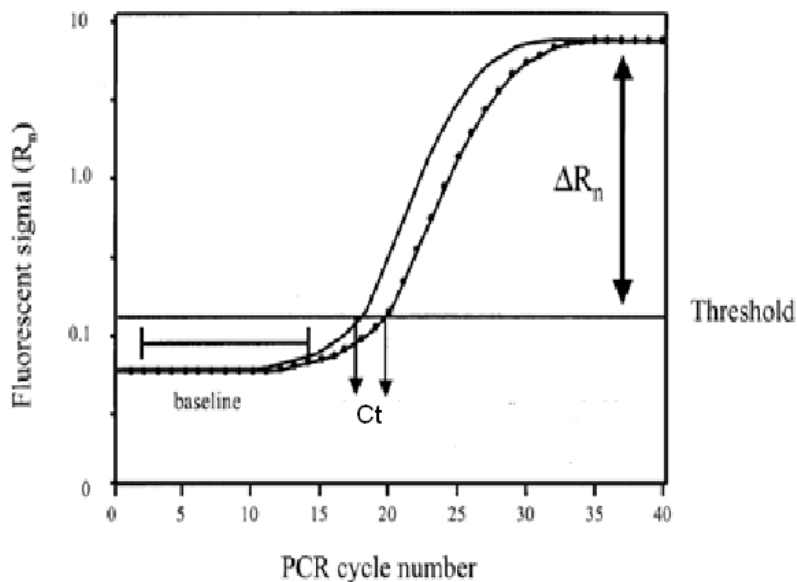
3.4. Multiplex real-time PCR

Multiplex PCR je metoda, u které dochází k amplifikaci více než jedné cílové sekvence DNA v rámci jediné reakce. Pro multiplex real-time PCR jsou využívány různé způsoby detekce jednotlivých produktů amplifikace, kterými jsou duálně značené sondy, jako Taqman či molekulární majáky, nebo např. Lux primery značené jedním fluorescenčním barvivem. Každý signál je zvlášť propouštěn odpovídajícím filtrem, čímž se jednoznačně rozliší jednotlivé produkty. Tato metoda je využívána například pro současnou amplifikaci referenčního a sledovaného genu při relativní kvantifikaci (viz kapitola 4.1.2) (Wittwer *et al.*, 2001).

4. Využití real-time PCR

4.1. Kvantifikace

Kvantifikace je dnes hlavním využitím real-time PCR. Provádí se matematickou analýzou amplifikačních křivek. Amplifikační křivka má sigmoidní tvar a lze ji rozdělit na několik částí: „background“ fázi, kde je cílové sekvence amplifikováno příliš málo pro měřitelnou detekci fluorescence, i zde je však předpokládán exponenciální nárůst produktu; exponenciální fázi, kdy množství signálu, tedy i amplifikovaného produktu, exponenciálně roste; lineární fázi, kdy množství produktu stoupá už pouze lineárně; plató fázi, kdy dochází k vyčerpání komponent a dále nedochází ke zvyšování množství produktu, ani ke zvyšování fluorescence (<http://www.generi-biotech.com>). Amplifikační křivka je znázorněna na obrázku 9. Práh detekce fluorescenčního signálu, neboli threshold, je znázorňován horizontální přímkou. V místě průtnutí přímkou s amplifikační křivkou je definováno Ct (threshold cycle). Je to číslo cyklu, ve kterém byl překročen limit detekce (Ginzinger, 2002).



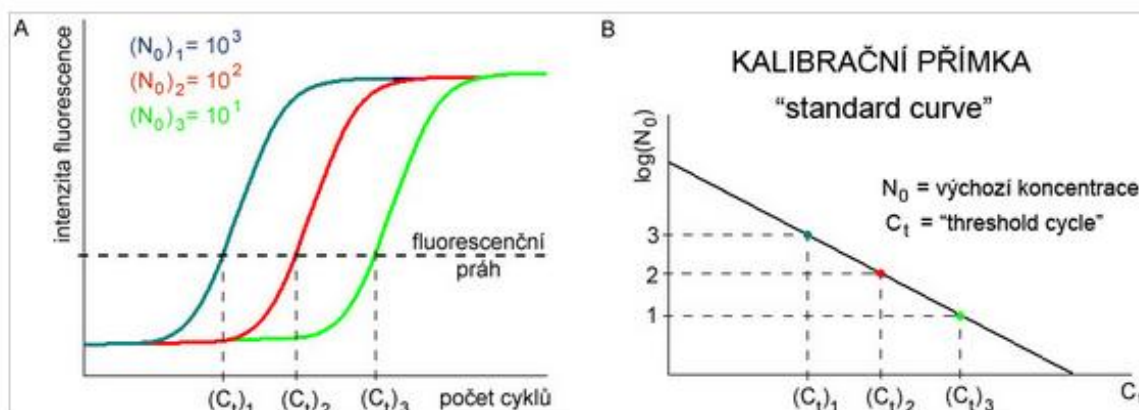
Obr. 9: Amplifikační křivka. Baseline („background“) - PCR cykly, kdy dochází k akumulaci signálu, ale ten je neustále pod měřitelnou hodnotou. Threshold - práh detekce fluorescence, v místě průtnutí s křivkou je definováno Ct. Ct (threshold cycle) - číslo cyklu, ve kterém fluorescence překročí limit detekce. R_n – fluorescenční signál. ΔR_n – rozdíl R_n vzorku a negativní kontroly nebo pozadí (Ginzinger, 2002).

Obecný vzorec pro výpočet počátečního množství molekul je $N_c = N_0 E^C$, kde N_c je počet amplifikovaných molekul po C cyklech, N_0 výchozí počet molekul, E efektivita a C počet cyklů. Efektivita je teoreticky stoprocentní (2 kopie v každém cyklu), ale reálně bývá nižší. Efektivita pro každou sadu primerů (a sond) se vypočítá ze směrnice přímky ředící (kalibrační) řady, a to podle vzorce $E = 10^{-1/\text{směrnice}}$ (Karlen *et al.*, 2007). Pokud tímto způsobem vychází efektivita vyšší než 100% (v tomto případě 100% = 2), dochází u neřaděných vzorků kalibrační řady k mírné inhibici (Suslov, Steindler, 2005).

Existuje několik způsobů vyhodnocení C_t pro kvantifikaci. Výpočet C_t hodnoty může být proveden manuální metodou, kdy se určí C_t proložením amplifikační křivky regresní přímkou. V místě překřížení regresní přímky s prahem (threshold) se poté nachází hodnota C_t . Některé přístroje mají tuto metodu částečně automatizovanou. Dalším způsobem je určení maxima druhé derivace, kdy se C_t určuje jako bod, kde dochází k strmému stoupání amplifikační křivky vzorku. Tento bod odpovídá maximu druhé derivace křivky. Výhodou této metody je plná automatizace a přesnější stanovení C_t individuálně pro každou křivku (<http://www.roche-applied-science.com>).

4.1.1. Absolutní kvantifikace

Při absolutní kvantifikaci se přímo stanovuje výchozí počet molekul DNA templátu v porovnání se standardy o známé koncentraci. Relativní kvantifikace pouze určuje relativní poměr počtu molekul vůči kontrole, nedeterminuje přesný počet molekul templátu jako absolutní kvantifikace. Z kalibrační křivky standardů lze po porovnání hodnot C_t odečíst koncentraci neznámého vzorku. Princip je zobrazen na obrázku 10. Absolutní kvantifikace se často využívá ve virologii či mikrobiologii, a to např. k determinaci výchozího počtu kopií cílových mikroorganismů (<http://www.generi-biotech.com>).



Obr. 10: Absolutní kvantifikace. A) Amplifikační křivky tří vzorků o různém počátečním množství $(N_0)_{1-3}$. B) Kalibrační křivka standardů o známé koncentraci (<http://www.generi-biotech.com>).

4.1.2. Relativní kvantifikace

Pro určení míry genové exprese se zpravidla používá relativní kvantifikace. Zjišťují se změny v množství mRNA testovaného genu v porovnání s kontrolou (kalibrátor). C_t amplifikační křivky cílového genu je pak normalizováno k C_t referenčního genu. Referenční gen, často tzv. housekeeping gen, by měl mít stálou úroveň genové exprese ve všech typech pozorovaných vzorků. Proto nevyžaduje kalibrační křivku jako u absolutní kvantifikace. Používá se zejména v případech, kdy je dostačující vyjádření v podobě poměrů nebo např. k ověřování trendů. Pro výpočet relativní kvantifikace slouží např. komparativní metoda delta-delta ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) bez korekce efektivity a metoda dle Pfaffla s korekcí efektivity (Livak, Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

Metoda delta-delta předpokládá, že cílový a referenční gen jsou amplifikovány se stejnou či podobnou efektivitou, blízkou 100 %. Nejdříve je potřeba normalizovat C_t testovaného genu ke genu referenčnímu, což platí pro vzorek i pro kalibrátor, a to podle následujícího vzorce:

$$\Delta C_t (\text{vzorek}) = C_t (\text{cílový}) - C_t (\text{referenční})$$

$$\Delta C_t (\text{kalibrátor}) = C_t (\text{cílový}) - C_t (\text{referenční})$$

Poté se normalizuje ΔC_t testovaného genu k ΔC_t kalibrátoru podle vzorce:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{vzorek}) - \Delta C_t (\text{kalibrátor})$$

Posledním krokem je výpočet normalizovaného expresního poměru:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{normalizovaný expresní poměr}$$

Výsledkem je poměr cílového genu testovaného vzorku a kalibrátoru, normalizovaného k expresi referenčního genu. Jinak řečeno, výsledkem je relativní množství cílové molekuly v porovnání s kalibrátorem. Pokud má gen cílový a gen referenční stejnou efektivitu, která se ale nerovná 2 (100%), lze výpočet expresního poměru upravit dosazením skutečné hodnoty efektivity (<http://www3.bio-rad.com>; Livak, Schmittgen, 2001).

Jestliže cílový gen s genem referenčním nejsou amplifikovány se stejnou efektivitou, je doporučeno k výpočtu relativní kvantifikace využít metodu dle Pfaffla. Normalizovaný expresní poměr (NEP) se vypočítá podle následujícího vzorce, kde E je efektivita:

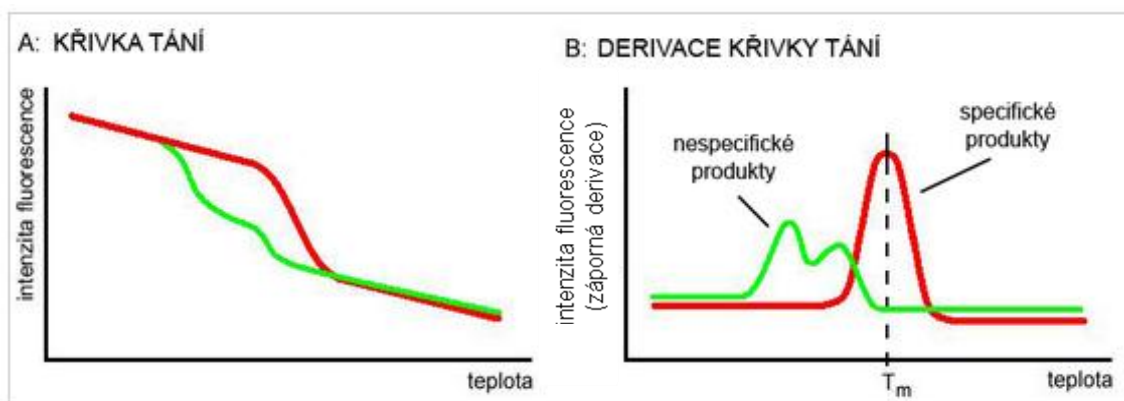
$$\text{NEP} = (E_{\text{cílový}})^{\Delta Ct \text{ cílový (kalibrátor - vzorek)}} / (E_{\text{referenční}})^{\Delta Ct \text{ referenční (kalibrátor - vzorek)}}$$

Tento výpočet je matematicky ekvivalentní ke komparativní metodě delta-delta. Rozdílem je, že se normalizuje Ct kalibrátoru k Ct vzorku zvlášť pro testovaný a pro referenční gen. Komparativní metoda delta-delta je ve skutečnosti jednoduchý, speciální případ metody dle Pfaffla, kde efektivita cílového a referenčního genu se rovná číslu 2 (<http://www3.bio-rad.com> ; Pfaffl, 2001).

4.2. Analýza křivky tání

Metoda analýzy křivky tání (melting curve analysis) se uplatňuje po rtPCR amplifikaci (tzv. end-point PCR) a slouží k ověření vlastností PCR produktů. Při použití fluorescenčně značených sond (kromě hydrolyzačních, které jsou degradovány), lze touto analýzou rozlišit SNP i jiné mutace, při použití dsDNA interkalačních barviv se rozlišují specifické a nespecifické PCR produkty. Jako tání DNA se označuje proces denaturace dsDNA, který je indukovaný zvyšováním teploty. Pro pozorování tání DNA za pomoci interkalačních barviv (nejčastěji SYBR Green I) je po rtPCR amplifikaci nutné ochlazení na nižší teplotu než je předpokládaná T_m produktů a následné zvyšování teploty na teplotu vyšší než je očekávaná T_m . Přitom se sledují změny fluorescence. Po vynesení intenzity fluorescence oproti teplotě se zobrazí křivka tání, která v oblasti T_m strmě klesá. T_m lze určit ze záporné derivace křivky tání, zobrazí se jako vrchol křivky. Princip

je zobrazen na obrázku 11. Detekce mutací a nespécifických produktů je založena na rozdílných T_m (<http://www.generi-biotech.com>).



Obr. 11: Analýza křivky tání. A) Křivka tání, v oblasti T_m křivka strmě klesá. B) Záporná derivace křivky tání, T_m se zobrazí jako vrchol křivky (<http://www.generi-biotech.com>).

4.3. High Resolution Melting analýza (HRM)

Analýza křivky tání s vysokým rozlišením, neboli High Resolution Melting analýza (HRM), je metoda zavedena v roce 2002. Využívá se např. ke genotypizaci, analýze mutací nebo identifikaci druhů. Po amplifikaci se fluorescenčně detekují změny ve tvaru křivky tání v porovnání se standardem nebo ostatními vzorky. Pro tento účel se používají speciální saturující interkalační barviva, která na rozdíl od SYBR Greenu I plně vysycují DNA řetězec a při postupné denaturaci nedochází k přeskokům molekul barviva na volná místa. Mezi taková barviva patří BEBO, LC Green, Eva Green nebo SYTO9. Výhodou HRM je jednoduchost (nevyžaduje přidávání dalších reagentů), rychlost, kapacita a nižší cena analýzy oproti jiným alternativám (nevyžaduje fluorescenční sondy). Umožňuje i detekci neznámých alelických variant, nedokáže je ovšem přesně identifikovat. Na to je potřeba použít jiné metody. Proto se HRM nejčastěji používá jako screeningová metoda (Reed *et al.*, 2007).

4.4. Alelická diskriminace

Vyhodnocení alelické diskriminace se nejčastěji provádí po rtPCR amplifikaci. Jedná se o analýzu, u které se využívá dvou odlišně značených sond (nejčastěji TaqMan sond) k detekci alelických variant. Lze tak provést genotypizaci a rozlišit homozygoty pro wild-type nebo mutantní/SNP alelu a heterozygoty. Každá sonda

se specificky váže pouze k určené variantě, pro kterou byla navržena. Nejčastěji je výsledný signál zobrazován v bodovém grafu. Výrazný signál ze sondy pro jednu nebo druhou alelu znamená, že testovaný organismus je homozygot, zobrazuje se buď při jedné, nebo druhé ose grafu. Jako heterozygot je určen organismus, u kterého je signál pro obě alely zhruba v poměru 1:1. Je však třeba zohlednit určitou „background“ fluorescenci, kterou může způsobovat řada faktorů, jako degradace sondy, překryv fluorescenčních kanálů fluoroforů použitých sond nebo nesprávné hybridy sondy a její neodpovídající alely. Vzorky s velmi nízkou fluorescencí v obou kanálech jsou označeny jako negativní (Sevall, 2001).

5. Využití real-time PCR pro subtypizaci difuzního velkobuněčného lymfomu

Difuzní velkobuněčný lymfom, z angl. diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), je podle klasifikace REAL (Revised European-American Lymphoma) nejčastěji diagnostikovaný typ non-Hodgkinských lymfomů (NHL). Zahrnuje asi 30 % všech případů NHL, postihuje nejčastěji lidi středního a staršího věku (Autor neuveden, 1997).

DLBCL vzniká transformací B-lymfocytů v různých stádiích jejich diferenciaci. Je to poměrně agresivní typ lymfomu, vyznačující se obrovskou klinickou a biologickou heterogenitou. Na klasickou léčbu reaguje pouze 35 – 40 % pacientů. Četné neúspěšné pokusy o zvýšení tohoto průměru naznačily, že DLBCL zahrnuje řadu subtypů odlišně reagujících na chemoterapii. Je proto důležité správně diagnostikovat jednotlivé subtypy a určit odpovídající následnou léčbu. Jednoznačné příčiny vzniku DLBCL nejsou zcela známy. Existuje však celá řada potencionálních rizikových faktorů, které mohou vést ke vzniku lymfomu či mohou způsobit rychlejší postup nemoci. Nejvýznamnější jsou různé typy získané či vrozené imunodeficiency (transplantace orgánů, imunosuprese atd.) (Papajík *et al.*, 2010; Rosenwald *et al.*, 2002).

Pod pojmem DLBCL se podle nejnovější klasifikace WHO z roku 2008 rozumí morfologicky, molekulárně-geneticky i klinicky heterogenní soubor různých nozologických jednotek. Na základě expresního profilu byly určeny subtypy DLBCL. Podskupina s expresí podobnou B-lymfocytům germinálního centra - germinal center B-cell-like DLBCL je označována GCB-like a DLBCL s expresí podobnou aktivovaným B-lymfocytům periferní krve – aktivated B-cell-like DLBCL je subtypem ABC-like. Obě podskupiny se liší v prognóze. 5-leté přežití u pacientů se subtypem ABC-like se pohybuje kolem 35 %, u GCB-like je to asi 60 %. Tyto skupiny se však mohou prognosticky překrývat (Rosenwald *et al.*, 2002; Šálek *et al.*, 2011).

Mezi nejčastější klinické příznaky DLBCL patří nález rychle rostoucí nebolestivé uzliny. Příznaky mohou způsobovat i nespecifické obtíže, a to podle jejich lokalizace. Může být postižen žaludek, slezina, kůže, CNS i kostní dřeň. Existuje např. nodální (uzlinová) či gastrická verze DLBCL lišící se v prognóze i příznacích.

Standardní kombinací pro léčbu DLBCL je R-CHOP (rituximab, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin a prednison). Upřednostňuje se ale individualizace léčby, a to díky moderním metodám radio- a chemoterapie, imunoterapie nebo imunochemoterapie (Habermann *et al.*, 2006; Papajík *et al.*, 2010).

Téma celkového přežití pacientů s DLBCL, a tím spojená subtypizace, byly námětem mnoha výzkumů. Alizadeh *et al.* zkoumáním exprese 375 genů u DLBCL a jejím porovnáním s expresí genů u fyziologických B-lymfocytů zjistili, že na základě získaných údajů lze rozlišit nejméně 2 subtypy DLBCL: subtyp GCB-like a ABC-like (Alizadeh *et al.*, 2000).

Rosenwald *et al.* se dále zabývali podrobnějším studiem 100 genů, které se ukázaly být klíčové pro rozlišení jednotlivých subtypů. Potvrdili rozlišení DLBCL na subtyp GCB-like a ABC-like a našli subtyp třetí, který se svou expresí od ostatních výrazně lišil – primární mediastinální DLBCL (subtyp PMBL). V jiné studii bylo porovnáním genové exprese subtypu PMBL s jinými maligními lymfomy zjištěno, že má subtyp PMBL velmi podobnou expresi jako Hodgkinův lymfom typu nodulární sklerózy. WHO v nejnovější verzi klasifikace subtyp PMBL vyčlenila ze subtypů DLBCL jako samostatný typ velkobuněčného lymfomu. Rosenwald *et al.* vytvořili model predikce celkového přežití založený na expresi 17 genů (Rosenwald *et al.*, 2002; Savage *et al.*, 2003; Šálek *et al.*, 2011). Tento model sloužil jako vodítko k vytvoření zjednodušeného modelu Lossosem *et al.* Ten umožňuje na základě exprese 6 genů s velkou pravděpodobností rozčlenit pacienty do rizikových skupin, a tím i identifikovat subtypy ABC-like a GCB-like. Exprese genů *LMO2*, *BCL6* a *FN1* je spojená s vyšším celkovým přežitím. Exprimované geny *CCND2*, *SCYA3* a *BCL2* jsou spojeny s nižším celkovým přežitím pacientů. Byl také zkoumán gen *BLIMP1*, známý také jako *PRDM1* (Lossos *et al.*, 2004).

BLIMP1 hraje významnou roli v diferenciaci plasmatických buněk, a to v umlčování genů zralých B-lymfocytů zodpovědných za řadu funkcí, jako je proliferace nebo receptorový signaling. BLIMP1 reprimuje řadu transkripčních faktorů, které řídí terminální diferenciaci B-lymfocytů v plasmatické buňky. Shaffer *et al.* identifikovali 228 genů, které jsou potlačovány a 32 genů, které jsou indukovány expresí *BLIMP1* genu (Shaffer *et al.*, 2002). Mandelbaum *et al.* ve své studii poskytli důkaz, že *BLIMP1*, předpokládaný tumorový supresor, je často inaktivovaný

v ABC subtypu DLBCL (asi v 1/3 případů). V 53 % případů byla inaktivace způsobena strukturními změnami *BLIMP1* genu a translokací genu *BCL6*, který exprimuje transkripční represor potlačující expresi *BLIMP1* genu (Mandelbaum *et al.*, 2010). Buňky germinálního centra, ze kterých se předpokládá vznik GCB-like subtypu, *BLIMP1* normálně neexprimují, a proto je pozorována jeho absence u tohoto subtypu DLBCL. *BLIMP1* leží na dlouhém raménku chromozomu 6, konkrétně na pruhu 6q21. Tato oblast je u non-Hodgkinských lymfomů často deletována (Pasqualucci *et al.*, 2006).

Exprese *BLIMP1* a *BCL2* byla spojena s horší prognózou u pacientů s non GCB-like subtypem jak u nodální, tak u gastrické varianty DLBCL, na rozdíl od jiných prognostických markerů nodálního typu (*CD10*, *BCL6*, *MUM1*), které nevykazovaly u gastrické varianty žádnou významnou asociaci (Martin-Arruti *et al.*, 2012).

6. Materiál a metodika

6.1. Klinický materiál

Pro stanovení exprese *BLIMP1* byly použity formalinem fixované parafínové bločky (FFPE) s tkání s klinickou diagnózou nodální DLBCL pacientů Fakultní nemocnice Olomouc z let 2000 až 2011.

6.2. Izolace RNA z formalinem fixovaných parafínových bloček

Použité chemikálie: Kit Recover All Total Nucleic Acid Isolation (Life Technology, USA), xylén.

Laboratorní vybavení: Laminární box (STERIL-ANTARES, Italy), centrifuga 5415D (Eppendorf, Germany), automatické pipety a špičky s filtrem (Gilson, USA), clear mikroskopické mikrozkušavky (Eppendorf, Germany).

Z nařezaných FFPE bloček o tloušťce 20 μm byla izolovaná RNA. Před získáním čisté RNA musela být provedena deparafinizace, proteázové štěpení, izolace nukleových kyselin, ošetření DNázou a finální purifikace RNA.

Deparafinizace: 1. Nařezané plátky z FFPE s tkání DLBCL byly vloženy do clear mikroskopické mikrozkušavky Eppendorf a byl přidán 1 ml 100% xylenu. Mikroskopická mikrozkušavka byla lehce vortexována, centrifugována a inkubována 3 min při 50 °C.

2. Mikroskopická mikrozkušavka byla centrifugována 2 min maximální rychlostí a supernatant byl odpipetován.

3. Byl přidán 1 ml 100% etanolu a mikroskopická mikrozkušavka byla lehce vortexována, opět centrifugována 2 min maximální rychlostí a supernatant byl odpipetován bez porušení peletu.

4. Byl zopakován krok 3, mikroskopická mikrozkušavka byla poté jemně centrifugována a byl odstraněn zbytek etanolu.

5. Mikroskopická mikrozkušavka byla 45 min vysušena na vzduchu při pokojové teplotě.

Proteázové štěpení: 1. Do mikroskopické mikrozkušavky bylo přidáno 200 μl Digestion Bufferu a 4 μl Proteázy. Roztok byl lehce promíchán.

2. Mikroskopická mikrozkušavka byla inkubována 15 min při 50 °C a následně 15 min při 80 °C.

Izolace RNA: 1. Do mikrozkušavky bylo přidáno 240 μ l Isolation Additive a 550 μ l 100% etanolu. Roztok byl promíchán pipetou.

2. Do sběrné kolonky kitu byla vložena kolonka s filtrem, kam bylo napipetováno 700 μ l vzorku. Kolonka byla centrifugována 30 s při 10000 g a obsah sběrné kolonky byl odstraněn. Toto bylo zopakováno se zbývajícím množstvím vzorku.

3. Bylo přidáno 700 μ l Wash I pufru do kolonky, ta poté byla centrifugována 30 s při 10000 g. Obsah sběrné kolonky byl odstraněn. Kolonka byla opět centrifugována 30 s pro odstranění zbytku tekutiny.

Ošetření DNázou a finální purifikace RNA: 1. Byl připraven DNase mix, pro jeden vzorek bylo použito 5 μ l DNase Buffer (10x), 4 μ l DNase a 50 μ l Nuclease-free water.

2. 60 μ l mixu bylo napipetováno do středu filtru kolonky, proběhla inkubace 30 min při pokojové teplotě.

3. Do kolonky bylo přidáno 700 μ l Wash I pufru, poté proběhla inkubace 1 min při pokojové teplotě a kolonka byla centrifugována 30 s na 10000 g. Obsah sběrné kolonky byl odstraněn.

4. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l Wash 2/3 pufru, kolonka byla centrifugována 30 s při 10000 g. Obsah sběrné kolonky byl odstraněn. Tento krok byl zopakován. Kolonka byla centrifugována další 1 min při 10000 g.

5. Kolonka s filtrem byla přendána do nové sběrné kolonky, do středu filtru kolonky bylo napipetováno 60 μ l Nuclease-free water. Proběhla inkubace 1 min při pokojové teplotě.

6. Kolonka byla centrifugována 1 min maximální rychlostí. Výsledným produktem byla purifikovaná izolovaná RNA, která se poté skladovala při teplotě – 80 °C.

6.3. Přepis RNA na cDNA

Použité chemikálie: Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche, USA).

Laboratorní vybavení: Laminární box (STERIL-ANTARES, Italy), automatické pipety a špičky s filtrem (Gilson, USA), heatblock Biosan TDB-100 (Biosan, USA).

Pracovní postup: 1. Byl připraven mix RNA a primerů, na 1 reakci byl použit 1 µg RNA, 2 µl Random Hexamer Primer (600 pmol/µl) a 10 µl H₂O.

2. Mix byl denaturován inkubací 10 min při 65 °C. Poté byl schlazen na ledu.

3. K mixu byly přidány 4 µl Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (5x), 0,5 µl Protector RNase Inhibitor (40 U/µl), 2 µl Deoxynucleotide Mix (10 mM každého deoxynukleotidu) a 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase (40 U/µl).

4. Mix byl jemně promíchán a centrifugován. Poté byl inkubován 10 min při 25 °C a následně 30 min při 55 °C.

5. Pro inaktivaci Transcriptor Reverse Transcriptase byl mix inkubován 5 min při 85 °C. Výsledná cDNA byla 2 x naředěna a skladována při – 20 °C.

6.4. Real-time PCR

Použité chemikálie: LightCycler 480 Probes Master (2x) (Roche, USA), TaqMan Gene Expression Assay Hs00153357_m1 pro gen *BLIMP1* a Hs00943178_g1 pro referenční gen *PGK1*, referenční lidská RNA (QPCR Human Reference Total RNA, Stratagene, USA).

Laboratorní vybavení: Laminární box (STERIL-ANTARES, Italy), centrifuga 5804 (Eppendorf, Germany), automatické pipety a špičky s filtrem (Gilson, USA), mikrozkuhavky (Eppendorf, Germany), destička s 96-jamkami (Roche, USA), LightCycler 480 (Roche, USA).

Pracovní postup: 1. Každý vzorek DLBCL byl analyzován v triplicátech, stejně jako referenční lidská RNA (kalibrátor) a negativní kontrola pro každý gen. Na jednu reakci byly použity reagensie a objemy podle tabulky II.

2. Mix reagensií byl rozpipetován na 96-jamkovou destičku, ta byla poté opatřena fólií, centrifugována po dobu 2 minut na 1000 g a vložena do LightCycleru 480 s následujícím programem:

1 cyklus - počáteční denaturace 5 min při 95 °C

45 cyklů - denaturace 10 s při 95 °C

- annealing a extenze 30 s při 60 °C

Tab. II: Reagencie použité na jednu PCR reakci.

Reagencie	Objem [μl]
Probe Master (2x)	5
TaqMan Gene Expression Assay (sonda + primery)	0,5
H ₂ O	3,5
cDNA	1

7. Výsledky a diskuze

Byla testována exprese genu *BLIMP1* u pacientů s klinicky diagnostikovaným difúzním velkobuněčným lymfomem metodou real-time PCR (postup viz kapitola 6.1.3.). Výsledky měření exprese *BLIMP1* byly normalizovány k referenčnímu genu *PGK1* s použitím lidské referenční RNA jako kalibrátoru. Účelem bylo testování použitelnosti měření exprese RNA izolované z formalinem fixovaných parafínových bločků a zároveň se pokusit určit vztah změn v expresi genu k subtypům difúzního velkobuněčného lymfomu a prognostickým skupinám.

U vzorků byla zpětně provedena imunohistochemická subtypizace, která doplnila cytogenetický a klinický nález. Čtyři vzorky byly určeny jako PMBL, jeden jako subtyp GCB-like (1/11), jeden jako ABC-like (4/06) a jeden jako non GCB-like (5/11). Vzorek 7/00 byl sekundární DLBCL objevený u pacienta s chronickou lymfatickou leukémií (CLL). Vzorky 8-1/11 a 8-2/11 byly identifikovány jako Burkittův lymfom. Je to agresivní typ lymfomu postihujících převážně B-lymfocyty. Je charakterizován translokacemi genu *c-MYC* ležícím na 8. chromozomu, které jsou často pozorovány i u DLBCL. Proto je jejich odlišení často problematické (Akasaka *et al.*, 2000). Většina pacientů byla zařazena do skupiny s nízkým rizikem (0-1) dle IPI (Internatioanal Prognostic Index; univerzální prognostické měřítko u pacientů s NHL). U čtyř pacientů byly pozorovány komplexní chromozomální změny (2, 4, 6, 9). Údaje zobrazuje tabulka III.

Tab. III: Charakteristika vzorků s klinicky diagnostikovaným DLBCL.

Pacient	Vzorek	Subtyp	IPI	Molekulární cytogenetika
1	1/11	GCB-like	1	ND
2	2/09	PMBL	0	Komplexní změny
3	3/04	PMBL	1	Přestavba <i>C/ITA</i>
4	4/06	ABC-like	1	Komplexní změny
5	5/11	Non GCB-like	5	ND
6	6/10	PMBL	1	Komplexní změny
7	7/00	CLL/sekundární DLBCL	0	N
8	8-1/11 8-2/11	Burkittův lymfom	—	t(8;14)(q24;q32)

Pacient	Vzorek	Subtyp	IPI	Molekulární cytogenetika
9	9/10	PMBL	1	Komplexní změny

N: normální nález; ND: vyšetření neprovedeno; — nehodnoceno;
číslo za lomítkem značí rok fixace vzorku

Byla izolována RNA z 11 vzorků pacientů s DLBCL, jeden byl vyřazen z důvodu nízké koncentrace RNA. Real-time PCR amplifikace byla provedena u 10 vzorků DLBCL. Výsledné průměrné hodnoty Ct real-time PCR a směrodatná odchylka jsou znázorněny v tabulce IV, normalizovaný expresní poměr a střední chybu průměru zobrazuje tabulka V.

K výpočtu normalizovaného expresního poměru byla použita komparativní metoda delta-delta bez korekce efektivity za pomoci softwarového modulu LightCycleru 480, stejně jako výpočet směrodatné odchylky Ct a střední chyby průměru normalizovaného expresního poměru.

Tab. IV: Naměřené hodnoty pro referenční gen *PGK1* a testovaný gen *BLIMP1*.

Vzorek	<i>PGK1</i>		<i>BLIMP1</i>	
	Průměrná hodnota Ct	Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota Ct	Směrodatná odchylka
1/11	29,71	0,05	29,14	0,06
2/09	30,10	0,03	29,50	0,06
3/04	35,12	0,07	34,80	0,25
4/06	32,81	0,06	33,21	0,14
5/11	29,16	0,11	26,06	0,03
6/10	30,96	0,08	32,12	0,19
7/00	—	—	—	—
8-1/11	31,13	0,04	35,58	0,02
8-2/11	30,99	0,05	35,87	0,06
9/10	29,20	0,03	30,69	0,02
Ref	20,95	0,00	27,31	0,03

Ref: referenční lidská RNA; — negativní

Tab. V: Výsledné hodnoty exprese *BLIMP1*.

Vzorek	Normalizovaný expresní poměr	Střední chyba průměru
1/11	137,2	6,633
2/09	140,9	6,197
3/04	102,9	15,38
4/06	62,13	5,288
5/11	790,8	54,66
6/10	36,81	4,463
7/00	—	—
8-1/11	3,787	0,117
8-2/11	2,808	0,131
9/10	29,29	0,781
Ref	1	0

Ref: referenční lidská RNA; — nelze hodnotit

Cílem mé bakalářské práce bylo mimo jiné zhodnotit měření exprese genů ze tkání z FFPE, což je často obtížné, protože RNA po skladování bývá fragmentovaná. Dochází také k modifikacím RNA v důsledku navázání formalinu, ale většina těchto modifikací je po vhodném postupu izolace odstraněna (Masuda *et al.*, 1999). Fragmentace neznamená při studiu krátkých sekvencí závažný problém. Proto byly použity TaqMan Gene Expression Assaye, které se vyznačují krátkými amplikony (65 bp pro *BLIMP1*, 73 bp pro *PGK1*). Výhodou těchto assayí také je, že mají garantovanou efektivitu velmi blízkou 2, proto pro výpočet normalizovaného expresního poměru mohla být použita komparativní metoda delta-delta.

Otázkou samozřejmě zůstává validita výsledků z fragmentované RNA, různé transkripty mohou být různě fragmentované nebo degradované. Výsledky z FFPE nemusí být srovnatelné s expresí v čerstvých tkáních, vzhledem ke stavu RNA, ale v zásadě by měly být porovnatelné vzájemně. Bylo publikováno několik studií, ve kterých úspěšně měřili expresi ze tkání z FFPE a neshledali závažné důvody, proč nevyužívat FFPE ke studiu exprese (Malumbres *et al.*, 2008).

Pro studium míry exprese genů u pacientů s DLBCL byl *BLIMP1* vybrán záměrně, z důvodu jeho lokalizace na 6. chromozomu (pruh 6q21), protože tato oblast je u non-Hodgkinských lymfomů často deletována (Pasqualucci *et al.*, 2006). V řadě studií byl *BLIMP1* označen jako prognostický marker DLBCL. Cílem bylo pokusit se určit vliv exprese *BLIMP1* na prognózu vybraných pacientů Fakultní nemocnice Olomouc, a tím se i pokusit provést subtypizaci. Naměřená exprese *BLIMP1* byla velmi variabilní. Hodnota Ct se pohybovala kolem 30 a více, a to i u referenčního genu *PGK1*, což je na hranici kvantifikovatelnosti. Důvodem je zřejmě již zmíněná fragmentace RNA. Směrodatná odchylka replikátů byla menší než 0,2, což umožnilo vyhodnotit relativní expresi i přes vysoké Ct. Stav fragmentace RNA v FFPE zřejmě závisí i na stáří bločku. Nejstarší použitý bloček byl z roku 2000 (vzorek 7/00), zřejmě i z tohoto důvodu u něj nebyla naměřena použitelná data. Vzorky z roku 2004 a 2006 (3/04 a 4/06) měly vysoké Ct, což značí vyšší fragmentaci než u novějších vzorků s nižším Ct (2009 - 2011). Vzorky 8-1/11 a 8-2/11 byly dva různé bločky s tkání stejného pacienta. Z naměřených údajů je možné pozorovat velmi podobnou hodnotu Ct i výslednou relativní expresi (normalizovaný expresní poměr). Pokud lze hodnotit na základě tohoto jednoho případu, je izolace i měření exprese dobře reprodukovatelné.

Rozsah hodnot relativní exprese se pohyboval mezi 2,808 a 790,8. Z těchto hodnot nelze určit jednoznačný trend, byla pouze pozorována výrazně zvýšená exprese u pacienta s non GCB-like subtypem a vysokým rizikem (5/11), což odpovídá poznatkům Martin-Arruti *et al.*, kteří pozorovali korelaci zvýšené exprese *BLIMP1* s horší prognózou u pacientů s gastrickou i nodální variantou DLBCL. Nejnižší expresi vykazovaly vzorky Burkittova lymfomu (8-1/11, 8-2/11), ovšem vliv na prognózu u této diagnózy není znám.

Výsledkem praktické části tedy je, že izolace RNA ze tkání z formalinem fixovaných parafínových bločků i následné měření exprese je možné i reprodukovatelné, avšak naměřené hodnoty jsou, alespoň v tomto případě, na hranici kvantifikovatelnosti. S ohledem na malý počet testovaných vzorků a velkou variabilitu se nepodařilo jednoznačně stanovit vliv exprese *BLIMP1* na prognózu pacientů s DLBCL s ohledem na molekulárně-genetickou subtypizaci. Je možné, že pro jednoznačné závěry bude potřeba použít RNA z čerstvě zamražených tkání.

8. Závěr

Polymerázová řetězová reakce je nezbytnou součástí řady vědních oborů. Existuje velké množství variant a modifikací klasické PCR. Real-time PCR je v současnosti jednou z nejvýznamnějších metod pro určení relativní kvantifikace. V mé bakalářské práci byla tato metoda použita ke studiu exprese předpokládaného tumorového supresoru *BLIMP1*, který byl v řadě studií označen jako prognostický marker difuzního velkobuněčného lymfomu.

Byla hodnocena metoda izolace RNA a měření exprese z formalinem fixovaných parafínových bločků se tkání s klinicky diagnostikovaným DLBCL. Cílem také bylo pokusit se určit vliv míry exprese *BLIMP1* na prognózu pacientů a rozdělení DLBCL na subtypy.

Izolace RNA byla ve většině případů úspěšná, získané hodnoty relativní exprese *BLIMP1* byly poměrně variabilní a na hranici kvantifikovatelnosti. Důvodem byla nejspíš fragmentace RNA, jejíž míra může souviset i se stářím vzorku. Na základě získaných hodnot relativní exprese u dostupných vzorků, které vykazovaly široký rozsah, jsme nebyli schopni jednoznačně rozhodnout přínos pro rozdělení pacientů do prognostických skupin a molekulárně-genetických subtypů DLBCL. Důvodem bylo malé množství dostupných vzorků a již zmíněná variabilita v expresi testovaného genu.

V současnosti se hledají nové přístupy, jak provádět subtypizaci DLBCL, protože současné rozdělení subtypů často neodpovídá prognóze. Na toto téma existuje řada studií zabývajících se modely založenými na expresi určitých genů.

Použitá literatura:

Autor neuveden (1997) A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma, *Blood*, 89, 11, 3909-3918

Abu Al-Soud, W., Rådström, P. (2000) Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in Presence of Blood, Feces, and Meat, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 12, 4463-4470

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Základy buněčné biologie*, 2. vydání, Espero Publishing 2005, ISBN: 80-902906-2-0

Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, Ch., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C. *et al.* (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profilig, *Nature*, 403, 6769, 503-511

Akasaka, T., Akasaka, H., Ueda, C., Yonetani, N., Maesako, Y., Shimizu, A., Yamabe, H. *et al.* (2000) Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC/immunoglobulin heavy-chain fusion gene, *Journal of clinical oncology*, 18, 3, 510-518

Bermingham, N., Luettich, K. (2003) Polymerase chain reaction and its applications, *Current Diagnostic Pathology*, 9, 159-164

Brown, T. A., *Klonování genů a analýza DNA Úvod*, 1. české vydání, vydala Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2007, ISBN: 978-80-244-1719-6

Cline, J., Braman, J. C., Hogrefe, H. H (1996) PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerase, *Nucleic Acids Research*, 24, 18, 3546-3551

Dahiya, R., Deng, G., Chen, K., Haughney, P. C., Cunha, G. R., Narayan, P. (1995) Terms and Techniques: New Approach to Hot-Start Polymerase Chain Reaction Using DNA Taq Polymerase Antibody, *Urologic oncology*, 1, 1, 42-46

Didenko V. V. (2001) DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications, *Biotechniques*, 31, 5, 1106-1121

Garcia, J. G. N., Shwu-Fan Ma (2005) Polymerase chain reaction: a landmark in the history of gene technology, *Critical Care Medicine*, 33, 12, 429-433

Ginzinger, D. G. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream, *Experimental Hematology*, 30, 6, 503-512

Habermann, T. M., Weller E. A., Morrison, V. A., Gascoyne, R. D., Cassileth, P. A., Cohn, J. B., Dakhil, S. R. *et al.* (2006) Rituximab-CHOP Versus CHOP Alone or With Maintenance Rituximab in Older Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma, *Journal of clinical oncology*, 24, 19, 3121-3127

<http://biologie.upol.cz/metody/Amplifikace%20pomoci%20PCR.htm> 2. 2. 2012

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/taq_buffer_man.pdf 31. 1. 2012

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/productnotes/F_Lux%20Primers%20050307-RD-MKT-TL-HL0506021.pdf 8. 2. 2012

<http://simgene.com/Primer3> 2. 2. 2012

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/general_documents/cms_041165.pdf 31. 1. 2012

<http://www3.bio-rad.com/B2B/vanity/gexp/content.do?root=/Product%20Family/GX/Home&pcatoid=-35468&ccatoid=-36539> 28. 2. 2012

[http:// www.allgenes.com](http://www.allgenes.com) 29. 3. 2012

<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/castpcr.printable.html> 21. 3. 2012

http://www.bioline.com/pdf/RTPCRCOMP_webnotes.pdf 20. 2. 2012

<http://www.exiqon.com/universal-probe-library> 23. 3. 2012

<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html> 6. 2. 2012

<http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/> 24. 2. 2012

<http://www.horizonpress.com/pcr/qPCR-machines.html> 21. 2. 2012

http://www.molecular-beacons.org/toto/Marras_fluorescent.html 8. 2. 2012

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> 2. 2. 2012

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html 3. 10. 2011

http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/pcr_man/chapter_7.pdf 24. 2. 2012

Hue-Roye, K., Vege, S. (2008) Principles of PCR-based assays, *Immunohematology*, 24, 4, 170-175

Kaltenboeck, B., Wang, Ch. (2005) Advances in real-time PCR: Application to clinical laboratory diagnostic, *Advances in clinical chemistry*, 40, 219-259

Karkare, S., Bhatnagar, D. (2006) Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino, *Applied mikrobiology and biotechnology*, 71, 5, 575-586

Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, Ch., Mermod N. (2007) Statistical significance of quantitative PCR, *BMC Bioinformatics*, 8, 131

Kwok, S., Chang, S. Y., Sninsky, J. J., Wang A. (1994) A Guide to the Design and Use of Mismatched and Degenerate Primers, *Genomic Research*, 3, 4, 539-547

- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method, *Methods*, 25, 4, 402-408
- Longo, M. C., Berninger, M. S., Hartley, J. L. (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, *Gene*, 93, 1, 125-128
- Lossos, I. S, Czerwinski, D. K., Alizadeh, A. A., Wechser, M. A., Tibshirani, R., Botstein, D., Levy, R. (2004) Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes, *The New England journal of medicine*, 350, 18, 1828-1837
- Malumbres, R., Chen, J., Tibshirani, R., Johnson, N. A., Sehn, L. H., Natkunam, Y., Briones, J. *et al.* (2008) Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP, *Blood*, 111, 12, 5509-5514
- Mandelbaum, J., Bhaget, G., Tang, H., Mo, T., Brahmachary, M., Shen, Q., Chadburn, A. *et al.* (2010) BLIMP1 Is a Tumor Suppressor Gene Frequently Disrupted in Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma, *Cancer Cell*, 18, 6, 568-579
- Martin-Arruti, M., Vaquero, M., Díaz de Otazu, R., Zabalza, I., Ballesteros, J., Roncador, G., García-Orad, A. (2012) Bcl-2 and BLIMP-1 expression predict worse prognosis in gastric diffuse large B cell lymphoma (DLCLB) while other markers for nodal DLBCL are not useful, *Histopathology*, 60, 5, 785-792
- Masuda, N., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Monden, M., Okubo K. (1999) Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples, *Nucleic acid research*, 27, 22, 4436-4443
- Mullis, K. B. (1990) The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction, *Scientific American*, 262, 4, 56-61, 64-65
- Myers, T. W., Gelfand, D. H. (1991) Reverse Transcription and DNA Amplification by a *Thermus thermophilus* DNA Polymerase, *Biochemistry*, 30, 31, 7661-7666
- Ochman, H., Gerber, A. S., Hartl, D. L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction, *Genetics*, 120, 3, 621 -623
- Papajík, T., Kubová. Z., Flodr, P., Mysliveček, M., Jarošová, M., Indrák, K. (2010) Difúzní B-velkobuněčný lymfom, *Postgraduální medicína*, 12, 6, 682-691
- Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S. V., Aster, J. C. *et al.* (2006) Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma, *The Journal of experimental medicine*, 203, 2, 311-317
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acid Research*, 29, 9, 2002-2007
- Pohl, G., Shih, leM. (2004) Principle and application of digital PCR, *Expert review of molecular diagnostics*, 4, 1, 41-47

- Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M., Löfström, Ch. (2004) Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples, *Molecular Biotechnology*, 26, 2, 133-146
- Reed, G. H., Kent, J. O., Wittwer, C. T (2007) High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics, *Pharmacogenomics*, 8, 6, 597-608
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D. *et al.* (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma, *The New England journal of medicine*, 346, 25, 1937-1947
- Savage, K. J., Monti, S., Kutok, J. L., Cattoretti, G., Neuberg, D., Leval, L. de, Kurtin, P. *et al.* (2003) The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma, *Blood*, 102, 12, 3871-3879
- Sevall, J. S. (2001) Rapid Allelic Discrimination from Real-Time DNA Amplification, *Methods*, 25, 4, 452-455
- Shaffer, A. L., Lin, K., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A., Giltnane, J. M. *et al.* (2002) Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program, *Immunity*, 17, 1, 51-62
- Suslov, O., Steindler, D. A. (2005) PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency, *Nucleic Acid Research*, 33, 20, e181
- Svanvik, N., Ståhlberg, A., Sehlstedt, U., Sjöback, R., Kubista, M. (2000) Detection of PCR Products in Real Time Using Light-up Probes, *Analytical Biochemistry*, 287, 1, 179-182
- Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J., Morley, A. A (1992) Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution, *Biotechniques*, 13, 3, 444-449
- Šálek, D., Vášová, I., Janíková, A., Michalka, J., Navrátil, V., Král, Z., Mayer, J. (2011) Difuzní velkobuněčný B-lymfom, *Postgraduální medicína*, 13, 3, 330-337
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková, J., *Metody molekulární biologie*, 1. vydání, Vydavatelství MU, Brno - Kraví Hora 2005, ISBN 80-210-3841-1
- Tyagi, S., Kramer, F. R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization, *Nature Biotechnology*, 14, 3, 303-308
- Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J., Brown, T. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection, *Nucleic Acid Research*, 28, 19, 3752-3761
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., Freeman, W. M. (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, *BioTechniques*, 44, 5, 619-626

Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S. P., Brown, T., Little, S. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence, *Nature Biotechnology*, 17, 8, 804-807

Yourno, J. (1992) A Method for Nested PCR with Single Closed Reaction Tubes, *Genome Research*, 2, 1, 60-65

Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N., Elenitoba-Johnson, K. S. J (2001) Real-Time Multiplex PCR Assays, *Methods*, 25, 4, 430-442

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum F. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications, *Nucleic Acid Research*, 32, 12, e103

Zuna, J., Muzikova, K., Madzo, J., Krejci, O., Trka, J. (2002) Temperature Non-homogeneity in Rapid Airflow-Based Cycler Significantly Affects Real-Time PCR, *33*, 3, 508, 510, 512

Seznam použitých zkratk:

ABC	activated B-cell-like
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2
<i>BCL6</i>	B-cell CLL/lymphoma 6
<i>BLIMP1</i>	B-lymphocyte-induced maturation protein-1
BSA	bovinní sérový albumin
<i>CCND2</i>	cyclin D2
CD10	cluster of differentiation 10
<i>CIITA</i>	class II, major histocompatibility complex, transactivator
CNS	centrální nervová soustava
Ct	threshold cycle
Cy3	Indocarbocyanine
DABCYL	4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid
DLBCL	difuzní velkobuněčný lymfom
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
EDANS	5-(2'-aminoethyl)aminonaphthalene-1-sulfonic acid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EtBr	ethidium bromid
FAM	6-karboxyfluorescein
FFPE	formalinem fixované parafínové bločky
<i>FN1</i>	fibronectin 1
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GCB	germinal center B-cell-like
HEG	hexethylene glycol
HEX	hexachlorofluorescein

HRM	High Resolution Melting analýza
IgG	imunoglobulin třídy G
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)
LNA	Locked Nucleic Acid
LUX	Light Upon eXtension
MGB	minor groove binder
MUM1	protein melanoma associated antigen (mutated) 1
c-MYC	proto-onkogen Myc
dNTP	2'-deoxyribonukleosid-3'-trifosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce
rtPCR	real-time polymerázová řetězová reakce
PGK1	fosfoglycerát kináza 1
PMBL	primární mediastinální velkobuněčný lymfom
PNA	Peptide Nucleic Acid
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain
PRINS	polymerázová řetězová reakce <i>in situ</i>
REAL	Revised European-American Lymphoma
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
R-CHOP	kombinace rituximabu, cyklofosfamidu, doxorubicinu, vinkristinu a prednisonu
Rn	fluorescenční signál
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkripce
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
d(T) ₁₈	oktodekamer deoxythymidinu
T _a	teplota hybridizace primerů, teplota „annealingu“
T _m	teplota tání, „melting“ teplota
TAMRA	5'-karboxytetramethylrodamine
TO	thiazole orange

TOTO	dimer thiazole orange
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
dTTP	2'-deoxythymidin-5'-trifosfát
UPL	Univeral ProbeLibrary
dUTP	2'-deoxyuridin-5'-trifosfát
SCYA3	chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
YO-PRO1	oxazole yellow
YOYO-1	dimer oxazole yellow