



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## **Analýza polymorfismu genu *NQO1* pomocí metody PCR**

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Stanislava Škopková

**Vedoucí práce:** Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Analýza polymorfismu genu *NQO1* pomocí metody PCR jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponenta práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2.8. 2018

.....

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Dagmaře Bystřické, Ph.D. za trpělivý a obětavý přístup a také za možnost pracovat na velice zajímavém tématu. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Tomáši Podzimkovi, Ph.D. z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze za odborné konzultace v oblasti biochemie. A v neposlední řadě chci vyjádřit díky svému manželovi za obrovské množství podpory.

# **Analýza polymorfismu genu *NQO1* pomocí metody PCR**

## **Abstrakt**

*NQO1* je gen, jehož translačním produktem je enzym NAD(P)H:chinon-oxidoreduktáza 1 (NQO1), který se svojí funkcí podílí na ochraně buňky vůči oxidačnímu stresu několika způsoby. Nejen, že dokáže detoxikovat nebezpečné chinony pocházející z vnějšího, ale i vnitřního prostředí a tím zamezuje vzniku meziproductů semichinonů, které tvoří reaktivní formy kyslíku. Podílí se také na stabilizaci důležitých antioxidantů a transkripčního faktoru proteinu p53. Tyto funkce řadí gen *NQO1* a jeho produkt mezi hlavní ochranné faktory buňky před možným vznikem rakoviny vyvolané v důsledku působení oxidačního stresu. Navíc bylo prokázáno, že u některých typů solidních nádorů dochází ke zvýšené expresi výsledného proteinu NQO1. Tento fakt nabízí možnost využití NQO1 jako bioaktivátoru léků určených k léčbě rakoviny.

Polymorfismus genu *NQO1* C609T působí snížení stability výsledného enzymu NQO1, následně dochází k jeho rozpadu a tím i ztrátě jeho funkcí. Z tohoto důvodu mohou mít nositelé tohoto polymorfismu zvýšené riziko vzniku rakoviny.

Cílem mé bakalářské práce bylo praktické zvládnutí metodiky analýzy polymorfismu pomocí metod PCR a RFLP, osvojení si rutinních postupů používaných v genetické laboratoři a vypracování odborné rešerše na dané téma.

V teoretické části práce se snažím poskytnout komplexní informace o genu *NQO1*, a podrobný popis funkce genového produktu. Dále popisují výskyt polymorfismů v genu *NQO1*, včetně metodiky jejich detekce a jejich možnou souvislost se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny.

V praktické části, kterou jsem vykonala v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích, se zabývám popisem přesného postupu analýzy a hodnocením vlastních výsledků

## **Klíčová slova**

gen *NQO1*; NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza 1; polymorfismus; oxidační stres, PCR, RFLP

# The gene *NQO1* polymorphism analysis using the PCR method

## Abstract

The *NQO1* is a gene whose translation product is the enzyme NAD (P) H quinone oxidoreductase 1 (NQO1). The Functions of this enzyme contribute to protecting the cell against oxidative stress in several ways. It can detoxify dangerous exogenous and endogenous quinones, thus it avoids the formation of semiquinones intermediates, that form reactive oxygen species. Also, it contributes to the stabilization of important antioxidants and the transcription factor p53. These functions rank the gene *NQO1* and its product into the front of cell defense before the onset of cancer due to oxidative stress. Additionally, it has been proven that some types of solid tumors show elevated expression of this enzyme. This fact offers the opportunity to use NQO1 as a bio-activator of drugs for the treatment of cancer.

The polymorphism of this gene results in a reduction in the stability of the final product - enzyme, this leads to the disintegration of the enzyme and the loss of its functions. For this reason, the polymorphism carriers may have an increased risk of cancer.

The aim of the bachelor thesis was practical mastery of the methodology of polymorphism analysis using PCR and RFLP methods, to acquire the routine procedures of the genetic laboratory and to elaborate professional research on the topic.

In the theoretical part, I try to provide comprehensive information about the gene *NQO1* and its product, a detailed description of the function, polymorphisms, including methods of detection and possible association with an carcinogenesis.

In the practical part that I did in genetic laboratory GENLABS, s.r.o. in České Budějovice, I deal with a description of the exact process of analysis and evaluation of my own results.

## Key words

*NQO1* gene; NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1; polymorphism; oxidative stress, PCR, RFLP

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Gen <i>NQO1</i></b> .....	<b>8</b>
	2.1 <i>Genová exprese NQO1</i> .....	8
	2.2 <i>Regulace NQO1</i> .....	9
<b>3</b>	<b>NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza 1 (NQO1)</b> .....	<b>9</b>
	3.1 <i>Funkce NQO1</i> .....	10
	3.1.1 <i>Detoxikace chinonů</i> .....	11
	3.1.2 <i>Stabilizace antioxidantů</i> .....	13
	3.1.3 <i>Stabilizace proteinu p53</i> .....	13
<b>4</b>	<b>Polymorfismus <i>NQO1</i></b> .....	<b>14</b>
	4.1 <i>NQO1*2</i> .....	14
	4.2 <i>NQO1*3</i> .....	15
	4.3 <i>Onemocnění spojená s polymorfismem NQO1</i> .....	15
	4.3.1 <i>Toxické účinky benzenu</i> .....	16
	4.3.2 <i>Další rizika vzniku onemocnění spojená s polymorfismem NQO1</i> .....	16
<b>5</b>	<b>Chemoterapeutický význam NQO1</b> .....	<b>17</b>
	5.1 <i>Bioreaktivní alkylační činidla</i> .....	17
	5.1.1 <i>Chinonové substráty pro NQO1</i> .....	18
	5.1.2 <i>Mitomycin C</i> .....	18
	5.1.3 <i>β-lapachon</i> .....	18
	5.2 <i>Upregulace NQO1 v chemoterapii</i> .....	19
	5.3 <i>Význam polymorfismu NQO1*2 v chemoterapii</i> .....	19
<b>6</b>	<b>Laboratorní vyšetření polymorfismu <i>NQO1</i></b> .....	<b>20</b>
	6.1 <i>Materiál a odběr pro analýzu DNA</i> .....	20
	6.2 <i>Izolace DNA</i> .....	21
	6.3 <i>Měření koncentrace DNA</i> .....	22
	6.4 <i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i> .....	23

6.4.1	<i>Průběh PCR reakce</i> .....	24
6.4.2	<i>Optimalizace PCR metody</i> .....	25
6.4.3	<i>Nevýhody PCR metody</i> .....	26
6.4.4	<i>Význam PCR metody</i> .....	26
6.5	<i>Elektroforéza</i> .....	26
6.6	<i>Restrikční štěpení pomocí metody RFLP</i> .....	27
6.6.1	<i>Princip metody PCR RFLP</i> .....	28
<b>7</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>29</b>
<b>8</b>	<b>Praktická část</b> .....	<b>30</b>
8.1	<i>Popis souboru</i> .....	30
8.2	<i>Izolace DNA</i> .....	30
8.2.1	<i>Izolace DNA z bukalního stěru</i> .....	31
8.2.2	<i>Izolace DNA z periferní krve</i> .....	32
8.3	<i>Měření koncentrace DNA</i> .....	34
8.4	<i>RFLP-PCR genu NQO1</i> .....	35
8.4.1	<i>Provedení PCR pomocí MyTaq DNA polymerase</i> .....	35
8.4.2	<i>Provedení PCR pomocí PCRBIO HS Taq Mix</i> .....	37
8.4.3	<i>Kontrola PCR produktu</i> .....	39
8.4.4	<i>Restrikční štěpení</i> .....	40
8.4.5	<i>Kontrola restrikčního štěpení</i> .....	41
8.4.6	<i>Hodnocení výsledků</i> .....	41
<b>9</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>43</b>
<b>10</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>46</b>
<b>11</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>49</b>
<b>12</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>50</b>
<b>13</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>58</b>

## 1 Úvod

*NQO1* je gen, jehož translačním produktem je enzym NAD(P)H:chinon-oxidoreduktáza 1 (NQO1), který se svojí funkcí podílí na ochraně buňky vůči oxidačnímu stresu několika způsoby. Nejen, že dokáže detoxikovat nebezpečné chinony pocházející z vnějšího, ale i vnitřního prostředí a tím zamezuje vzniku meziproduktů semichinonů, které tvoří reaktivní formy kyslíku. Podílí se také na stabilizaci důležitých antioxidantů a transkripčního faktoru proteinu p53. Tyto funkce řadí gen *NQO1* a jeho produkt mezi hlavní ochranné faktory buňky před možným vznikem rakoviny vyvolané v důsledku působení oxidačního stresu. Navíc bylo prokázáno, že u některých typů solidních nádorů dochází ke zvýšené expresi výsledného proteinu NQO1. Tento fakt nabízí možnost využití NQO1 jako bioaktivátoru léků určených k léčbě rakoviny.

Polymorfismus genu *NQO1* C609T působí snížení stability výsledného enzymu NQO1, následně dochází k jeho rozpadu a tím i ztrátě jeho funkcí. Z tohoto důvodu mohou mít nositelé tohoto polymorfismu zvýšené riziko vzniku rakoviny.

## 2 Gen *NQO1*

Lidský *NQO1* je gen, který patří do skupiny cytoprotektivních genů. Gen je lokalizován na 16. chromozomu (lokus 16q22.1), obsahuje 2448 nukleotidů a kóduje 274 aminokyselin s výsledným proteinem o molekulové hmotnosti 30880 Da. Jedná se o strukturní gen se šesti exony a pěti introny, jehož výsledným translačním produktem je enzym NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza 1 (Jaiswal et al., 1998; Vasiliou et al., 2006).

### 2.1 Genová exprese *NQO1*

Expresí genu *NQO1* je indukována společně s dalšími geny detoxikačních enzymů v odpovědi na oxidační stres, xenobiotika, elektrofilny, těžké kovy a radiaci (Venugopal and Jaiswal, 1998). *NQO1* je exprimován v mnoha tkáních a jeho exprese je regulována prvkem antioxidantní odezvy (ARE), sekvencí umístěnou v promotoru genu, jak v základním stavu, tak i při odpovědi na oxidační stres (Nioi and Hayes, 2004).



## 2.2 Regulace *NOQ1*

Regulace exprese genu je zajišťována signální drahou Nrf2-Keap1/ARE (Atia et al., 2014). Tato dráha hraje významnou roli jako regulátor obranných mechanismů buňky před elektrofilním a oxidačním stresem. Hlavními prvky v této signální dráhy jsou transkripční faktor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), který se váže na prvek antioxidantní odezvy (ARE) v regulačních oblastech cílového genu a Keap1 (Kelch ECH associating protein 1), který se jako represor váže na Nrf2 a tím zajišťuje jeho degradaci pomocí ubikvitin-proteazomového systému (Kansanen et al., 2013; Pastorek et al., 2015).

Za fyziologických podmínek je neaktivní Nrf2, lokalizovaný v cytoplazmě, navázaný s proteinem Keap1. Tímto komplexem se zajišťuje konstantní hladina Nrf2. Keap1 se na Nrf2 váže dvěma vazebnými místy, první vazba s vyšší afinitou zabezpečuje pevnou vazbu mezi Nrf2 a Keap1, druhá zajišťuje správnou orientaci proteinového komplexu. Vazba Keap1 na Nrf2 umožňuje konjugaci Cul3 E3 ligázy, která nasměruje proteinový komplex k degradaci proteazomem (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010; Pastorek et al., 2015).

V případě působení oxidačního stresu či xenobiotik na organismus dochází ke změně terciární struktury Keap1, která znemožní vazbu na Nrf2 a tím i jeho degradaci. Volný Nrf2 může být tím pádem aktivován a přecházet do jádra, kde se s dalšími proteiny váže na ARE a spouští expresi genu (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010; Pastorek et al., 2015).

## 3 NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza 1 (NQO1)

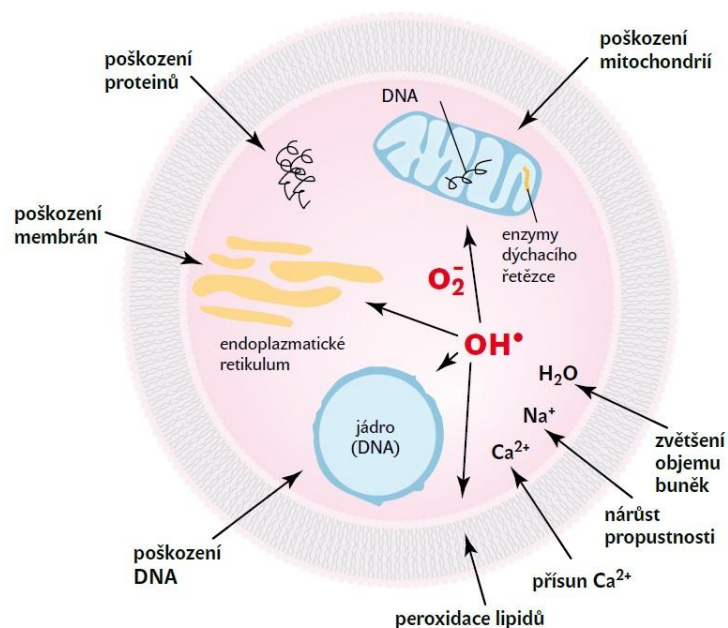
NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza 1 (EC 1.6.99.2), také nazývaná DT-diaforáza či NQO1, je cytosolický flavoprotein, který katalyzuje dvou nebo čtyř elektronovou redukci mnoha reaktivních chinonů na méně reaktivní formu hydrochinonů. Strukturně se jedná o homodimerní enzym s navázaným flavin adenin dinukleotidem (FAD) jako kofaktorem (Atia et al., 2014). Redukce elektronů, kterou NQO1 katalyzuje, pomáhá buňkám generovat vznik volných radikálů a tím chrání buňky před oxidačním stresem (Nebert et al., 2000). Enzym byl poprvé objeven v krysích tkáních a pojmenován jako DT-diaforáza v roce 1958 doktorem Ernsterem a Navaziem (Ernster and Navazio, 1958). Exprimuje se ve vysokých hladinách v různých epitelových tkáních, ale ne ve zdravých

hepatocytech (Atia et al., 2014). Z tohoto faktu vyplývá, že NQO1 se nepodílí na jaterním metabolismu xenobiotik (Hayes, 2008).

### 3.1 Funkce NQO1

Veškeré metabolické procesy v buňce probíhají při redoxní rovnováze. Po narušení této rovnováhy dochází ke vzniku oxidačního stresu (Halliwell and Gutteridge, 2015). Oxidační stres se definuje jako změna poměru volných radikálů (reaktivní formy kyslíku) a antioxidantních ochranných prostředků v organismu a může způsobit poškození tkání. Volné radikály vznikají v organismu jako nevyhnutelný vedlejší produkt mnoha biochemických procesů, v některých případech je však jejich vznik žádoucí, například u aktivovaných neutrofilů. Další příčinou vzniku volných radikálů je vystavení organismu různým xenobiotikům či elektromagnetickému záření (Betteridge, 2000).

Oxidační stres způsobuje mnoho chemických látek, které mohou zapříčinit snížení hladiny antioxidantů, zvýšení hladiny reaktivních forem kyslíkatých sloučenin a tak zvýšit hladinu reaktivních forem kyslíku (ROS) (Nakamura et al., 2000). Snížení hladiny antioxidantů nebo zvýšení ROS je škodlivé pro normální fungování buňky a může zapříčinit peroxidaci lipidů, snížení enzymové aktivity a poškození DNA (tvorba zlomů a DNA aduktů) viz obr. 1. Z tohoto důvodu se v buňce vyvinuly adaptivní programy genové exprese, které brání poškození buňky následkem oxidačního stresu. Program zahrnuje několik skupin genů, jejichž transkripci indukuje elektrofilní či oxidační stres. Tyto geny kódují: enzymy metabolizující xenobiotika, enzymy podílející se na obnově buněčných antioxidantů, systém reparace DNA, složky proteazomu, proteiny imunitního systému (Nioi and Hayes, 2004). Do této skupiny genů patří také gen *NQO1*, jehož translační produkt NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza 1 (NQO1) se podílí na ochraně buňky třemi způsoby: zajišťuje jednokrokovou detoxikaci chinonů, udržuje antioxidanty v jejich redukované a aktivní formě, reguluje stabilitu tumor supresorového proteinu p53 (Dinkova-Kostova and Talaly, 2000; Ross et al., 2000)



Obrázek 1.: Možné poškození buňky působením oxidačního stresu (volných radikálů) (Rokyta et al., 2011)

### 3.1.1 Detoxikace chinonů

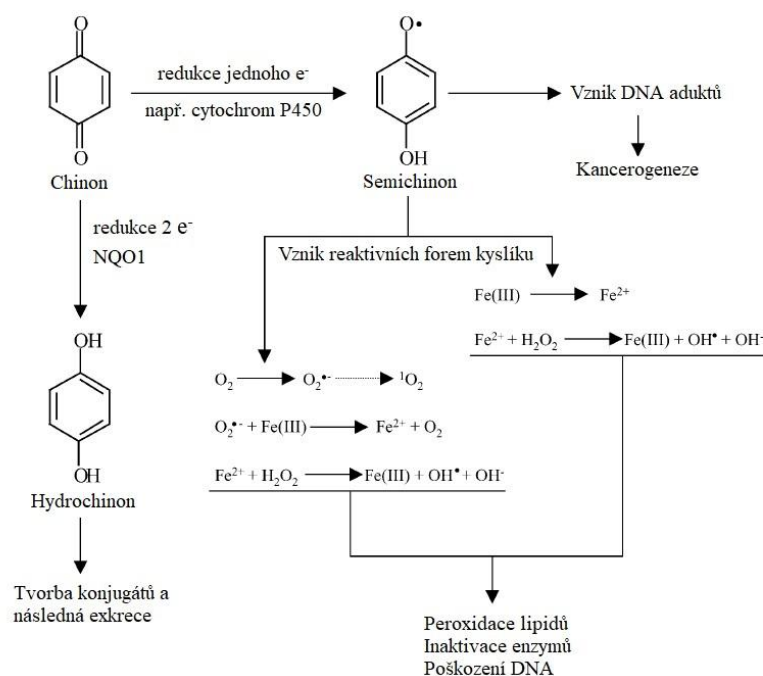
Nejlépe popsanou funkcí NQO1 je redukce reaktivních chinonů. V jedнокrokové reakci dochází na chinonech k redukcii dvou elektronů za vzniku hydrochinonů. Hydrochinonové produkty katalýzy NQO1 mohou být dále metabolizovány na glukoronidové a sulfátové konjugáty, čímž se usnadňuje jejich další vylučování z organismu (Dinkova-Kostova and Talaly, 2010).

Některé hydrochinony vzniklé katalýzou pomocí NQO1 však nemusí být stabilní. Vzniklé produkty tak mohou opět reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku semichinonů, které tvoří další reaktivní formy kyslíku (Cadedas, 1995).

Katalýza pomocí NQO1 funguje na principu ping-pong kinetiky. Prvním substrátem enzymové reakce je NAD(P)H, které se naváže na aktivní místo enzymu, kde dochází k jeho oxidaci na NAD(P)<sup>•</sup> za současné redukce flavinového kofaktoru enzymu FAD na FADH<sub>2</sub>. Po oxidaci dochází k uvolnění NAD(P)<sup>•</sup> z aktivního místa a navázání druhého substrátu (chinonu), který přijme elektrony od redukováného kofaktoru FADH<sub>2</sub> a tím dojde ke vzniku redukováného produktu (hydrochinonu) (Nioi and Hayes, 2004).

Chinony mohou podléhat také redukci jednoho elektronu, kterou katalyzuje například cytochrom P450. Produktem této reakce jsou vysoce reaktivní semichinony, obsahující volný elektron na atomu kyslíku. Tyto molekuly jsou schopné přímé reakce s buněčnými proteiny a DNA a způsobit jejich poškození (Joseph and Jaiswal, 1994). Semichinony jsou také schopné redukovat další molekuly zpět na chinony, které po získání jednoho elektronu enzymatickou reakcí, mohou vytvářet ROS jako je například singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ) nebo hydroxylový radikál ( $\bullet\text{OH}$ ). Nepárový elektron semichinonů může také zapříčinit redukcí železa a dochází tak ke vzniku Fentonovi reakce, způsobující vznik velice reaktivního hydroxylového radikálu. Z těchto faktů vyplývá, že semichinony a jejich další reakce v organismu mohou být příčinou vzniku rakoviny. Teoretický metabolismus jednoduchého chinonu je znázorněn na obrázku číslo 2 (Nioi and Hayes, 2004).

NQO1 vykazuje enzymovou aktivitu vůči řadě chemických látek včetně chinonů, chinoniminů, naftochinonů, azo a nitrosloučeninám a dalším. Tato skutečnost demonstruje význam NQO1 jako chemoprotektivního enzymu. Kromě redukce dvou elektronů je enzym schopný katalyzovat redukcí čtyř elektronů u azobarviv a nitrosloučenin (Dinkova-Kostova and Talaly, 2010).



Obrázek 2: Zobrazení schématu hypotetického metabolismu jednoduchého chinonu (1,4 - benzochinonu) (Nioi and Hayes, 2004).

Během několika posledních let se objevily významné biochemické důkazy o enzymové aktivitě NQO1 vůči metabolitům endogenních chinonů, zejména estrogen chinonů. Úloha NQO1 v ochraně buňky proti toxicitě estrogeních chinonů je katalýza dvou elektronové redukce vedoucí ke vzniku katecholových estrogenů, které mohou být konjugovány a vyloučeny. Tímto způsobem enzym přesměruje elektrofilní chinony z účasti na potencionálně škodlivých procesech vedoucím ke vzniku DNA aduktů, nebo k redukci jednoho elektronu a následnému vzniku semichinonů a dalších reaktivních kyslíkových intermediátů (Dinkova-Kostova and Talaly, 2010).

Další skupinou potencionálních endogenních substrátů NQO1 jsou chinonové deriváty dopaminu, L-3,4-dihydroxyfenylalaninu, norepinefrinu, epinefrinu a kyseliny 3,4-dihydroxyfenylactové včetně jejich příslušných metabolitů. Tyto chinony či reaktivní kyslíkové meziproducty inhibují proteazom a NQO1 tak chrání proti této inhibici (Zafar et al., 2006).

### 3.1.2 *Stabilizace antioxidantů*

NQO1 pomáhá také zachovat některé endogenní antioxidanty v jejich redukované a aktivní formě. Jedná se zejména o dva důležité antioxidanty rozpustné v tucích: ubichinon (koenzym Q) a  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) (Nioi and Hayes, 2004).

Ubichinon, který funguje hlavně jako elektronový přenašeč, působí také jako antioxidant zakotvený v buněčné membráně ve formě redukování ubichinolu. NQO1 zajišťuje redukci ubichinonu na ubichinol a tato reakce zvyšuje ochranu membrány před peroxidací lipidů (Beyer et al., 1996).

Dále bylo zjištěno, že enzym NQO1 vykazuje aktivitu vůči derivátu vitamínu E,  $\alpha$ -tokoferolchinonu. Redukce  $\alpha$ -tokoferolchinonu na  $\alpha$ -tokoferol-hydrochinon zajišťuje zvýšenou ochranu buněčné membrány (Siegel et al., 1997).

### 3.1.3 *Stabilizace proteinu p53*

Nádorový supresor, protein p53 tvoří důležitou součást ochrany genomu proti vnitřním a vnějším buněčným stresům. Potlačuje nádorovou transformaci buněk zajištěním regulace buněčného cyklu a indukci programované buněčné smrti (apoptózy) prostřednictvím transkripce závislých i nezávislých mechanismů (Shu et al., 2007). Za normálního stavu má protein velmi krátký poločas životnosti. Interaguje s proteinem

Mdm2, který působí jako E3 ubikvitin ligáza. Tato enzymatická reakce zajišťuje navázání ubikvitinu na p53 a tím protein nasměruje k jeho degradaci proteazomem. Tímto mechanismem se koncentrace proteinu v buňce udržuje na velmi malé hladině. V odpovědi na různé stresové signály, jako je hypoxie nebo poškození DNA, se protein stabilizuje, nedochází k interakci s Mnd2, jeho koncentrace se zvýší a dochází k jeho aktivaci jako transkripčního faktoru (Gong et al., 2007).

Bylo zjištěno, že se NQO1 váže na hlavní partikuly proteazomu 20S a tím může chránit proteiny s krátkým poločasem životnosti proti degradaci proteazomem. Toto zjištění poukazuje na funkci NQO1 jako stabilizátoru proteinu p53. Tento mechanismus však není dosud dobře prozkoumán a pochopen (Nioi and Hayes, 2004).

## 4 Polymorfismus *NQO1*

Pod pojmem polymorfismus rozumíme výskyt více než 2 variantních alel určitého genu s minimální frekvencí výskytu >1% v populaci. K tomuto jevu dochází převážně bodovou mutací v nukleotidové sekvenci DNA. Projevuje se jako záměna aminokyseliny v primární struktuře proteinu (Slabý, 2015).

Gen *NQO1* není vysoce polymorfním, do současnosti byly u člověka identifikovány pouze dvě polymorfní varianty genu, *NQO1*\*2 a *NQO1*\*3 (Maitland-van der Zee and Daly, 2012).

### 4.1 *NQO1*\*2

Alelová varianta *NQO1*\*2 vzniká substitucí thyminu za cytosin v nukleotidové pozici 609. Výsledkem této substituce je změna aminokyseliny prolinu za serin v poloze 187 (P187S). Záměnou dochází k výrazné změně ve fenotypu. Proteinový produkt translace je nestabilní a v důsledku toho dochází ke snížení hladiny výsledného enzymu (Dunna et al., 2011). Varianta *NQO1*\*2 enzymu je velice nestabilní a téměř okamžitě podléhá degradaci proteazomem (Siegel et al., 2001). Z tohoto faktu vyplývá, že u homozygotní varianty genotypu (*NQO1*\*2/\*2) je hladina enzymu v podstatě nulová. U homozygotní varianty (*NQO1*\*1/\*2) je tato hladina významně snížena (Ross and Siegel, 2004). Frekvence výskytu variantní alely v populaci se liší v závislosti na etniku (viz tab. 1) (Kelsey et al., 1997)

Tab. 1: Genotypová frekvence NQO1 u různých etnických skupin (Kelsey et al., 1997).

<b>etnikum</b>	<b>NQO1*1/*1</b>	<b>NQO1*1/*2</b>	<b>NQO1*2/*2</b>	<b>Frekvence alel (NQO1*1)/(NQO1*2)</b>
europoidní (n=114)	<b>64 (56,1%)</b>	<b>45 (39,5%)</b>	<b>5 (4,4%)</b>	<b>(0,75)/(0,25)</b>
mexicko-hispánské (n=161)	<b>52 (32,3%)</b>	<b>84 (52,2%)</b>	<b>25 (15,5%)</b>	<b>(0,57)/(0,43)</b>
afro-americké (n=136)	<b>83 (61,0%)</b>	<b>46 (33,8%)</b>	<b>7 (5,2%)</b>	<b>(0,78)/(0,22)</b>
asijské (n=118)	<b>37 (31,4%)</b>	<b>57 (48,3%)</b>	<b>24 (20,3%)</b>	<b>(0,56)/(0,44)</b>

#### 4.2 NQO1\*3

Další varianta alely *NQO1* vzniká substitucí jednoho nukleotidu thyminu za cytosin v nukleotidové pozici 465 a je označován jako *NQO1*\*3. Substituce v tomto případě vede k záměně aminokyseliny argininu za tryptofan v poloze 139 (R139W). Produktem této alely je enzym, který postrádá vazebné místo pro chinon a tím je jeho aktivita závislá na povaze substrátu. (Atia et al., 2014). Frekvence výskytu alely v populaci je relativně nízká a pohybuje se v rozmezí 0-5% v závislosti na etniku s minimálním až nulovým výskytem homozygotní varianty (Gaedigk et al., 1998).

#### 4.3 Onemocnění spojená s polymorfismem NQO1

Jelikož je NQO1 spojován s detoxikací některých endogenních a exogenních chinonů, zdá se velmi pravděpodobné, že snížená aktivita NQO1, způsobená jeho genetickým polymorfismem, zvyšuje riziko vzniku rakoviny a toxicity chinonů na organismus. Souhrnně klinické studie dokládají, že zvýšená aktivita enzymu NQO1 opravdu může napomáhat snižovat rizika spojená s expozicí toxickými látkami z životního prostředí (například benzen, cigaretový kouř, produkty neúplného spalování) a snižuje riziko vzniku některých typů rakoviny (Moran et al., 1999, Nebert et al., 2002).

#### 4.3.1 Toxické účinky benzenu

Po absorpci probíhá metabolismus benzenu převážně v jaterních buňkách, kde dochází k jeho katalýze oxygenázovým systémem cytochromu P450. Z této reakce vzniká fenol, hydrochinon, katechol a benzen-1,2,4-triol. Tyto metabolity jsou schopné přecházet do kostní dřevě, kde se hromadí a podléhají autooxidaci nebo aktivaci peroxidázami za vzniku chinonů, které pravděpodobně patří mezi konečné metabolity benzenu (Moran et al., 1999).

Tyto metabolity, při nedostatečné aktivitě NQO1, mohou vést k různým formám krevní dyskrázie. Mohou způsobit progresivní leukocytopenie, anémie, trombocytopenie a také pancytopenii. Metabolity benzenu jsou také spojovány se vznikem myelodysplastického syndromu (MDS) a následného rozvoje leukemie (Nebert et al., 2002).

#### 4.3.2 Další rizika vzniku onemocnění spojená s polymorfismem NQO1

Rizika spojená s expozicí benzenem jako je hematologická toxicita a možný následný vznik malignit však nejsou jediným nebezpečím spojeným s polymorfismem *NQO1*\*2. Díky populačním studiím byla zjištěna korelace u homozygotních jedinců *NQO1*\*2/\*2 se zvýšeným rizikem vzniku renálního karcinomu, uroteliálního karcinomu a vyšší náchylnosti ke tvorbě ledvinových kamenů (Schulz et al., 1997; Schulz et al., 1998; Yang et al., 2015).

Další významná korelace byla nalezena u rakoviny plic, zejména u nemalobuněčného karcinomu. Korelace se vztahovala na kuřáky a bývalé kuřáky, nebyla však prokázána u pacientů, kteří nikdy nekouřili. Tato korelace se zdá být v souladu s vysokou aktivitou NQO1 v plicní tkáni, poukazující na její význam při detoxikaci karcinogenů v cigaretovém kouři (Lewis et al., 2001; Yamamoto et al., 2017).

U bazocelulárního karcinomu byla nalezena slabá korelace u pacientů s *NQO1*\*2/\*2, zejména v kombinaci s nulovou alelou genu *GSTT1* (Clairmont et al., 1999).

Všechny tyto studie však vykazovaly malý statistický soubor se zaměřením převážně na jednu etnickou skupinu. Z toho vyplývá, že získané výsledky mohou postrádat statistickou významnost a nemusí být extrapolované na všechny etnické skupiny (Nebert et al., 2002; Yamamoto et al., 2017).



Metaanalýzy publikované v posledních letech navíc dokázali zvýšené riziko vzniku kolorektálního karcinomu u jedinců s polymorfismem *NQO1*\*2 v asijské a kavkazské populaci (Zheng et al., 2014). Potvrdily také zvýšenou náchylnost jedinců s polymorfismem *NQO1*\*2 k rakovině prsu u kavkazské populace (Peng et al., 2014).

## 5 Chemoterapeutický význam NQO1

Experimentální výzkum jaterní karcinogeneze u krys ukázal charakteristické změny v genové expresi některých proteinů. Do této skupiny patří také protein NQO1, u něhož dochází ke zvýšené expresi, která pravděpodobně zajišťuje adaptaci nádoru na stres a rezistenci vůči cizorodým látkám, včetně léků (Nioi and Hayes, 2004).

V lidské populaci byla nadměrná exprese (>60%) NQO1 prokázána v mnoha typech solidních nádorů, například u nádorů nadledvinek, prsu, tlustého střeva, močového měchýře, jater, vaječníků, děložního čípku, slinivky, plic a štítné žlázy (Oh and Park, 2015; Srijiwangsa and Na-Bangchang, 2017). Vysoká hladina NQO1 u těchto typů nádorů tak otevírá možnosti využití NQO1 jako enzymu řídicího bioaktivaci léčiva, produkujícího alkylační metabolity (Ross et al., 2000).

### 5.1 Bioreaktivní alkylační činidla

Léčiva, jejichž produktem mohou být po redukci alkylační metabolity, se nazývají bioreaktivní alkylační činidla. V závislosti na chemické povaze těchto sloučenin je výsledkem redukce vytvoření alkylační látky nebo reaktivních forem kyslíku. Selektivní toxicita těchto činidel pro nádory byla založena na předpokladu, že hypoxické buňky v okolí nekrotického jádra nádoru mají větší sklon k redukčnímu metabolismu. Enzymem řízené protinádorové léčivo tak využívá k bioaktivaci enzymy, které jsou ve srovnání se zdravou tkání v nádorech exprimovány ve vysokých hladinách. Vývoj chinonů, které mohou být efektivně bioaktivovány pomocí NQO1 se zaměřuje převážně na některé skupiny benzochinonů a indolchinonů. (Ross et al., 2000).

### 5.1.1 Chinonové substráty pro NQO1

Do skupiny protinádorových léčiv, které jsou substrátem pro NQO1, se v současnosti řadí mitomycin C,  $\beta$ -lapachon a benzochinon ansomyciny (Oh and Park, 2015).

### 5.1.2 Mitomycin C

Mitomycin C (MMC) je chinon obsažený v antibiotiku izolovaném ze *Streptomyces caespitosus* a více jak 30 let se používá při léčbě solidních nádorů, včetně rakoviny prsu, plic, slinivky a žaludku. Mechanismus účinku mitomycinu C je intracelulární bioreduktivní aktivace, která vede ke vzniku kovalentních vazeb na šroubovici DNA, které zamezí další replikaci a transkripci a tím dojde ke smrti buňky (Siegel et al., 2012).

Biochemické a buněčné experimenty jasně dokazují, že NQO1 může zajistit bioaktivaci mitomycinu C. S přihlédnutím však na množství faktorů, které mohou ovlivnit nádorovou odpověď na MMC, včetně buněčného pH, koncentrace kyslíku, přítomnost dalších bioreduktivních enzymů, tak i enzymů zajišťujících reparaci kovalentních vazeb na DNA, nemusí být genotyp NQO1 nebo množství proteinu NQO1 samo o sobě dobrým ukazatelem odpovědi na léčbu MMC (Siegel et al., 2012).

### 5.1.3 $\beta$ -lapachon

Dalším chinonem, je přirozeně se vyskytující  $\beta$ -lapachon, izolovaný z kůry stromu *Tabebuia avellanae*. Po aktivaci  $\beta$ -lapachonu enzymem NQO1 dochází k rychlému vzniku peroxidu vodíku a superoxidu a díky této vlastnosti chinon vykazuje významné antibakteriální, proti plísňové a proti parazitární účinky. Pokusy dokázaly, že  $\beta$ -lapachon může u savčích buněk inhibovat reparační mechanismy DNA prostřednictvím blokace topoizomerázy I. třídy. V současnosti se provádí klinické testování  $\beta$ -lapachonu jako léku na rakovinu (Oh and Park, 2015).

#### **5.1.4 Benzochinon ansomyciny**

Tato skupina látek obsahuje chinony včetně geldamycinu (GA), který se získává izolací ze *Streptomyces hygroscopicus*. Po bioaktivaci NQO1 vykazuje GA inhibiční účinek na replikaci DNA a RNA. Dalším prokázaným účinkem GA a jeho analogů bylo potlačení enzymatické aktivity proteinu tepelného šoku (Hsp90). Hsp90 se podílí na tvorbě některých významných onkogenních proteinů podílejících se na růstu a tvorbě rakoviny (Siegel et al., 2012).

#### **5.2 Upregulace NQO1 v chemoterapii**

Výhodou cytotoxického působení protinádorových léčiv je přednostní poškození nádorových buněk vůči zdravým buňkám, a to v případě, jeli enzym NQO1 v nádorových buňkách upregulován nebo nadměrně exprimován (Oh and Park, 2015).

V nedávně době se zjistilo, že ionizující záření podané v klinicky významných dávkách zvyšuje regulaci hladiny proteinu NQO1 v nádorových buňkách a navíc zvyšuje buněčnou citlivost na  $\beta$ -lapachon. Pokud je tedy buňka, která exprimuje NQO1, vystavena ionizujícímu záření spolu s  $\beta$ -lapachonem, dochází ke ztrátě membránového potenciálu mitochondrií a následné apoptóze (Park et al., 2011).

Také se ukázalo, že zahřátí buněk in vitro na teplotu 41 - 42 °C zvýší enzymatickou aktivitu NQO1 při současné stabilizaci enzymu proteinem tepelného šoku 70 (Hsp70) a dochází tak ke zvýšené citlivosti na  $\beta$ -lapachon (Dong et al., 2009).

Tyto údaje naznačují možnost docílit pomocí upregulátorů NQO1 zvýšení citlivosti a selektivnosti chemoterapeutik a jsou zahrnuty v současnosti probíhajících klinických testech  $\beta$ -lapachonu samotného i v kombinaci s jinými léky (Oh and Park, 2015).

#### **5.3 Význam polymorfismu NQO1\*2 v chemoterapii**

Zatím nejsou doloženy žádné studie, které by zkoumaly význam polymorfismu NQO1\*2 při využití bioreaktivních alkylačních činidel pro léčbu rakoviny (Siegel et al., 2012).

V současné době se zkoumá využití DCPIP (2,6-dichlorfenolindofenol), jako farmakologického prostředku pro modulaci oxidačního stresu v buňce u homozygotních

*NQO1*\*2 pacientů s rakovinou prsu. U těchto jedinců vykazovalo DCPIP významnou protinádorovou aktivitu (Cabello et al., 2011).

## **6 Laboratorní vyšetření polymorfismu *NQO1***

Jednoduchým způsobem typizace alel *NQO1* je použití polymerázové řetězové reakce a polymorfismu délky restričních fragmentů (PCR-RFLP). Tato metodika se používá pro detekci polymorfismu *NQO1*\*2, čili substituce thyminu za cytosin v nukleotidové pozici 609. Použití této metodiky je vhodné jako rychlý screening DNA v populačních studiích, který je běžně využíván v laboratořích po celém světě (Nebert et al., 2002).

### **6.1 Materiál a odběr pro analýzu DNA**

K provedení genetického vyšetření je nutné odebrat vzorek tkáně pacienta, ze kterého se následně izoluje DNA. K těmto účelům lze využít jakýkoliv materiál, obsahující buňky s nepoškozeným jádrem (Kočárek, 2007).

Nejčastěji používaným materiálem jsou leukocyty získané odběrem venózní krve pacienta. V průměru se odebírá 5-10 ml krve. Vzorek se mísí s chelatačním činidlem a tím se brání jeho sražení. Nejběžněji používaným činidlem je EDTA (kyselina etylendiaminotetraoctová). Odebraný vzorek krve lze transportovat při pokojové teplotě a uchovávat několik dní při teplotě 4 °C. U delšího skladování je krev možné zamrazit na -20 °C a izolaci nukleových kyselin provést později. Pro využití leukocytů k izolaci DNA existují tyto kontraindikace: předchozí transfuze, transplantace kostní dřeně. V těchto případech v odebraném vzorku přítomna cizí DNA a tím dochází k jeho kontaminaci. Další kontraindikací je intenzivní léčba pacienta cytostatiky, kdy dochází k enormnímu snížení počtu leukocytů v periférii. V těchto případech je vhodné k analýze DNA indikovat odběr jiného materiálu (Kočárek, 2007; Slabý, 2015).

Další významnou metodou je stěr epiteliálních buněk z ústní sliznice. Odběr se provádí vatovým tamponem z vnitřní strany tváře (bukální stěr). Největší výhodou této metody je její neinvazivnost (Kočárek, 2007).

Při odběru materiálu pro genetické vyšetření je nutné, aby odběr provedl proškolený a odborný pracovník. Pacient musí být vždy informován o vyšetření a musí poskytnout informovaný souhlas s prováděným vyšetřením (Kočárek, 2007).

## 6.2 *Izolace DNA*

Izolace DNA je proces, při kterém se získají čisté molekuly DNA a provádí se extrakcí z buněčného jádra nebo mitochondrií (Beránek, 2016; Kuciel a Urban, 2016). Postup závisí na charakteru daného materiálu. Pokud se jedná o tkáň či buněčné kultury, vzorek se musí před vlastní izolací homogenizovat. V případě volných buněk (např. leukocyty, kostní dřeň) se homogenizace neprovádí (Kočárek, 2007)

Pro izolaci DNA se nejprve provede rozrušení buněčných membrán (lýza buněk). K této lýze se používá detergent obsažený v lyzačním pufru. Nejběžnější detergenty, které se využívají, jsou Triton X-100 a dodecylsírany sodný (SDS). Lyzační pufr obsahuje také EDTA, která vyvázáním  $\text{Ca}^{2+}$  iontů inaktivuje enzymy nukleázy, které se běžně nachází v buněčné cytoplazmě a štěpí nukleové kyseliny. Pokud by k rozštěpení DNA nukleázami došlo, nebyla by možná další genetická analýza (Kočárek, 2007).

Po uvolnění DNA do lyzačního pufru dochází k její precipitaci v polárním prostředí. DNA je následně vysušena a rozpuštěna ve vodě. Vodný roztok DNA je připraven k vlastní analýze nebo může být skladován, po krátkou dobu při 4 °C nebo dlouhodobě při -20 °C či -80 °C (Slabý, 2015).

Běžně používanou technikou izolace DNA je fenol-chloroformová metoda založená na principu denaturačních a inhibičních účinků organických rozpouštědel. Tato metoda však představuje zdravotní a bezpečnostní riziko (Slabý, 2015; Beránek, 2016).

Další běžně využívanou technikou je vysolovací metoda, která využívá působení vysoce koncentrovaných roztoků solí. Výhodou této techniky je práce bez přítomnosti organických rozpouštědel (Beránek, 2016).

V současnosti se běžně používají komerční kity, které využívají adhezivní schopnosti molekul DNA k pevným částicím silikátu v roztoku solí, zajišťující vhodné pH a iontové síly. Po navázání nukleových kyselin na částice silikátu dochází k promytí a následnému uvolnění DNA pomocí změny pH a iontové síly (Slabý, 2015).

### 6.3 Měření koncentrace DNA

Před dalším vyšetřením DNA je vhodné stanovit koncentraci a čistotu izolátu nukleových kyselin. Nejjednodušší metodou je měření absorbance v ultrafialové oblasti. Nukleové kyseliny absorbují maximum záření při vlnové délce 260 nm a míra absorbance při této vlnové délce odpovídá koncentraci DNA v měřeném vzorku (Kočárek, 2007; Slabý, 2015).

Tuto metodu lze také využít pro stanovení míry kontaminace izolátu DNA proteiny, které mají absorpční maximum při vlnové délce 280 nm. Stanovením poměru obou absorbancí (poměr  $A_{260}/A_{280}$ ) se tak zjistí míra znečištění vzorku. V ideálním případě by se měla hodnota poměru pohybovat v rozmezí 1,8-2,0. Hodnoty, které jsou nižší než 1,75 poukazují na vysoké znečištění vzorku a je proto v tomto případě vhodné izolát DNA opětovně purifikovat (Kočárek, 2007).

V běžné laboratorní praxi se k měření koncentrace nukleových kyselin používají dvě metody. Jejich použití závisí na předpokládané čistotě vzorku a na koncentraci vyizolované DNA (Kočárek, 2007).

Spektrofotometrická metoda využívá přímé stanovení v oblasti UV-záření. Užívá se, pokud koncentrace DNA dosahuje alespoň 25 mg/l a vzorek neobsahuje významné množství kontaminantů (proteiny, fenol atd.). Koncentraci DNA lze u této metody vypočítat z míry absorpce UV-záření (optické denzity) analyzovaného vzorku (Kočárek, 2007).

Fluorimetrická metoda se naopak využívá v případech, kdy koncentrace vzorku nedosahuje hodnot 25 mg/l, nebo je ve vzorku velké množství kontaminantů. U této metody se do vzorku přidává fluorescenční barvivo, nejčastěji se využívá ethidiumbromid, který se váže na DNA. Koncentrace se pak stanovuje z intenzity fluorescence emitované barvivem. Tato metoda je schopná stanovit i nepatrné množství DNA ve vzorku (detekuje až 1-5 ng/l DNA) (Kočárek, 2007).

V současné době spektrofotometry využívané k měření koncentrace DNA běžně generují veškeré hodnoty automaticky včetně přepočtu u ředěných vzorků. Nejmodernější přístroje umožňují dokonce nanášet malé množství vzorku přímo, do místa k vyústění optického vlákna analyzátoru. Povrchové napětí je schopné udržet vzorek na správném místě v průběhu analýzy a díky tomu odpadá použití kyvet a předchozí ředění vzorku (Slabý, 2015).

#### 6.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR – Polymerase Chain Reaktion) se řadí mezi základní molekulárně-genetické metody a umožňuje *in vitro* amplifikaci cílové sekvence DNA během několika hodin v násobcích miliardy (Nussbaum et al., 2004; Kuciel a Urban, 2016).

Tato metoda byla poprvé k laboratorním účelům použita v roce 1985 doktorem Kary Mullisem a jeho pracovním týmem v biotechnologické firmě Cetus Corporation sídlící v Kalifornii. Doktoru Mullisovi byla za objev metody PCR v roce 1993 udělena Nobelova cena (Kočárek, 2007).

Princip PCR spočívá v cyklicky se opakující enzymové reakci, při níž dochází k syntéze nových řetězců specifické sekvence dvouvláknové DNA ve směru 5'-3' pomocí DNA-polymerázy. Požadovaný úsek sekvence nukleotidů je ohraničen pomocí připojení dvou primerů (úseky DNA o známé sekvenci, obsahující 20-25 nukleotidů). Je důležité, aby cílová sekvence, jež primery hybridizují, byla specifická pro oblast, která má být amplifikována a nevyskytovala se také v jiných úsecích DNA. Primery se navážou na protilehlé řetězce DNA tak, aby jejich 3'- konce směřovaly proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů do vzorku začne probíhat syntéza nových vláken DNA na obou matricových řetězcích protisměrně (Šmarda et al., 2005; Kočárek, 2007).

Pro syntézu DNA se využívá termostabilní polymerázy získané z termofilních mikroorganismů. Příkladem je *Taq*-DNA-polymeráza, která se izoluje z bakterie *Thermus aquaticus* obývajících horké prameny. Dokáže tak odolávat teplotám až 95 °C, při které dochází k denaturaci DNA. Tím je umožněna cyklicky se opakující syntéza požadované sekvence nukleotidů (Šmarda et al., 2005; Pritchard a Korf, 2007).

Prvním krokem pro amplifikaci DNA metodou PCR je příprava chemikálií. Z praktického hlediska je vhodné připravit směs pro PCR ve dvou složkách. Nejprve se připraví „master mix“, což je směs chemikálií pro více vzorků. Směs obsahuje vodu, pufr pro *Taq* polymerázu, deoxynukleotidové trifosfáty (dNTP), přímý a zpětný primer, *Taq* polymerázu, MgCl<sub>2</sub>, KCl a Tris-HCl. Druhou složku tvoří vodný roztok izolátu DNA. Po spojení obou složek je důležité řádné promíchání směsi špičkou pipety (Kuciel a Urban, 2016).

Přístroj, který umožňuje cyklickou amplifikaci DNA, se nazývá termální cycler. Tento přístroj dokáže velmi rychle měnit teplotu ve vložených mikrozkuškových vzorky DNA. Základní částí cycleru je termální blok, který je uložen pod víkem.

Přístroj je ovládán pomocí tlačítek a displeje, na kterém se zobrazuje fáze cyklu, aktuální cyklus, čas a teplota (Kuciel a Urban, 2016).

#### 6.4.1 Průběh PCR reakce

PCR reakce probíhá v cycleru pomocí inkubace vzorků při třech různých teplotách odpovídající třem krokům jednoho amplifikačního cyklu. Tyto kroky jsou: denaturace, annealing a elongace (Kuciel a Urban, 2016).

##### **Denaturace**

Během denaturace dochází k rozpojení dvouvláknové DNA zahřátím na teplotu 90-95 °C. První denaturace probíhá v časovém intervalu 8-9 minut, aby došlo k rozpojení všech vláken DNA. Během dalších cyklů probíhá krok denaturace 15-30 vteřin (Kuciel a Urban, 2016).

##### **Annealing**

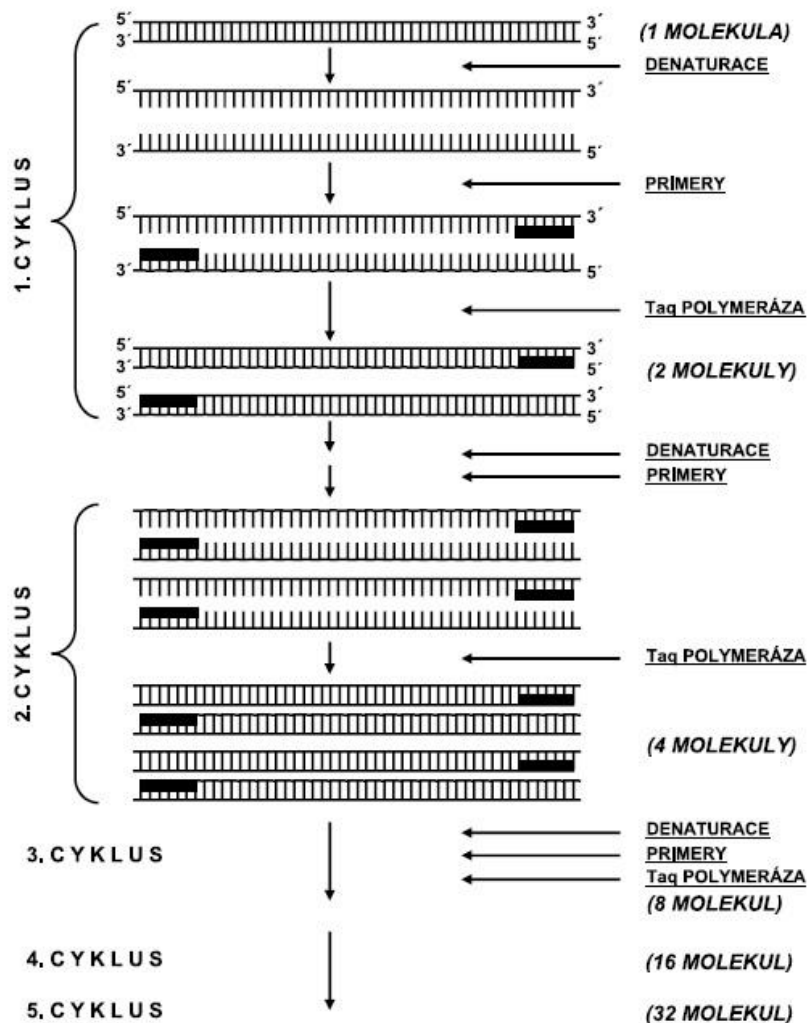
Při annealingu dochází k hybridizaci komplementárních primerů na přesné místo templátové DNA. K připojování primerů dochází při teplotě 60-65 °C a probíhá v rozmezí 15-30 vteřin (Kuciel a Urban, 2016).

##### **Elongace**

V průběhu elongace dochází k vlastní replikaci nukleové kyseliny pomocí *Taq* polymerázy na úseku vymezeném připojenými primery. Tento krok probíhá po dobu 30-60 vteřin při teplotě 68-72 °C. Závěrečná elongace je prodloužena na dobu 6 minut (Kuciel a Urban, 2016).

Tyto tři kroky se opakují většinou během třiceti cyklů a v průběhu této doby se fragment DNA namnoží v milionech kopií. Průběh amplifikace fragmentu DNA je znázorněn na obrázku č. 3. Po ukončení cyklů se vzorky s PCR produktem uložené v cycleru začnou chladit na teplotu 4 °C. Takto chlazený vzorek lze uchovávat v chladničce. Před další analýzou je nutné zkontrolovat amplifikaci PCR produktu pomocí elektroforézy na agarózovém gelu (Kuciel a Urban, 2016).





Obrázek 3: Průběh amplifikace DNA pomocí PCR metody (Otová a Mihalová, 2012).

#### 6.4.2 Optimalizace PCR metody

Optimalizací PCR se rozumí výběr a testování ideálních parametrů, které ovlivňují průběh reakce. Do kategorie těchto parametrů spadají: složení reakční směsi, teplotní a časový interval. Optimalizace se provádí nejen při sestavování nové PCR, ale také při zavádění metodiky převzaté z odborné literatury, a to z důvodu rozdílných podmínek konkrétních laboratoří (Kuciel a Urban, 2016).

### 6.4.3 *Nevýhody PCR metody*

Metoda PCR může mít však několik nevýhod. První je délka templátu, jelikož není možné amplifikovat dlouhé fragmenty DNA. Dále je nutná znalost přesné sekvence úseků (primerů), které ohraničují požadovaný úsek DNA. Další významnou nevýhodou je možný vznik nepřesné replikace. Při tomto jevu dochází na amplifikovaném vlákně ke vzniku mutací, které nejsou opravovány a tak se mutace dále množí spolu s nově vznikajícími vlákny. A v neposlední řadě je nutné zajistit absolutní čistotu analyzovaného vzorku (Pritchard a Korf, 2007). Vzhledem k vývoji molekulární biologie jsou dnes už běžně dostupné polymerázy umožňující amplifikovat poměrně dlouhé úseky DNA o velikosti 1 kbp, se schopností opravovat chyby vzniklé při replikaci, které si poradí i s méně kvalitními vzorky DNA.

### 6.4.4 *Význam PCR metody*

Význam PCR spočívá ve schopnosti metody poskytnout velké množství genových úseků o specifické sekvenci, které lze dále analyzovat. Použití primerů zajišťuje jednoznačné vymezení konkrétní oblasti genů, nebo naopak vymezení mnohočetné oblasti, například exonů. Metoda se využívá pro odhalování genetických onemocnění, stanovení klinické diagnózy a prognózy, pro forenzní analýzy, detekci patogenů (Pritchard a Korf, 2007; Kuciel a Urban, 2016).

## 6.5 *Elektroforéza*

Jako základní metoda pro separaci PCR produktů nebo jejich rozštěpených fragmentů se používá elektroforéza. Separace probíhá na základě rozdílné velikosti (počtu párů bází) analyzovaných molekul. Elektroforéza využívá k detekci agarósový gel, který umožňuje rozdělení fragmentů o velikosti méně než 100 bp až 25 kbp (Kuciel a Urban, 2016).

Agaróza se pro tyto účely získává z mořských řas rodu *Gelidium* a *Gracilaria*. Díky obsahu opakujících se jednotek agarobiózy dochází během tuhnutí gelu k nekovalentní asociaci agarózových polymerů, které vytvářejí síť svazků a určují tak velikost pórů gelu (Kuciel a Urban, 2016).

Agarózový gel se připravuje utuhnutím rozpuštěné agarózy ve formě ploché destičky obsahující na jedné straně řadu jamek, které slouží ke vkládání vzorků DNA. V průběhu elektroforézy prochází gelem stejnosměrný proud, zajišťující migraci negativně nabitých fragmentů DNA k anodě. Jelikož je velikost náboje u fragmentů DNA stejná, je migrace fragmentů založena na nepřímé úměře molekulární hmotnosti (počtu bází) ke vzdálenosti pohybu. Stupeň migrace gelem určuje: koncentrace agarózy v gelu, konformace DNA, vlastní velikost fragmentu DNA, typ použité agarózy a elektroforetického pufru (Pritchard a Korf, 2007; Kuciel a Urban, 2016).

Pro vizualizaci fragmentů DNA se při gelové elektroforéze využívá fluorescenčního barvení agarózových gelů (např. pomocí ethidiumbromidu) a jejich následného zviditelnění UV světlem (Kuciel a Urban, 2016).

## **6.6 Restrikční štěpení pomocí metody RFLP**

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) je metoda umožňující detekovat rozdíly v homologních sekvencích DNA. Tyto rozdíly jsou zjišťovány díky přítomnosti fragmentů DNA o různých délkách a jsou následkem specifického působení enzymů - restrikčních endonukleáz na DNA v testovaném vzorku (Kuciel a Urban, 2016).

Restrikční endonukleázy jsou enzymy získané izolací z bakterií, díky nimž jsou bakterie schopné štěpit DNA exogenního původu (zejména virovou DNA). Základní vlastností těchto enzymů je schopnost štěpit DNA ve specifické sekvenci nukleotidů. Endonukleáza je schopna rozpoznat sekvenci o velikosti 4-8 nukleotidů, nazývanou restrikční místo, a v tomto bodě DNA rozštěpit. Velikost rozštěpených fragmentů závisí na počtu restrikčních míst v molekule DNA. V současnosti se využívá přibližně 2500 restrikčních endonukleáz, které štěpí DNA asi na 250 restrikčních místech. Názvy těchto enzymů vycházejí vždy z názvu bakterie, ze které se izolují (Kuciel a Urban, 2016).

### 6.6.1 *Princip metody PCR RFLP*

Po amplifikaci příslušné sekvence genomové DNA se provádí štěpení specifickou restriční endonukleázou. Vzniklé fragmenty DNA jsou separovány a detekovány na agarózovém gelu pomocí elektroforézy (Kuciel a Urban, 2016).

Reakční směs pro restriční štěpení obsahuje reakční pufr, restriční endonukleázu a destilovanou vodu. Směs se jemně promíchá se vzorky DNA a následně probíhá inkubace, většinou při teplotě 37 °C. Doba inkubace závisí na doporučení výrobce enzymu. Po dokončení inkubace se vzorky aplikují pipetou na připravený agarózový gel a spustí se elektroforéza. Časový interval trvání elektroforézy závisí na několika faktorech jako je délka fragmentů či koncentrace agarózy v gelu. Po ukončení elektroforetické separace se gel přenesse na desku transluminátoru, kde se výsledné štěpení hodnotí pod UV světlem. Pro zhodnocení velikosti jednotlivých fragmentů se používá komerčně dostupný tzv. hmotnostní marker, který obsahuje fragmenty o známé velikosti (Kuciel a Urban, 2016).

## 7 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

- praktické zvládnutí metodiky analýzy polymorfismu genu *NQO1* zahrnující izolaci genomové DNA z periferní krve a bukalního stěru, měření koncentrace DNA, metodu PCR-RFLP, gelovou elektroforézu, analýzu výsledků a jejich zhodnocení;
- vypracování odborné rešerše na toto téma čerpající z dostupných publikací a rozšíření si znalostí týkající se této problematiky.

## 8 Praktická část

Praktickou část ke své bakalářské práci jsem vykonala v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích pod vedením a odborným dohledem Mgr. Dagmary Bystřické, Ph.D. Veškerou práci v laboratoři jsem prováděla po řádném seznámení s bezpečnostním a provozním řádem laboratoře a za použití ochranných pomůcek.

Analýza genu *NQOI* zahrnovala stanovení alelové varianty *NQOI*\*2, která vzniká substitucí thyminu za cytosin v nukleotidové pozici 609, a nemutované varianty genu *NQOI*\*1 (Wild type). Stanovení alelové varianty *NQOI*\*3, způsobené substitucí thyminu za cytosin v nukleotidové pozici 465, se z důvodu nízké prevalence výskytu v genetických laboratořích běžně neprovádí.

Součástí praktické části byla izolace DNA z bukálního stěru a periferní krve, stanovení koncentrace izolované DNA, vlastní analýza polymorfismu genu *NQOI* pomocí metody PCR-RFLP a gelové elektroforézy.

### 8.1 Popis souboru

Během jednoho roku (duben 2017 – březen 2018) bylo v laboratoři vyšetřeno celkem 120 pacientů s požadavkem na stanovení polymorfismu genu *NQOI*. Soubor obsahoval dospělé jedince pocházející z České republiky.

### 8.2 Izolace DNA

Primárním krokem při molekulárně genetické analýze je izolace DNA, která může být izolována z epitelíí ústní dutiny získaných bukálním stěrem, nebo z leukocytů získaných odběrem periferní krve. Odběr periferní krve provádí školený pracovník na odborném pracovišti, bukální stěr provádí pacient sám, dle instrukcí výrobce, přiložených ke každé odběrové sadě.

U všech 120 vzorků byla DNA izolována z bukálního stěru. U několika vzorků izoláty DNA obsahovaly velmi nízké koncentrace nukleových kyselin, z toho důvodu byl u těchto konkrétních pacientů požadován nový odběr. Dva pacienti z této skupiny

poskytli při opakovaném odběru periferní krev. Proto jsem izolaci DNA z periferní krve prováděla pouze u dvou vzorků.

### 8.2.1 *Izolace DNA z bukalního stěru*

Pro izolaci genomové DNA z bukalního stěru jsem použila izolační kit DNA Isohelix Isolation kit: DDK-3/DDK-50 dle doporučení výrobce. Seznam reagensií, které jsou součástí izolačního kitu Isohelix včetně podmínek skladování je uveden v tabulce 2. Seznam použitých přístrojů a spotřebního materiálu je uveden v tabulce 3.

Tab. 2: seznam reagensií izolačního kitu DNA Isohelix Isolation kit: DDK-3/DDK-50 a jejich skladování

<b>Reagencie:</b>	<b>Skladování:</b>
Lysis buffer LS	pokožová teplota
Proteinase K	Mrazicí box (-20 °C)
Capture buffer CT	pokožová teplota
Re-hydration buffer TE	pokožová teplota

Tab. 3: seznam použitých přístrojů a spotřebního materiálu použitého při izolaci DNA z bukalního stěru

<b>Přístroje:</b>	<b>Spotřební materiál:</b>
sada automatických pipet	1,5 ml mikrozkušavky
mini centrifuga/vortex	špičky a rukavice
centrifuga	
suchá lázeň	

Před vlastní izolací jsem nastavila suchou lázeň na teplotu 60 °C, vyndala jsem Proteinázu K z mrazicího boxu a nechala ji rozmrazit při pokojové teplotě. Pro každý vzorek jsem si připravila dvě 1,5 ml mikrozkušavky, které jsem řádně označila číslem vzorku.

Do zkumavek s tamponem, použitým pro bukalní stěr pacientů, jsem napipetovala 500 µl Lysis bufferu a 20 µl rozmražené Proteinázy K. Po napipetování reagensií jsem zkumavky krátce zvortexovala a zcentrifugovala. Dále jsem zkumavky vložila do suché lázně a nechala inkubovat po dobu 60 minut při teplotě 60 °C. Po inkubaci jsem

zkumavky se směsí krátce zvortexovala a zcentrifugovala. Následně jsem směs přepipetovala do předem připravených označených 1,5 ml mikrozkušavek a přidala 500 µl Capture bufferu. Mikrozkušavky jsem krátce zvortexovala a dala zcentrifugovat na 7 minut při 13 tis. ot/min. Po provedení centrifugace jsem z mikrozkušavek odstranila opatrně supernatant tak, aby nedošlo k poškození pelety obsahující DNA. K peletě DNA, zbavené veškerého supernatantu, jsem napipetovala 30 až 50 µl Re-hydration bufferu a nechala inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci jsem mikrozkušavky opět krátce zvortexovala, nechala zcentrifugovat po dobu 15 minut při 13 tis. ot/min a odebrala supernatant obsahující DNA do nových popsáných mikrozkušavek. Následně jsem změřila koncentraci vyizolované DNA a vzorky uložila do mrazicího boxu s teplotou -20 °C.

### 8.2.2 Izolace DNA z periferní krve

K izolaci genomové DNA z periferní krve jsem použila izolační kit Genomic DNA Mini Kit dle doporučení výrobce. V tabulce 4 jsou uvedeny reagentie použité při izolaci DNA pomocí Genomic kitu a způsob jejich skladování. Seznam použitých přístrojů a spotřebního materiálu je uveden v tabulce 5.

Tab. 4: Seznam reagentií izolačního kitu Genomic DNA Mini Kit a jejich skladování

Reagentie:	Skladování:
GT Buffer	pokojová teplota
W1 Buffer	pokojová teplota
Wash Buffer	pokojová teplota
Elution Buffer	pokojová teplota
RBC Lysis Buffer	pokojová teplota

Tab. 5: Seznam použitých přístrojů a spotřebního materiálu

Přístroje:	Spotřební materiál:
sada automatických pipet	kolonky GD Column
mini centrifuga/vortex	sběrné zk. 2 ml Collection Tube
centrifuga	1,5 ml mikrozkušavky
termostat	špičky a rukavice



Před vlastní izolací jsem nechala vytemperovat termostat na teplotu 60 °C. Po vytemperování termostatu jsem do něho vložila Elution buffer a nechala ho předeřhřát na příslušnou teplotu. Dále jsem si připravila pro každý vzorek dvě 1,5 ml mikrozkuřavky, které jsem řádně označila číslem vzorku a zkontrolovala, zda je Wash buffer připraven dle návodu (je přidán 96% ethanol).

Do připravené mikrozkuřavky jsem napipetovala 300 µl plné krve, 900 µl Lysis bufferu a směs následně promíchala v ruce převrácením mikrozkuřavky (směs se nesmí vortexovat). Promíchané mikrozkuřavky jsem nechala inkubovat 10 minut při pokojové teplotě a zcentrifugovala po dobu 5 minut při 3000 x g (rpm). Po centrifugaci jsem z mikrozkuřavek odstranila supernatant tak, abych nepoškodila vzniklou peletu. K peletě, zbavené veškerého supernatantu, jsem napipetovala 100 µl RBC Lysis bufferu. Následně jsem směs obsahující peletu resuspendovala, připipetovala 200 µl GB bufferu a vzorky zvortexovala a zcentrifugovala. Zcentrifugované vzorky jsem uložila do termostatu a nechala 15 minut inkubovat při 60°C. V průběhu inkubace jsem každé 3 minuty vzorky ručně promíchávala převrácením mikrozkuřavek. Ke vzniklému lyzátu v mikrozkuřavkách jsem přidala 200 µl 96% ethanolu a vzorky opět zvortexovala a zcentrifugovala. Vzniklou směs jsem z mikrozkuřavek přelila do kolonek GD Column, které jsem následně vložila do sběrných zkuřavek 2 ml Collection Tube a dala zcentrifugovat na 5 minut při 14-16 tis. x g. Po centrifugaci jsem kolonky přemístila do nových sběrných zkuřavek a do každé kolonky jsem přidala 400 µl W1 bufferu. Kolonky ve sběrných zkuřavkách jsem centrifugovala 30 sekund při 14-16 tis. x g. Po centrifugaci jsem ze sběrných zkuřavek vyjmula kolonky, vylila supernatant, vrátila zpět kolonky a připipetovala do kolonky 600 µl Wash bufferu. Zkuřavky jsem centrifugovala 30 sekund při 14-16 tis. x g. Následně jsem znovu po vyjmutí kolonek odstranila supernatant, vrátila kolonky do sběrných zkuřavek a nechala centrifugovat 30 sekund při 14-16 tis. x g, aby došlo k vysušení kolonek. Po ukončení centrifugace jsem ověřila, zdali jsou kolonky suché. Pokud nebyly, opakovala jsem centrifugaci. Řádně vysušené kolonky jsem přemístila do 1,5 ml mikrozkuřavek a přímo na filtr kolonek napipetovala 100 µl Elution Bufferu, vytemperovaného na 60 °C. Vzorky jsem nechala inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě, a zcentrifugovala 30 sekund při 14-16 tis x g. Následně jsem u všech vzorků změřila koncentraci vyizolované DNA a vzorky uložila do mrazicího boxu s teplotou -20 °C.

### 8.3 Měření koncentrace DNA

Pro změření koncentrace vyizolované DNA jsem použila Qubit<sup>TM</sup> Assay a přístroj Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometr. Seznam použitých reagensií a jejich skladování je uveden v tabulce 6 a seznam přístrojů a spotřebního materiálu v tabulce 7.

Tab. 6: Seznam použitých reagensií pro měření koncentrace DNA a jejich skladování

Reagencie:	Skladování:
Qubit <sup>TM</sup> dsDNA BR reagent (Component A)	pokožová teplota
Qubit <sup>TM</sup> dsDNA BR buffer (Component B)	pokožová teplota
Qubit <sup>TM</sup> dsDNA BR Standart #1 (Component C)	chladnička (4 °C)
Qubit <sup>TM</sup> dsDNA BR Standart #2 (Component D)	chladnička (4 °C)

Tab. 7: Seznam použitých přístrojů a spotřebního materiálu

Přístroje:	Spotřební materiál:
sada automatických pipet	mikrozkumavky Qubit <sup>TM</sup> assay tubes
Qubit <sup>®</sup> 2.0 Fluorometr	1,5 ml mikrozkumavky
mini centrifuga/vortex	špičky a rukavice

Nejprve jsem si nechala všechny uvedené reagencie vytemperovat na pokojovou teplotu a popsala jsem si mikrozkumavky Qubit<sup>TM</sup> assay tubes pro všechny vzorky a pro dvě standardy. Po tomto kroku jsem si připravila do 1,5 ml mikrozkumavky pracovní roztok, který obsahoval 199  $\mu$ l Qubit<sup>TM</sup>dsDNA BR bufferu a 1  $\mu$ l Qubit<sup>TM</sup> dsDNA reagentu. Tyto objemy byly přepočítány na množství vzorků a dvě standardy. Pracovní roztok jsem zvortexovala a zcentrifugovala. Do připravených a popsaných mikrozkumavek Qubit<sup>TM</sup> assay tubes pro standardy jsem napipetovala 190  $\mu$ l pracovního roztoku a 10  $\mu$ l Qubit<sup>TM</sup> dsDNA Standart #1 do jedné mikrozkumavky a 10  $\mu$ l Qubit<sup>TM</sup> dsDNA Standart #2 do druhé mikrozkumavky. Do připravených a popsaných mikrozkumavek Qubit<sup>TM</sup> dsDNA assay tubes pro vzorky jsem si napipetovala 198  $\mu$ l pracovního roztoku a 2  $\mu$ l izolátu DNA. Všechny připravené mikrozkumavky jsem zvortexovala a zcentrifugovala. Následně jsem nechala mikrozkumavky 2 minuty inkubovat a provedla měření koncentrace DNA na přístroji Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometr. Změřené hodnoty jsem zaznamenala.

#### 8.4 RFLP-PCR genu *NQO1*

Pro analýzu polymorfismu genu *NQO1* se v laboratorní praxi využívá metoda RFLP-PCR, která kombinuje dvě molekulárně-genetické metody: polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP). Během PCR se v požadovaném vzorku amplifikuje specifický úsek genu (PCR produkt) o velikosti 196 bp, který je zkontrolován na 4% agarózovém gelu pomocí gelové elektroforézy. Následně se provádí restriční štěpení PCR produktu pomocí restriční endonuklázy *Hinf I*. V případě výskytu polymorfismu *NQO1*\*2 se v PCR produktu vyskytuje štěpné místo a *Hinf I* rozštěpí na amplifikovaném úseku genu na fragmenty o jasně definované velikosti: 119 bp a 77 bp. Přítomnost polymorfismu je detekována na 4% agarózovém gelu pomocí gelové elektroforézy.

##### 8.4.1 Provedení PCR pomocí *MyTaq DNA polymerase*

Při přípravě PCR reakce jsem použila kit *MyTaq*<sup>TM</sup> Red DNA polymerase dle doporučení výrobce. Pro větší výtěžnost PCR reakce jsem navíc použila DMSO (dimethylsulfoxid). Seznam použitých reagensů a jejich skladování je uveden v tabulce 8. Seznam přístrojů použitých při PCR a seznam spotřebního materiálů je uveden v tabulce 9. Sekvence použitých primerů pro *NQO1* jsou uvedeny v tabulce 10.

Tab. 8: Seznam reagensů pro přípravu master mixu a jejich skladování

Reagencie:	Skladování:
MyTaq DNA Polymerase	mrazicí box (-20 °C)
5x MyTaq (Red) Reaction Buffer	mrazicí box (-20 °C)
H <sub>2</sub> O Aqua pro injectione	lednice (≤4 °C)
primer <i>NQO1</i> forward	mrazicí box (-20 °C)
primer <i>NQO1</i> reverse	mrazicí box (-20 °C)
DMSO	pokojevá teplota

Tab. 9: Seznam přístrojů a spotřebního materiálu

<b>Přístroje:</b>	<b>Spotřební materiál:</b>
sada pipet	1,5 ml mikrozkušavky
laminární box	0,2 ml mikrozkušavka s rovným víčkem
mini centrifuga/vortex	SSNC 10 µl Filtertip TYPE Z0
termocycler	SSCN 100 µl Filtertip TYPE A
	SSNC 200 µl Filtertip TYPE K
	rukavice

Tab. 10: Sekvence použitých primerů, převzatých z práce Bian et al. (2008)

<b>Primer:</b>	<b>Sekvence:</b>
NQO1 forward	5'-AAGCCCAGACCAACTTCT-3'
NQO1 reverse	5'-GCGTTTCTCCATCCTTC-3'

Nejprve jsem si z mrazicího boxu vyndala vzorky s izoláty DNA a reagentie (primery, reakční pufr), které jsem nechala rozmrazit při pokojové teplotě. Po rozmrazení jsem všechny vzorky a reagentie krátce zvortexovala a zcentrifugovala. MyTaq DNA Polymerase jsem pouze stočila a po celou dobu jsem ji uchovávala v chladicím stojánku. Následně jsem v laminárním boxu do chladicího stojánku připravila příslušný počet 0,2 ml mikrozkušavek s rovným víčkem (pro všechny vzorky a dvě kontroly), které jsem řádně označila. Do 1,5 ml mikrozkušavky jsem napipetovala reagentie v poměru uvedeném v tabulce 11 pro jednu reakci. Objemy jsem si přepočítala na příslušný počet vzorků a dvě kontroly.

Tab. 11: Reagentie a jejich objem pro tvorbu master mixu pro jednu reakci

<b>Reagentie:</b>	<b>Objem:</b>
H <sub>2</sub> O - injekční voda	34,3 µl
5x MyTaq (Red) Reaction Buffer	10 µl
MyTaq DNA polymeráza	0,2 µl
DMSO	2,5 µl
primer NQO1 forward	0,5 µl
primer NQO1 reverse	0,5 µl
<b>Celkem</b>	<b>48 µl</b>

Po napipetování správného objemu reagentií do 1,5 ml mikrozkušavky jsem master mix řádně promíchala a zcentrifugovala. Dále jsem do připravených popsaných

0,2 ml mikrozkušavek napipetovala 48 µl master mixu a připipetovala 1-5 µl izolátu DNA (objem závisel na koncentraci DNA ve vzorku). Do pozitivní kontroly jsem napipetovala 2 µl DNA již změřeného vzorku s heterozygotní variantou genu *NQO1* a do negativní kontroly jsem napipetovala 2 µl vody. Takto připravené vzorky jsem krátce zvortexovala, zcentrifugovala a vložila do termocycleru, který jsem pečlivě uzavřela a zapnula příslušný program cyklů určený pro analýzu genu *NQO1*. Průběh programu termocycleru je uveden v tabulce 12.

Tab. 12: Reakční profil PCR reakce

		teplota	čas
<b>1 cyklus</b>	Počáteční denaturace	95 °C	5 min.
<b>32 cyklů</b>	Denaturace	95 °C	30 s
	Anealing	55 °C	30 s
	Extenze	72 °C	60 s
<b>1 cyklus</b>	Terminální extenze	72 °C	10 min.

Po ukončení programu v termocycleru jsem PCR produkty zkontrolovala pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu.

#### 8.4.2 Provedení PCR pomocí PCRBIO HS Taq Mix

Z důvodu optimalizace metody jsem také použila kit PCRBIO HS Taq Mix dodávaný firmou PCR Biosystems Ltd. Pro větší výtěžnost PCR reakce jsem navíc použila DMSO (dimethylsulfoxid). Seznam použitých reagensů a jejich skladování je uveden v tabulce 13. Sekvence použitých primerů byla stejná jako při použití kitu MyTaq<sup>TM</sup> Red DNA polymerase (viz tab. 10). Použitá přístrojová technika a spotřební materiál zůstal také stejný (viz tab. 9).

Tab. 13: Seznam reagensí pro tvorbu master mixu

Reagencie:	Skladování:
PCRBIO HS Taq Mix	mrazicí box (-20 °C)
primer NQO1 forward	mrazicí box (-20 °C)
primer NQO1 revar	mrazicí box (-20 °C)
H2O Aqua pro injectione	lednice ( $\leq 4$ °C)
DMSO	pokojová teplota

Nejprve jsem si z mrazicího boxu vyndala vzorky s izoláty DNA a primery, které jsem nechala rozmrazit při pokojové teplotě. Po rozmrazení jsem všechny vzorky a reagenty krátce zvortexovala a zcentrifugovala. Následně jsem v laminárním boxu do chladicího stojánu připravila příslušný počet 0,2 ml mikrozkušavek s rovným víčkem (pro všechny vzorky a dvě kontroly), které jsem řádně označila. Do 1,5 ml mikrozkušavky jsem napipetovala reagenty pro master mix v poměru uvedeném v tabulce 14 pro jednu reakci. Objemy jsem si přepočítala na příslušný počet vzorků a dvě kontroly.

Tab. 14: Reagenty a jejich objem pro tvorbu master mixu pro jednu reakci

Reagencie:	Objem:
PCRBIO HS Taq Mix	25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O Aqua pro injectione	16,5 $\mu$ l
primer NQO1 forward	2 $\mu$ l
primer NQO1 reverse	2 $\mu$ l
DMSO	2,5 $\mu$ l
<b>Celkem</b>	<b>48 <math>\mu</math>l</b>

Po napipetování správného objemu reagentů do 1,5 ml mikrozkušavky jsem master mix řádně promíchala a zcentrifugovala. Dále jsem do připravených popsaných 0,2 ml mikrozkušavek napipetovala 48  $\mu$ l master mixu a připipetovala 1-5  $\mu$ l izolátu DNA (objem závisel na koncentraci DNA ve vzorku). Do pozitivní kontroly jsem napipetovala 2  $\mu$ l DNA již změřeného vzorku s heterozygotní variantou genu *NQO1* a do negativní kontroly jsem napipetovala 2  $\mu$ l vody. Takto připravené vzorky jsem krátce zvortexovala, zcentrifugovala a vložila do termocycleru, který jsem pečlivě uzavřela a zapnula příslušný program cyklů určený pro analýzu genu *NQO1*. Průběh programu termocycleru je uveden v tabulce 12.

Po ukončení programu v termocycleru jsem PCR produkty zkontrolovala pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu.

#### 8.4.3 Kontrola PCR produktu

Kontrolu PCR produktů jsem provedla pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu. Použité reagenty a jejich skladování jsou uvedeny v tabulce 15.

Tab: 15 Seznam reagentů a jejich skladování

Reagenty:	Skladování:
Crystal 10x TBE Buffer	pokožová teplota
10x TBE (zásobní roztok)	pokožová teplota
1x TBE (pracovní roztok)	pokožová teplota
Agarózové tablety	pokožová teplota
Midori Green Advanced DNA Stain	lednice ( $\leq 4$ °C), ve tmě
100 bp DNA LADDER H3RTU	pokožová teplota
DNA Loading Buffer Blue	pokožová teplota

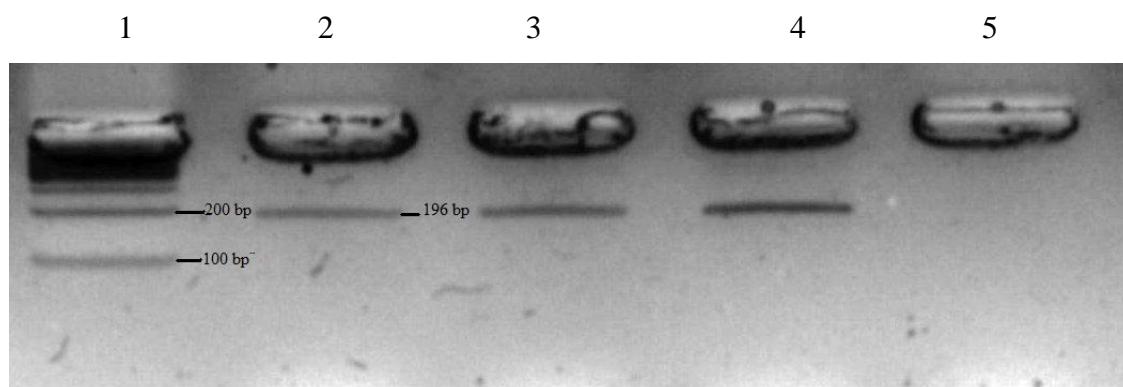
Zásobní roztok 10x TBE se připraví z prášku 10x TBE Buffer, který se rozpustí v deionizované vodě a následně se doplní deionizovanou vodou na objem 1 litru.

Nejprve jsem si ze zásobního roztoku 10x TBE připravila pracovní roztok 1xTBE. Do skleněné lahve o objemu 0,5 l jsem nalila 50 ml 10x TBE a přidala 450 ml deionizované vody. Výsledný roztok jsem promíchala. Dále jsem si připravila 4% agarózový gel. Do kádinky jsem vložila příslušný počet agarózových tablet o hmotnosti 0.5 g a dle požadované velikosti a hustoty gelu přilila do kádinky 50 nebo 100 ml pracovního roztoku 1x TBE. Tablety jsem nechala v pracovním roztoku rozpustit, kádinku vložila do mikrovlnné trouby a nechala zahřívát na maximální ohřev po dobu 3 minut, dokud se tablety zcela nerozpustily. Ke směsi jsem připipetovala 6  $\mu$ l fluorescenční barvy Midori Green Advanced DNA Stain a promíchala. Po částečném zchladnutí jsem obsah kádinky nalila na připravenou elektroforetickou podložku s hřebeny, odstranila vzniklé vzduchové bubliny a nechala tuhnout gel po dobu 10-15 minut na tmavém místě. Z úplně ztuhlého gelu jsem vyndala hřebeny a vložila jej do elektroforetické vany. Zkontrolovala jsem, zdali je gel v elektroforetické vaně dostatečně ponořený, případně jsem dolila 1x TBE pufr. Do každé řady gelu jsem si do

první jamky napipetovala 6  $\mu$ l markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU. Do dalších jamek jsem napipetovala 5  $\mu$ l PCR produktu smíchaného s 1  $\mu$ l vkládacího pufru DNA Loading Buffer Blue. Po napipetování všech vzorků a kontrol jsem spustila elektroforézu (100 V - 135 V) na 10 - 15 minut.

Po proběhnutí elektroforézy jsem gel přenesla na detekční systém, vyfotila jej, obrázek uložila na paměťovou kartu, kterou jsem přenesla do počítače, kde probíhalo hodnocení výsledků.

Výsledkem amplifikace je produkt o velikosti 196 bp (viz obrázek 4). V případě úspěšné amplifikace jsem následně provedla restriční štěpení. V případě, že nebyl produkt detekován, byla nutná opětovná PCR amplifikace.



Obr. 4: Kontrola PCR produktu pomocí gelové elektroforézy, jamka 1 obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU), jamka 2, 3 a 4 pak PCR produkty o velikosti 196 bp, v jamce 5 je napipetována negativní kontrola reakce.

#### 8.4.4 Restriční štěpení

Restriční štěpení jsem provedla pomocí enzymu *Hinf I*. Reagencie použité pro restriční štěpení a jejich skladování jsou uvedeny v tabulce 16.

Tab. 16: Seznam reaglií a jejich skladování

Reagencie:	Skladování:
Restriční enzym <i>Hinf I</i>	mrazicí box (-20 °C)
Restriční pufr CutSmart	mrazicí box (-20 °C)

Nejprve jsem si z mrazicího boxu vyndala restriční pufr CutSmart a nechala jej rozmraznout při pokojové teplotě. Po rozmrznutí jsme pufr promíchala a zcentrifugovala.



V chladícím stojánku jsem si připravila mix pro restrikční štěpení. Do 0,2 ml mikrozkušavky s rovným víčkem jsem si napipetovala pro každý vzorek 4,5 µl restrikčního pufru CutSmart a 1 µl restrikčního enzymu *Hinf I*. Směs jsem promíchala a ke každému vzorku a kontrole připipetovala 5,5 µl směsi a opět jemně promíchala. Následně jsem vzorky nechala inkubovat v miniinkubátoru při teplotě 37 °C po dobu min. 60 minut. Po ukončení inkubace jsem provedla kontrolu restrikčního štěpení pomocí gelové elektroforézy.

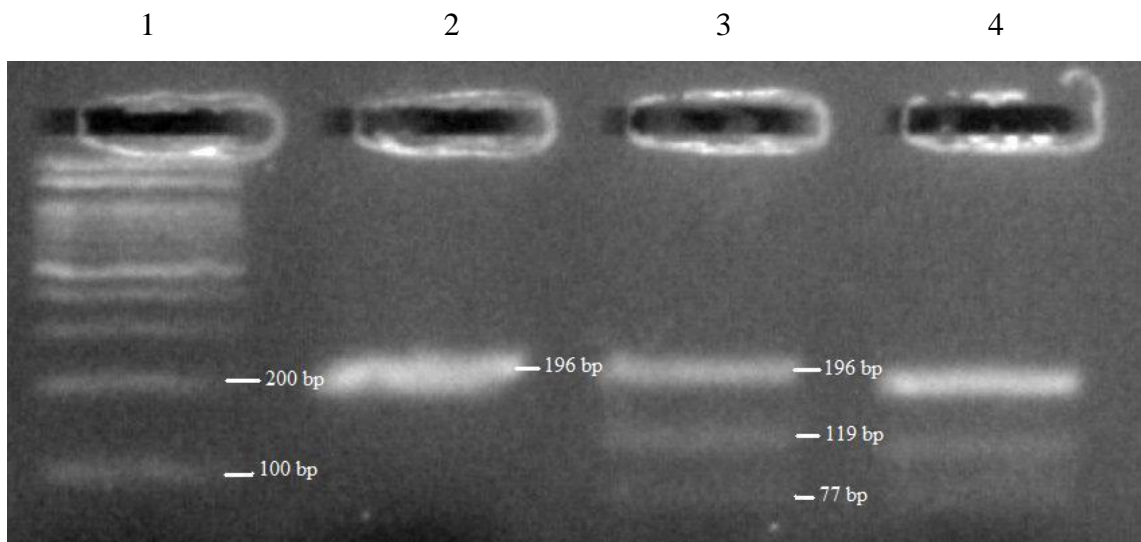
#### 8.4.5 *Kontrola restrikčního štěpení*

Kontrolu restrikčního štěpení jsem provedla pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu. Připravila jsem si další 4% agarózový gel, obarvený 6 µl fluorescenční barvy Midori Green Advanced DNA Stain. Tuhý gel jsem vložila do elektroforetické vany a v každé řadě jsem do první jamky napipetovala 6 µl hmotnostního markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU. Do dalších jamek jsem napipetovala 10-15 µl štěpeného PCR produktu smíchaného 2 µl vkladacího pufru DNA Loading Buffer Blue a spustila elektroforézu (100 V - 135 V) po dobu 10 - 15 minut.

Po proběhnutí elektroforézy jsem gel přenesla na detekční systém, vyfotila a přenesla do počítače, kde proběhlo hodnocení výsledků.

#### 8.4.6 *Hodnocení výsledků*

V důsledku záměny nukleotidu C za T na pozici 609 v genu *NQO1* vzniká nové štěpné místo. Restriktáza *Hinf I* rozštěpí v takovém případě PCR produktu o velikosti 196 bp na 2 fragmenty o velikosti 119 bp a 77 bp. V případě nepřítomnosti mutované alely se PCR produkt neštěpí. Pokud je v PCR produktu přítomna mutovaná i normální alela vznikají následkem restrikčního štěpení 3 fragmenty o velikosti 196 bp, 119 bp a 77 bp (viz obrázek 5). V tabulce 17 jsou uvedeny referenční hodnoty pro polymorfismus genu *NQO1*.



Obr. 5: Příklad rozdělení fragmentů PCR produktu o velikosti 196 bp po restrikním štěpení. Jamka 1 obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU), jamka 2 obsahuje vzorek s wild type genotypem *NQO1*\*1/\*1 (fragment o velikosti 196 bp), jamka 2 a 3 vzorky s heterozygotním genotypem *NQO1*\*1/\*2 (fragmentsy o velikosti 196 bp, 119 bp a 77 bp).

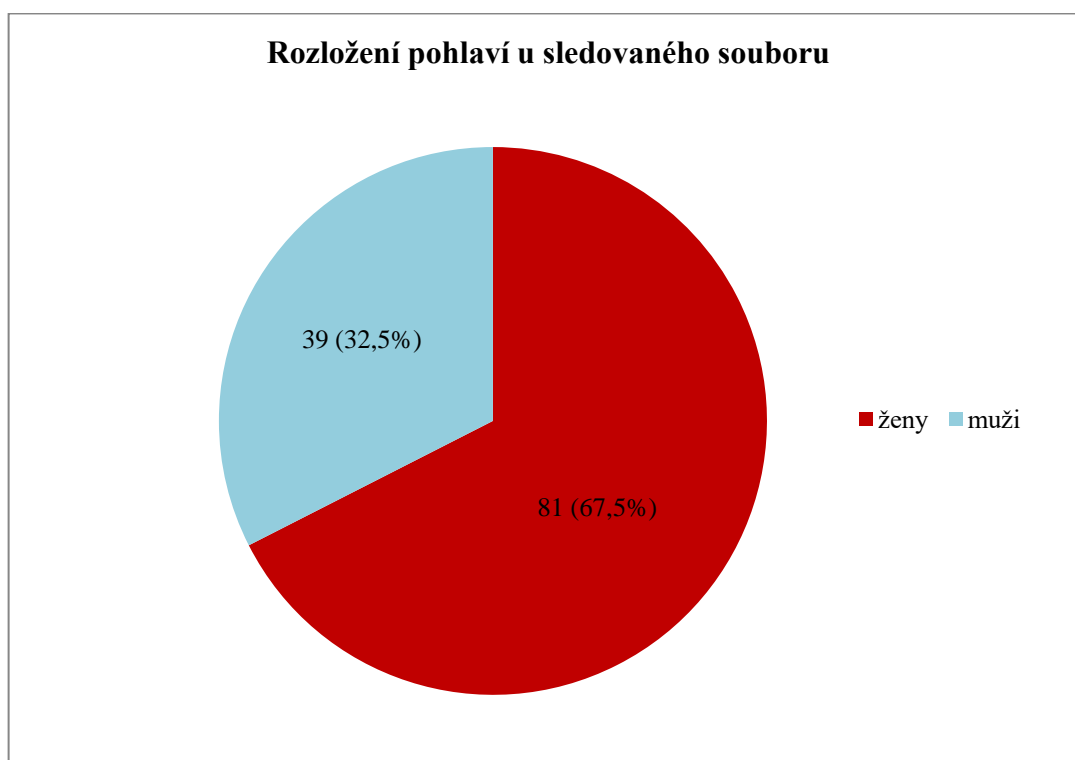
Tab. 17: Referenční hodnoty pro polymorfismus genu *NQO1*

PCR Produkt:	Štěpený PCR produkt:	Výsledný genotyp:
196 bp	196 bp	<b>Nemutovaný homozygot C/C</b>
196 bp	196+119+77 bp	<b>Heterozygot C/T</b>
196 bp	119+77 bp	<b>Mutovaný homozygot T/T</b>

## 9 Výsledky

Během jednoho roku (duben 2017 – březen 2018) byl v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích analyzován polymorfismus genu *NQO1* pomocí metody PCR-RFLP u 120 vzorků, u nichž bylo toto vyšetření požadováno.

Analýza zahrnovala stanovení alelové varianty *NQO1*\*2, vznikající záměnou thyminu za cytosin v nukleotidové pozici 609, a nemutované varianty genu *NQO1*\*1 (Wild type). Soubor zahrnoval celkem 120 pacientů, 81 žen a 39 mužů, obyvatel České republiky (kavkazská populace), u nichž nebyla známa žádná diagnostická kritéria. Známý byl pouze věk a pohlaví pacientů viz graf 1.



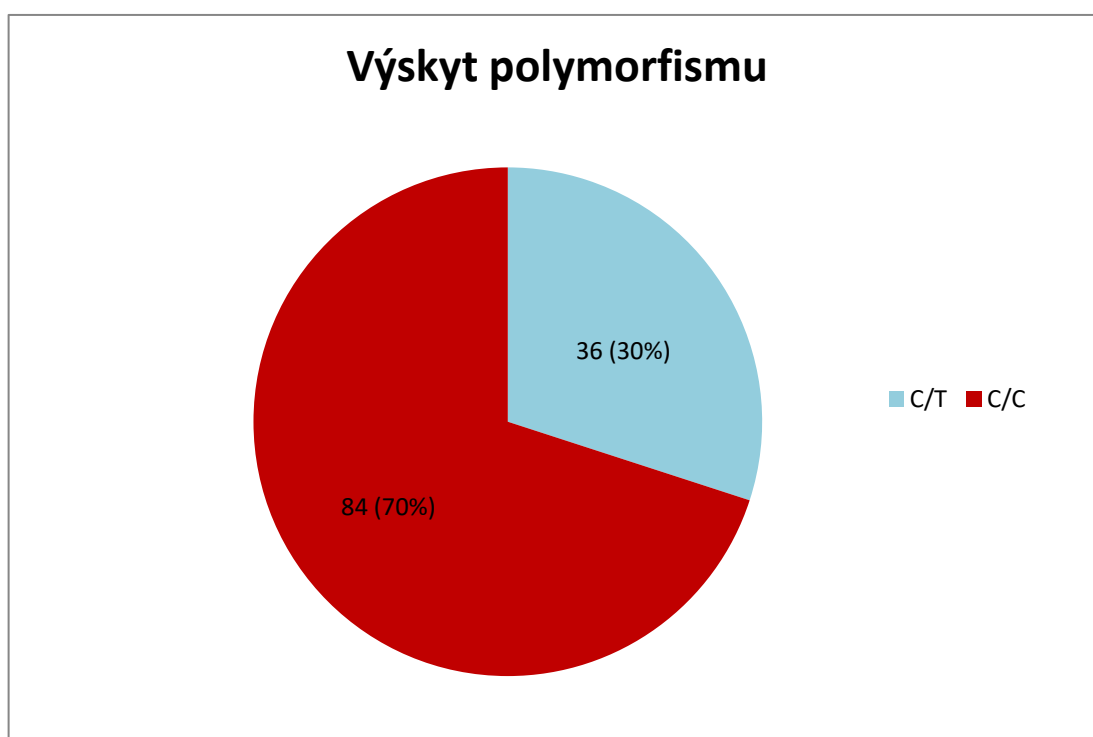
Graf 1: Rozložení pohlaví ve sledovaném souboru. Soubor obsahoval 39 (32,5%) mužů a 81 (67,5%) žen.

Ve sledovaném souboru byl polymorfismus genu *NQO1* detekován u 36 pacientů. Ve všech případech se jednalo o heterozygotní variantu genu C/T – *NQO1*\*1/\*2. U ostatních pacientů byla detekována nemutovaná varianta genu C/C – *NQO1*\*1/\*1 a to v 81 případech. V souboru se nevyskytoval ani jeden mutovaný homozygot T/T -

*NQO1*\*2/\*2. Genotypová frekvence je uvedena v tabulce 18 a rozložení variant genu u sledovaného souboru je uvedeno v grafu 2.

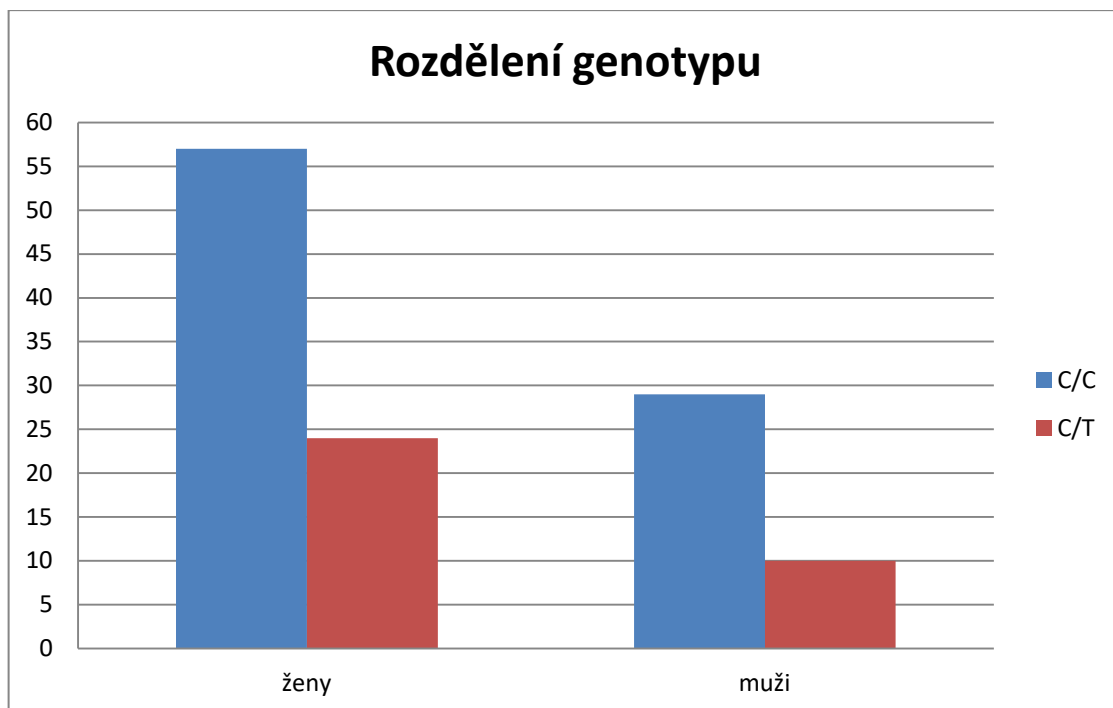
Tabulka 18: Zastoupení jednotlivých genotypů *NQO1* ve sledovaném souboru

	<i>NQO1</i> *1/*1	<i>NQO1</i> *1/*2	<i>NQO1</i> *2/*2	Frekvence alel ( <i>NQO1</i> *1)/ ( <i>NQO1</i> *2)
<b>Soubor</b>				
n=120	<b>84 (70%)</b>	<b>36 (30%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>(0,85)/(0,15)</b>



Graf 2: Znázornění výskytu heterozygotní varianty *NQO1*\*1/\*2 (C/T) a nemutované varianty genu *NQO1*\*1/\*1 (C/C) ve sledovaném souboru.

U 81 žen ve sledovaném souboru se polymorfni alela (C/T) vyskytovala u 24 jedinců (30%) a nemutovaná varianta genu (C/C) u 57 jedinců (70%). U mužů se mutovaná alela (C/T) vyskytovala u 10 jedinců (26%) a nemutovaná varianta genu u 29 jedinců (74%) viz graf 3. Distribuce výsledných genotypů se tedy mezi pohlavími významně neliší.



Graf 3: Distribuce genotypů *NQO1* 609 C/C a C/T ve sledovaném souboru v závislosti na pohlaví.

## 10 Diskuze

Gen *NQOI* není vysoce polymorfním, do současnosti byly u člověka identifikovány pouze dvě polymorfnní varianty genu, *NQOI*\*2 a *NQOI*\*3, obsahující bodovou mutaci v kódující oblasti genu.(Maitland-van der Zee and Daly, 2012). Alelová varianta *NQOI*\*2 vzniká substitucí cytosinu za thymin v nukleotidové pozici 609. Výsledkem této substituce je změna aminokyseliny prolinu za serin v poloze 187 (P187S). Záměnou dochází k výrazné změně ve fenotypu. Proteinový produkt translace je nestabilní a v důsledku toho dochází ke snížení hladiny výsledného enzymu (Dunna et al., 2011). Další varianta alely *NQOI* vzniká substitucí jednoho nukleotidu thyminu za cytosin v nukleotidové pozici 465 a je označován jako *NQOI*\*3. Substituce v tomto případě vede k záměně aminokyseliny argininu za tryptofan v poloze 139 (R139W). Produktem této alely je enzym, který postrádá vazebné místo pro chinon a tím je jeho aktivita závislá na povaze substrátu. (Atia et al., 2014). Frekvence výskytu alely v populaci je relativně nízká a pohybuje se v rozmezí 0-5% v závislosti na etniku s minimálním až nulovým výskytem homozygotní varianty (Gaedigk et al., 1998). Z tohoto důvodu se běžně stanovení polymorfismu *NQOI*\*3 v klinických laboratořích neprovádí.

Analýza polymorfismu genu *NQOI*\*1/\*2 pomocí metody PCR-RFLP u zkoumaného souboru se po úspěšné optimalizaci stala součástí nabízených vyšetření v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích. Metodika této analýzy zejména sekvence primerů a reakční protokol byly přejaty z odborné publikace Bian et al.(2008). Primárně byl pro tuto metodu využit kit pro amplifikaci DNA MyTaq<sup>TM</sup> Red DNA polymerase. U analýzy první skupiny vzorků však nedocházelo k amplifikaci požadovaného úseku DNA. Z toho důvodu byl také použit jiný kit PCRBIO HS Taq Mix, kdy amplifikace úseku proběhla pouze u některých vzorků a to u těch, které měly vyšší koncentraci DNA (50 ng/μl a více). Optimalizace metody v obou případech spočívala zejména v úpravě časových intervalů průběhu PCR reakce a ve změně vstupního množství DNA do reakce, kdy byla použita min. koncentrace 50 ng/μl. Na základě těchto optimalizačních kroků byly problémy s amplifikací odstraněny. Z finančních důvodů se dále pro detekci polymorfismu v genu *NQOI* využíval kit MyTaq<sup>TM</sup> Red DNA polymerase. Na základě těchto poznatků byl vypracován standardní operační protokol pro vyšetření polymorfismu *NQOI*\*1/\*2 metodou PCR

RFLP. Analýza polymorfismu genu *NQOI* tak byla zařazena do seznamu rutinních vyšetření genetické laboratoře.

Stanovení polymorfismu genu *NQOI* bylo provedeno u skupiny 120 pacientů, obyvatel České republiky, spadající do kavkazské populace. U těchto pacientů bylo známé pohlaví, nikoli zdravotní stav.

Izolace DNA u zkoumaného souboru se prováděla u všech pacientů z bukálního stěru. V několika případech byla koncentrace DNA ve vzorcích velice nízká, nebo byl objem izolované DNA nedostačující pro počet požadovaných vyšetření, proto došlo k vyžádání nového odběru biologického materiálu pro izolaci DNA. U dvou případů byla opakovaná izolace DNA prováděna z periferní krve. Díky této skutečnosti nebylo možné vypracovat porovnání výtěžnosti izolace DNA z bukálního stěru a periferní krve.

U sledovaného souboru byla heterozygotní varianta genu *NQOI*\*1/\*2 detekována u 36 pacientů (30%) a nemutovaná varianta *NQOI*\*1/\*1 (Wild type) u 84 pacientů (70%). Tyto výsledky korelují s daty získanými studií polymorfismu genu u kontrolní skupiny 347 obyvatel České republiky (Šůsová et al., 2005). Při studiích polymorfismu tohoto genu v kavkazské populaci obecně, kterou publikoval Kelsey et al.(1997), byla mutovaná alela genu *NQOI* v heterozygotním stavu detekována u většího procenta jedinců (39,5 %) ve srovnání s našimi výsledky. Navíc byli ve studované populaci, čítající celkem 114 jedinců, detekováni také mutovaní homozygoti a to ve 4.4% (Kelsey et al., 1997). Tyto hodnoty však mohou být zavádějící z důvodu malé velikosti obou studovaných souborů.

Homozygotní mutovaná varianta genu *NQOI*\*2/\*2 nebyla v našem souboru detekována vůbec. Tento fakt je možný z důvodu nízkého výskytu, který se uvádí okolo 3% v české populaci (Šůsová et al., 2005), nebo okolo 4% v kavkazské populaci (Kelsey et al., 1997), a nebo z důvodu nízkého počtu vyšetřených jedinců, jak již bylo uvedeno.

Po rozdělení jedinců dle pohlaví obsahoval zkoumaný soubor 81 žen a 39 mužů. U žen byl heterozygotní genotyp detekován 24x (30%) a nemutovaná varianta genu 57x (70%). V souboru mužů byl heterozygotní genotyp detekován 10x (26%) a nemutovaná varianta genu 29x (74%). Procentuální rozdělení výskytu jednotlivých genotypů dle pohlaví korelovalo se studií provedenou u kontrolní skupiny 314 žen a 183 mužů reprezentujících českou populaci pouze u ženského pohlaví. U mužského pohlaví se procentuální zastoupení sledovaných genotypů ve srovnání se studií Šůsové et al.

(2005) mírně liší. Tuto skutečnost můžeme opět vysvětlit malým souborem mužských jedinců v naší studii.

Pro detekci polymorfismu genu *NQO1* se využívají také jiné metodické přístupy např. nested PCR nebo sekvenování (Larson et al., 1999; Shi et al., 1999). Z důvodu úspěšné optimalizace samotné PCR-RFLP metody nebyly však tyto techniky k analýze polymorfismu u sledovaného souboru využity.

Na základě publikovaných informací získaných dlouholetým zkoumáním polymorfismu genu *NQO1* lze s určitostí potvrdit jeho význam jako rizikového faktoru pro rozvoj rakoviny a faktoru zvýšené citlivosti na benzenovou cytotoxicitu, zejména u pracovníků profesně vystaveným působení benzenu. (Nebert et al., 2002; Lajin and Alachkar, 2013). Díky těmto faktům a prevalenci výskytu polymorfismu v populaci je význam tohoto vyšetření nepopíratelný.



## 11 Závěr

Hlavní cíle této bakalářské práce na téma Analýza polymorfismu genu *NQO1* pomocí metody PCR představující praktické zvládnutí a osvojení si molekulárně – genetických metod běžně využívaných k detekci genových polymorfismů a vypracování odborné rešerše na dané téma byly naplněny.

V teoretické části práce jsem se snažila poskytnout komplexní informace o genu *NQO1* a jeho produktu, podrobném popisu funkce, polymorfismech, včetně metodiky detekce a možné souvislosti se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny.

V praktické části, se zabývám popisem přesného postupu analýzy, která zahrnovala izolaci DNA z bukalního stěru a periferní krve, stanovením koncentrace DNA, amplifikací úseku genu pomocí PCR, kontrolou PCR produktu pomocí gelové elektroforézy, restrikcí štěpením, následnou detekcí polymorfismu pomocí gelové elektroforézy a hodnocením vlastních výsledků

## 12 Seznam použité literatury

ATIA, A, ALRAWAIQ, N., ABDULLAH, A., 2014. Review of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1); A Multifunctional Antioxidant Enzyme. *Journal of Applied Pharmaceuticals Science*. 4(12), 118-122, doi: 10.7324/JAPS.2014.41220

BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum. 193 s. ISBN 978-80-246-3224-7.

BETTERIDGE, J. D., 2000. What Is Oxidative Stress?. *Metabolism*. 49(2), 3-8, doi: 10.1016/S0026-0495(00)80077-3

BEYER, R. E., SEGURA-AGUILAR, J., DIBERNARDO, S., CAVAZZONI, M., FATO, R., FIORENTINI, D., GALLI, M. C., SETTI, M., LANDI, L. LENA Z, G., 1996. The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(6), 2528-2532, doi: 10.1073/pnas.93.6.2528

BIAN, J.-T., ZHAO, H.-L., ZHANG, Z.-X., BI, X.-H., ZHANG, J.-W., 2008. Association of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 Polymorphism and Alzheimer's Disease in Chinese. *Journal of Molecular Neuroscience*. 34(3), 235-240, doi: 10.1007/s12031-008-9036-z.

CABELLO, CH. M., LAMORE, S. D., BAIR III, W. B., DAVIS, A. L., AZIMIAN, S. L., WONDRAK, G. T., 2011. DCPIP (2,6-dichlorophenolindophenol) as a genotype-directed redox chemotherapeutic targeting NQO1\*2 breast carcinoma. *Free Radic Res*. 45(3), 276-292, doi : 10.3109/10715762.2010.526766

CADENAS, E., 1995. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 49(2), 127-140, doi: 10.1016/S0006-2952(94)00333-5

CLAIRMONT, A., SIES, H., RAMACHANDRAN, S., LEAR, J. T., SMITH, A. G., BOWERS, B., JONES, P. W., FRYER, A. A., STRANGE, R. C., 1999. Association of NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) null with numbers of basal cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 20(7), 1235-1240, doi: 10.1093/carcin/20.7.1235

DINKOVA-KOSTOVA, A. T., TALALAY, P., 2000. Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radical Biology and Medicine*. 29(3-4), 231-240, doi: 10.1016/S0891-5849(00)00300-2

DINKOVA-KOSTOVA, A. T., TALALAY, P., 2010. NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 501(1), 116-123, doi: 10.1016/j.abb.2010.03.019

DONG, G.-Z., YOUN, H., PARK, M.-T., OH, E.-T., PARK, K. H., SONG, CH. W., KYING CHOI, E., PARK, H. J.. 2009. Heat shock increases expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1), mediator of  $\beta$ -lapachone cytotoxicity, by increasing NQO1 gene activity and via Hsp70-mediated stabilisation of NQO1 protein. *International Journal of Hyperthermia*. 25(6), 477-487, doi: 10.1080/02656730903049836

DUNNA, N. R., ANURADHA, C., VURE, S., SAILAJA, K., SUREKHA, D., RAGHUNADHARAO, D., RAJAPPA, S., VISHNUPRIYA, S., 2011. NQO1\*2 [NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1] polymorphism and its influence on acute leukemia risk. *Biology and Medicine*. 3(3), 19-25, ISSN 09748369

ERNSTER, L., NAVAZIO, F., 1958. Soluble diaphorase in animal tissues. *Acta Chem. Scand.* 12, 595-602, doi: 10.3891/acta.chem.scand.12-0595

GAEDIGK, A., TYNDALE, R. F., JURIMA-ROMET, M., SELLERS. E. M., GRANT, D. M., LEEDER, J. S., 1998. NAD(P)H: quinone oxidoreductase: polymorphism and allele frequencies in -Caucasian, Chinese and Canadian Native Indian and Inuit populations. *Pharmacogenetics*. 8(4), 305-313, ISSN 0960-314X

GONG, X., KOLE, L., ISKANDER, K., JAISWAL, A. K., 2007, NRH:Quinone Oxidoreductase 2 and NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Protect Tumor Suppressor p53 against 20S Proteasomal Degradation Leading to Stabilization and Activation of p53. *Cancer Research*. 67(11), 5380-5388, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0323

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C., 2015. *Free radicals in biology and medicine*. 5th edition, Oxford: Oxford University Press. 944 pages, ISBN 9780198717485

HAYES, A. W., 2008. *Principles and methods of toxicology*. 5th edition, New York: Informa Healthcare. 2270 pages. ISBN 978-0-8493-3778-9.

JAISWAL, A. K., MCBRIDE, O. W., ADESNIK, M., NEBERT D. W., 1988. *Human Dioxin-inducible Cytosolic NAD(P)H:Menadione Oxidoreductase*. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(27), 13572-13578.

JOSEPH, P., JAISWAL, A. K., 1994. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(18), 8413–8417, doi: 10.1073/pnas.91.18.8413

KANSANEN, E., KUOSMANEN, S. M., LEINONEN, H., LEVONEN, A. L., 2013. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanism of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, 1, 45-49, doi: 10.1016/j.redox.2012.10.001

KELSEY, K. T., ROSS, D., TRAVER, R. D., CHRISTIANI, D. C., ZUO, Z. F., SPITZ, M. R., WIENCKE, J. K., 1997. Ethnic variation in the prevalence of a common NAD(P)H quinone oxidoreductase polymorphism and its implications for anti-cancer chemotherapy. *British Journal of Cancer*, 76(7), 852–854, doi: 10.1038/bjc.1997.474

KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.

KUCIEL, J., URBAN, T., 2016. *Principy genetiky*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 200 s. ISBN 978-80-7509-385-1.

LAJIN, B., ALACHKAR, A., 2013. The NQO1 polymorphism C609T (Pro187Ser) and cancer susceptibility: a comprehensive meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 109(5), 1325-1337, doi: 10.1038/bjc.2013.357

LARSON, A., WANG, Y., BANERJEE, M., WIEMELS, J., HARTFORD, CH., LE BEAU, M. M., SMITH, T., 1999. Prevalence of the Inactivating <sup>609</sup>C→T Polymorphism in the NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase (NQO1) Gene in Patients With Primary and Therapy-Related Myeloid Leukemia. *Blood*. 94(2), 803-807

LEWIS, S. J., CHERRY, N. M., NIVEN, R. M., BARBERY, P. V., POVEY, A. C., 2001. Polymorphism in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene and small cell lung cancer risk in a UK population. *Lung Cancer*. 34(2), 177-183, doi: 10.1016/S0169-5002(01)00243-4

MAITLAND-VAN DER ZEE, A. H., DALY, A. K., 2012. *Pharmacogenetics and individualized therapy*. Hoboken, New York: John Wiley, 510 pg. ISBN 978-0470433546.

MORAN, J. L., SIEGEL, D., ROSS, D., 1999. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(14), 8150-8155, doi: 10.1073/pnas.96.14.8150

NAKAMURA, Y., OHIGASHI, H., MASUDA, S., MURAKAMI, A., MORIMITSU, Y., KAWAMOTO, Y., OSAWA, T., IMAGAWA, M., UCHIDA, K., 2000. Redox Regulation of Glutathione S-Transferase Induction by Benzyl Isothiocyanate: Correlation of Enzyme Induction with the Formation of Reactive Oxygen Intermediates. *Cancer Res*. 60(2), 219-225, ISSN 1538-7445

NEBERT, D. W., ROE, A. L., Vandale, S. E., BINGHAM, E., OAKLEY, G. G., 2002. NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: A Huge review. *Genetics in Medicine*. 4(2), 62-70, DOI: 10.109700125817-200203000-00003

NEBERT, D. W., ROE, A. L., DIETER, M. Z., SOLIS, W. A., YANG, Y., DALTON, T. P., 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 59(1), 65-85, doi: 10.1016/S0006-2952(99)00310-X

NIOI, P., HAYES, J. D., 2004. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat Res*.555(1-2), 149-171, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.05.023

NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F. 2004. *Klinická genetika*. Praha: Triton. 426 s. ISBN 80-7254-475-6.

OH, E.-T., PARK, H. J., 2015. Implications of NQO1 in cancer therapy. *BMB Reports*. 48(11), 609-617, doi: 10.5483/BMBRep.2015.48.11.190

OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R., 2012. *Základy biologie a genetiky člověka*. Praha: Karolinum. 228 s. ISBN 978-80-246-2109-8

PASTOREK, M., MÜLLER, P., VOJTĚŠEK, B., 2015. Nrf2 - dve tváře regulátora antioxidačného systému. *Klin Onkol*. (28)2, 2S26-2S31, doi: 10.14735/amko20152S26

PARK, M.-T., SONG, M.-J., LEE, H., OH, E.-T., CHOI, B.-H., JEONG, S.-Y., CHOI, E. K., PARK, H. J., 2011.  $\beta$ -Lapachone Significantly Increases the Effect of Ionizing Radiation to Cause Mitochondrial Apoptosis via JNK Activation in Cancer Cells. *PLoS ONE*. 6(10), e25976-, doi: 10.1371/journal.pone.0025976

PENG, Q., LU, Y., LAO, X., CHEN, Z., LI, R., SUI, J., QIN, X., LI, S., 2014. The NQO1 Pro187Ser polymorphism and breast cancer susceptibility: evidence from an updated meta-analysis. *Diagnostic Pathology*. 9:100, doi: 10.1186/1746-1596-9-100

PRITCHARD, D. J., KORF, B. R., 2007. *Základy lékařské genetiky*. Praha: Galén. 182 s. ISBN 978-80-7262-449-2.

ROKYTA, R., HOLEČEK, V., NOHEL P., VLASÁK, R., 2011. Oxidační stres, jeho stanovení, nemoci jím způsobené a jeho snižování antioxidanty. *Vesmír*.90(141), 357-359, ISSN 1214-4029

ROSS, D., KEPA, J. K., WINSKI, S. L., BEALL, H. D., ANWAR, A., SIEGEL, D., 2000. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-Biol. Interact.* 129(1-2), 77-97, doi: 10.1016/S0009-2797(00)00199-X

ROSS, D., SIEGEL, D., 2004. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods in Enzymology*. 382, 2004, 115-144, DOI: 10.1016/S0076-6879(04)82008-1

SHI, M. M., MYRAND, S. P., BLEAVINS, M. R., DE LA IGLESIA, F. A., 1999. High throughput genotyping for the detection of a single nucleotide polymorphism in NAD(P)h quinone oxidoreductase (DT diaphorase) using TaqMan probes. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 52, 295-299, doi: 10.1136/mp.52.5.295

SHU, K. X., LI, B., WU, X., 2007. The p53 network: p53 and its downstream genes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 55(1), 10-18, doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.11.003

SCHULTZ, W. A., KRUMMECK, A., ROSINGER, I., EICKELMANN, P., NEUHAUS, C., EBERT, T., SCHMITZ-DRAGER, B. J., SIES, H., 1997. Increased frequency of a null-allele for NAD(P)H:quinone oxidoreductase in patients with urological malignancies. *Pharmacogenetics*. 7, 235-239

SCHULTZ, W. A., KRUMMECK, A., ROSINGER, I., SCHMITZ-DRAGER, B. J., SIES, H., 1998. Predisposition towards urolithiasis associated with the *NQO1* null allele. *Pharmacogenetics*. 8, 453-454

SIEGEL, D., ANWAR, A., WINSKI, S. L., KEPA, J. K., ZOLMAN, K. L., ROSS, D., 2001. Rapid Polyubiquitination and Proteasomal Degradation of a Mutant Form of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1. *Molecular Pharmacology*. 59(2), 263-268, doi: 10.1124/mol.59.2.263

SIEGEL, D., ROSS, D., 2000. Immunodetection of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radical Biology and Medicine*. 29(3-4), 246-253, doi: 10.1016/S0891-5849(00)00310-5

SIEGEL, D., YAN, C., ROSS, D., 2012. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol*. 83(8), 1033-1040, doi: 10.1016/j.bcp.2011.12.017

SLABÝ, O., 2015. *Molekulární medicína*. Praha: Galén. 598 s. ISBN 978-80-7492-121-6.

SRIJIWANGSA, P., NA-BANGCHANG, K., 2017. Roles of NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) On Cancer Progression and Chemoresistance. *J Clin Exp Oncol*. 6(4), doi: 10.4172/2324-9110.1000192

ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

ŠŮSOVÁ, S., NOVOTNÝ, J., VODIČKA, P., SOUČEK, P., 2005. Úloha genetických polymorfismů biotransformačních enzymů v rozvoji kolorektálního karcinomu. *Klin Onkol*. 18(5), 188-193, ISSN: 1802-5307



VASILIOU, V., ROSS, D., NEBERT, D. W., 2006. Update of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Human Genomics*. 2(5), 329-335, doi: 10.1186/1479-7364-2-5-329

VENUGOPAL, R., JAISWAL, A. K., 1998. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene*.17(24), 3145-3156, doi: 10.1038/sj.onc.1202237

YAMAMOTO, Y., KIYOHARA, C., SEUTSUGU-OGATA, S., HAMADA, N., NAKANISHI, Y., 2017. Biological interaction of cigarette smoking on the association between genetic polymorphisms involved in inflammation and the risk of lung cancer: A case-control study in Japan. *Oncology Letters*, 13, 3873-3881, doi: 10.3892/ol.2017.5867

YANG, S., JIN, T., SU, H.-X., ZHU, J.-H., WANG, D.-W., LI, S., HE, J., CHEN, Y.-H., 2015. . The Association between NQO1 Pro187Ser Polymorphism and Bladder Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis of 15 Studies.*Plos One*. 10(1), 1/15-15/15, doi: 10.1371/journal.pone.0116500

ZAFAR, K. S., INAYAT-HUSSAIN, S. H., SIEGEL, D., BAO, A., SHIEH, B., ROSS, D., 2006. Overexpression of NQO1 protects human SK-N-MC neuroblastoma cells against dopamine-induced cell death. *Toxicol. Lett*. 166(3), 261-267, doi: 10.1016/j.toxlet.2006.07.340

ZHENG, B., WANG, Z., CHAI, R., 2014. NQO1 C609T polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis. *Arch Med Sci*. 10(4), 651-660, doi: 10.5114/aoms.2014.44856

### 13 Seznam použitých zkratek

ARE - prvek antioxidační odezvy

DCPIP - 2,6-dichlorfenolindofenol

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA - kyselina deoxyribonukleová

dNTP - deoxynukleotidové trifosfáty

EDTA - kyselina etylendiaminotetraoctová

FAD - flavin adenin dinukleotid

GA - geldamycinu

*Hinf I* - restriční endonukleáza získaná z *Haemophilus influenzae*

Hsp70 - proteinem tepelného šoku 70

Keap1 - Kelch ECH associating protein 1

Mdm2 - Mouse double minute 2 homolog

MDS - myelodyplastický syndrom

MMC - Mitomycin C

NAD(P)H - Nikotinamidadenindinukleotidfosfát

*NQO1* - NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza 1

*NQO1\*1* - nemutovaná varianta genu *NQO1*

*NQO1\*2* - mutovaná varianta genu *NQO1* vznikající substitucí thyminu za cytosin v nukleotidové pozici 609

*NQO1\*3* - mutovaná varianta genu *NQO1* vznikající substitucí thyminu za cytosin v nukleotidové pozici 465

Nrf2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2

PCR - polymerázová řetězová reakce

RFLP - polymorfismus délky restrikčních fragmentů

ROS - reaktivní formy kyslíku

SDS - dodecylsírán sodný