

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav biologie a lékařské genetiky

Barbora Koutníková

**Stanovení exprese vinkulinu pomocí
RT-PCR**

Bakalářská práce

Praha 2013

Autor práce: **Barbora Koutníková**

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Jaroslav Mareš, CSc.**

Oponent práce: **Mgr. Michal Černý**

Datum obhajoby: **2013**

Bibliografický záznam

KOUTNÍKOVÁ, Barbora. *Stanovení exprese vinkulinu pomocí RT-PCR*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky, 2013. 44 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Jaroslav Mareš, CSc.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá metodikou semikvantitativního stanovení exprese vinkulinu, který patří do skupiny kandidátních genů, podílejících se na vzniku karcinomu prostaty. Práce je rozdělena na část teoretickou, ve které je popsán karcinom prostaty, jeho klasifikace, varianty, diagnostika a genetické změny, vedoucí k jeho vzniku. Dále jsou zde uvedeny vlastnosti a struktura vinkulinu a základní data o metodě PCR, včetně některých modifikací, kterou byla stanovena exprese vinkulinu. V praktické části jsou vysvětleny postupy metody, je zde uveden soubor pacientů, výsledky optimalizace metody a hodnoty relativní exprese daného genu u skupiny pacientů s časným tumorem prostaty.

Annotation

This thesis is dedicated to a method of semiquantitative determination of expression of vinculin, which belongs to a group of candidate genes involved in a prostate cancer development. The thesis is divided into a theoretical part, in which prostate cancer, its classification, variants, diagnostic and genetic changes responsible for prostate cancer development are described. Furthermore the properties, structure of vinculin and the basic data about the PCR method, including some modifications of the PCR method by vinculin expression are also discussed in this part. The practical part deals with procedure methods that are explained. A set of patients, results of optimization methods and values of a relative gene expression of the vinculin gene in a group of patients with early prostate cancer are also given there.

Klíčová slova

karcinom prostaty, diagnostika nádoru, kandidátní geny, vinkulin, semikvantitativní RT-PCR

Keywords

prostate cancer, tumor diagnostics, candidate genes, vinculin, semiquantitative RT-PCR

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Jaroslava Mareše, CSc., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 22. 4. 2013

Barbora Koutníková

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. RNDr. Jaroslavu Marešovi, CSc. za jeho cenné rady, které mi při tvorbě této práce věnoval, za jeho čas a přístup. Poděkování patří také Bc. Vieře Semanekové, která mi vždy ochotně pomohla a poradila, MUDr. Markovi Schmidtovi za analyzovaný biologický materiál a v neposlední řadě celému Ústavu biologie a lékařské genetiky za umožnění práce v jeho laboratořích.

Obsah

ÚVOD.....	7
1 TEORETICKÁ ČÁST	7
1.1 PATOLOGIE PROSTATY	7
1.1.1 Prostata.....	7
1.1.2 Karcinom prostaty	8
1.1.3 Rizikové faktory vzniku karcinomu prostaty	9
1.1.4 Příznaky karcinomu prostaty.....	10
1.1.5 Klasifikace adenokarcinomu	10
1.1.6 Genetické změny u karcinomu prostaty	12
1.1.7 Diagnostika adenokarcinomu	13
1.2 VINKULIN	15
1.2.1 Vinkulin a karcinom prostaty.....	16
1.3 GENOVÁ EXPRESE	17
1.4 METODA PCR	18
1.4.1 Definice PCR	18
1.4.2 Jednotlivé fáze PCR	18
1.4.3 Technické vybavení a reagentie pro PCR.....	19
1.4.4 Reakční podmínky PCR.....	21
1.4.5 Výhody a nevýhody PCR.....	21
1.4.6 Využití PCR	22
1.4.7 RT-PCR.....	22
1.4.8 Kvantitativní PCR v reálném čase (Real-Time PCR)	23
1.4.9 Gelová elektroforéza nukleových kyselin	23
2 CÍLE PRÁCE	25
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 SOUBOR PACIENTŮ.....	26
3.2 POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	27
3.2.1 Reagentie.....	27
3.2.2 Primery.....	28
3.2.3 Přístrojové vybavení	30
3.3 PRACOVNÍ POSTUP	30
3.3.1 Určení T_a : gradientová PCR.....	30
3.3.2 RT-PCR.....	31
3.3.3 Příprava gelu a elektroforéza	32
3.3.4 Vyhodnocení výsledků elektroforézy.....	32
4 VÝSLEDKY.....	34
4.1 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ SEMIKVANTITATIVNÍ RT-PCR.....	34
4.1.1 Určení teploty annealingu T_a : výsledky gradientové RT-PCR.....	34
4.1.2 Výsledky exprese vinkulinu	34
4.1.3 Výsledky exprese glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy.....	35
4.1.4 Hodnoty relativní exprese	35
5 DISKUZE	37
ZÁVĚR	39
REFERENČNÍ SEZNAM	40

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMV	avian myeloblastosis virus; virus ptačí myeloblastózy
AR	androgen receptor; androgenní receptor
BHP	benigní hyperplazie prostaty
BRCA1,2	breast cancer 1,2 gene
CaP	karcinom prostaty
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; inhibitor 1B cyklin-dependentní kinázy
cDNA	complementary DNA; komplementární DNA
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate; deoxyribonukleosidtrifosfát
DRV	digitální rektální vyšetření
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GSTP1	glutathione S-transferase 1; glutathion-S-transferáza 1
hK2	hexokinase 2; hexokináza 2
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA; heterogenní jaderná RNA
MMLV	Moloney murine leukemia virus; Moloneyho virus myši leukémie
mRNA	messenger RNA; mediátorová RNA
MSR1	macrophage scavenger receptor 1; makrofágový vychytávací receptor 1
MVCL	metavinculin; metavinkulin
NKX3.1	homeobox NK3.1
P27	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; inhibitor 1B cyklin-dependentní kinázy
PCR	polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce
PSA	prostate-specific antigen; prostatický specifický antigen
PSCA	prostate stem cell antigen; prostatický antigen kmenových buněk
PSMA	prostate-specific membrane antigen; prostatický

	specifický membránový antigen
PTEN	phosphatase and tensin homolog; homolog fosfatázy a tensinu
RB1	retinoblastoma protein 1; retinoblastomový protein 1
RNASEL	ribonuclease L; ribonukleáza L
RT-PCR	reverse transcription PCR; PCR s reverzní transkripcí
snoRNA	small nucleolar RNA; malá jadéřková RNA
snRNA	small nuclear RNA; malá jaderná RNA
T _a	annealing temperature; teplota annealingu
Taq	Thermus aquaticus; bakterie Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borate/EDTA
TERT	telomerase reverse transcriptase; telomerázová reverzní transkriptáza
T _m	melting temperature; teplota tání
TNM	Tumour Node Methastasis
tRNA	transfer RNA; transferová RNA
TRUS	transrektální ultrasonografie
Tth	Thermus thermophilus; bakterie Thermus thermophilus
ÚBLG	Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol
VCL	vinculin; vinkulin

ÚVOD

Téma své bakalářské práce jsem si vybrala na základě svých dosavadních zkušeností s metodou PCR v rámci své předchozí praxe. Tato metoda mě zaujala, stejně jako problematika karcinomu prostaty.

1 Teoretická část

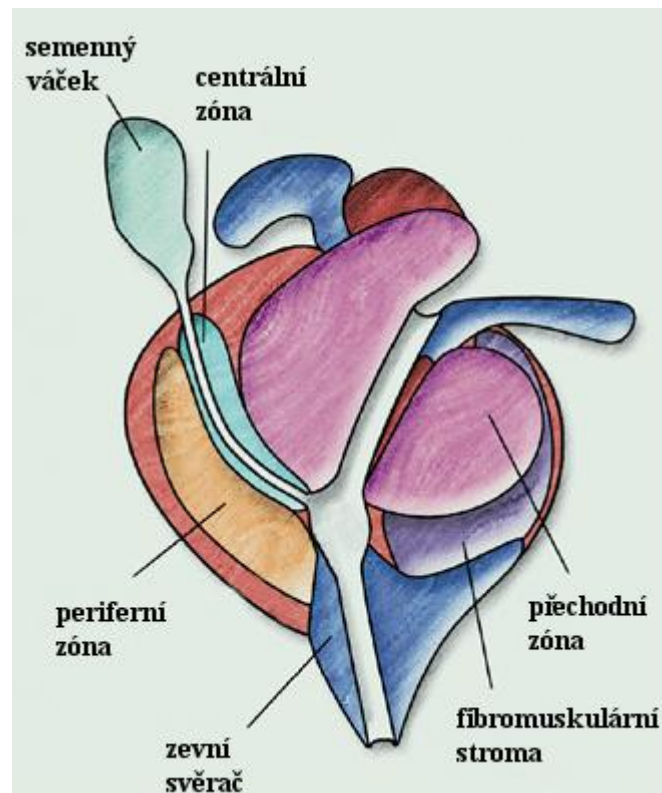
1.1 Patologie prostaty

1.1.1 Prostata

Prostata je mužská přídatná pohlavní žláza umístěná pod močovým měchýřem mezi svalovinou vnitřního a zevního svěrače. Začíná se vyvíjet od 3. měsíce gravidity a v období puberty je vývoj prostaty ukončen [Naňka et al., 2009, s. 209]. Její růst je stimulován androgeny (především testikulárním testosteronem) [Belej et al., 2008]. Prostata dosahuje velikosti vlašského ořechu s hmotností kolem 20 gramů. Prostatou prochází močová trubice. Prostata obsahuje tuboalveolární žlázy, hladkou svalovinu a vazivové stroma. Je kryta vazivovým obalem, který je z vnější strany obklopen žilní pletení. Žlázy prostaty vystylá jednořadý i víceřadý epitel. Produktem tuboalveolárních žláz je prostatický sekret, který tvoří ejakulát [Naňka et al., 2009, s. 210].

Koncem 70. let rozlišil McNeal glandulární zóny prostaty (Obrázek 1) na nejvíce zastoupenou periferní zónu (65-70 %), centrální zónu (25 %) a přechodní zónu (5-10 %), při čemž nejvíce karcinomů prostaty vzniká v periferní zóně [Čermák et al., 2007]. Benigní hyperplazie prostaty (BHP) je způsobena hyperplazií žláz přechodní zóny [Naňka et al., 2009, s. 211].

Obrázek 1. Anatomie prostaty, zdroj: www.waltr.net/oncology, upraveno



1.1.2 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty (CaP) je jedním z nejvýznamnějších onemocnění v mužské populaci a patří mezi nejfrekventovanější maligní onemocnění. V EU ročně přibude asi 85 000 nových pacientů s úmrtností kolem 9% [Dvořáček et al., 2005, s. 226]. Statistiky uvádějí, že karcinomem prostaty je postiženo asi 2,6 milionu evropských mužů [Schmidt et al., 2010]. Ve světě, včetně ČR, incidence karcinomu prostaty každoročně stoupá a s tím také souvisí zvýšená úmrtnost, která je patrná například ve Švédsku a dalších skandinávských zemích. Naopak v USA, díky vyspělým programům prevence a včasné léčby, se snižuje. Stále však platí, že incidence je zde dvakrát vyšší než v Austrálii nebo na Novém Zélandu, které zauímají druhé místo [Xu et al., 2013]. Po zavedení bezplatného screeningu byla zaznamenána nižší úmrtnost také v Tyrolsku [Zima, 2007, s. 491]. Nejnižší incidence je pak u čínských zemědělců [Xu et al., 2013]. Ze studií také vyplývá, že u Afroameričanů je incidence onemocnění vyšší než u

bělochů a také mortalita je u negroidního etnika dvakrát vyšší než u kavkazského [Dvořáček et al., 2005, s. 227].

Nejčastěji se vyskytující CaP je adenokarcinom. Rozlišujeme prostatický ductální adenokarcinom, který se nejčastěji vyskytuje v prostatické uretře nebo ve velkých periuretrálních prostatických vývodech, při němž diagnostický faktor **PSA** (prostatický specifický antigen) nebývá zvýšený, pokud se nejedná již o kostní metastázy. Dalším typem adenokarcinomu je mucinózní adenokarcinom, pro něhož je charakteristická přítomnost hlenu se shluky nádorových buněk. Tento typ karcinomu často doprovázejí kostní metastázy a vyskytuje se vzácně. Dalším vzácným karcinomem bývá adenokarcinom z prstenčitých buněk, který doprovází špatná prognóza a karcinom se vyskytuje převážně s jiným špatně diferencovaným adenokarcinomem prostaty. Vzácně se vyskytuje také sarkomatoidní karcinom, který je přítomen spíše u starších mužů, projevuje se urinární obstrukcí a má také velmi špatnou prognózu. Tento typ karcinomu může být doprovázen heterologními komponentami, jako jsou kostní, chrupavčité nebo svalové tkáně. Neuroendokrinní karcinom provázejí paraneoplastické syndromy a maligní hyperkalcémie. Další variantou adenokarcinomu je bazocelulární adenokarcinom, u kterého nebývá zvýšený **PSA** a který postihuje širokou věkovou skupinu mužů. U této varianty rozlišujeme formu adenoidně cystickou a bazaloidní, které se mohou kombinovat. Vzácnými adenokarcinomy jsou dlaždicobuněčný a adenoskvamózní karcinom, které se mohou objevit po hormonální terapii nebo po ozařování jiného nádoru. Vyznačují se agresivním chováním a je třeba vyloučit metastázu či prorůstání z jiné lokalizace. U karcinomu z přechodního epitelu se vyskytují spíše odvozené sekundární nádory, které pronikají do prostaty z močového měchýře. Nejedná se o nádor hormonálně dependentní [Dvořáček et al., 2005, s. 247; Hes et al., 2011].

1.1.3 Rizikové faktory vzniku karcinomu prostaty

Mezi hlavní rizikové faktory vzniku CaP patří dědičnost, etnikum a věk, možným faktorem je i zvýšený příjem živočišných tuků v potravě, především v červeném mase a uzeninách. Z vitamínů je to nedostatečný přívod vitamínu E a A. Důležitým ochranným prvkem je také selen. Dalšími rizikovými faktory je nedostatečný přívod vlákniny, kouření a obezita [Giovannucci et al., 2007; Schmidt et al., 2007]. Mezi rizikové faktory patří rovněž nedostatek vitamínu D, který má protinádorový

účinek, což je patrné u Afroameričanů, v jejichž kůži je syntéza vitamínu D snížena [Dvořáček et al., 2005, s. 232]. Pravděpodobnost vzniku rakoviny prostaty se zvyšuje se vzrůstajícím věkem muže, většina případů je diagnostikována po 65. roce života [Dvořáček et al., 2005, s. 227]. Pokrevní příbuzný muže, postiženého CaP, má vyšší riziko, že se u něj karcinom vyskytne. Se vznikem CaP také souvisí působení androgenů, které ovlivňují vývoj prostaty i vznik a progresi karcinomu [Kral et al., 2011]. U kastrovaných mužů nebo u postižených kongenitálními hormonálními abnormalitami se CaP většinou nevyskytuje [Dvořáček et al., 2005, s. 232]. V současné době není etiologie CaP zcela jasná, lze však říci, že se CaP řadí mezi multifaktoriální onemocnění [Xu et al., 2013].

1.1.4 Příznaky karcinomu prostaty

K příznakům karcinomu prostaty patří časté močení, hlavně v noci, obtíže při močení, slabý a přerušovaný průtok moče, inkontinence, problémy s erekcí a bolestivá ejakulace, krev v moči či spermatu. Může se objevit bolest na hrázi a za sponou stydkou. U pokročilejších nádorů je to bolest kolem konečníku, zácpa a nález krve ve stolici. Další příznaky se odvíjí od případných metastáz [Dvořáček et al., 2005, s. 273]. V časném stadiu je CaP asymptomatický [Zima, 2007, s. 491].

1.1.5 Klasifikace adenokarcinomu

Klasifikace adenokarcinomu se provádí na základě biopsie pomocí Gleasonova skóre, které stanovuje stupeň histologické diferenciaci neboli grading a je nejčastěji užívaným klasifikačním systémem. Hodnotí se architektonika prostatické tkáně, přesněji organizace nádorových žlázek, stupněm 1-5. Stupeň 1 značí nejlépe diferencovaný typ nádoru a označení 5 nejnižší diferenciaci [Kral et al., 2007]. K hodnocení se používá nejčastější a druhý nejčastější histologický obraz [Dvořáček et al., 2005, s. 245]. Dalším klasifikačním kritériem je systém TNM. V tabulce 1 můžeme vidět rozdělení dle rozsahu primárního nádoru (T), šíření do regionálních lymfatických uzlin (N) a výskyt vzdálených metastáz (M) [Dvořáček et al., 2005, s. 282].

Tabulka 1. Klasifikace TNM (Tumour Node Methastasis), zdroj: www.uzis.cz

T- Primární nádor	
TX	primární nádor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního nádoru
T1	klinicky nezjistitelný nádor, ani palpačně, ani zobrazovacími metodami
T1a	nádor zjištěn náhodně histologicky v 5 % nebo méně resekované tkáně
T1b	nádor zjištěn náhodně histologicky ve více než 5 % resekované tkáně
T1c	nádor zjištěn při punkční biopsii
T2	nádor omezen na prostatu
T2a	nádor postihuje polovinu jednoho laloku nebo méně
T2b	nádor postihuje více než jednu polovinu jednoho laloku, ne však oba laloky
T2c	nádor postihuje oba laloky
T3	nádor se šíří přes pouzdro prostaty
T3a	extrakapsulární šíření včetně mikroskopického poškození hrdla močového měchýře
T3b	nádor infiltruje semenné vázky
T4	nádor je fixován nebo postihuje okolní struktury jiné než semenné vázky
N- Regionální mízní uzliny	
NX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	metastázy v regionálních mízních uzlinách
M- Vzdálené metastázy	
MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	bez vzdálených metastáz
M1	vzdálené metastázy
M1a	jiná než regionální mízní uzlina
M1b	kost
M1c	jiná lokalizace

1.1.6 Genetické změny u karcinomu prostaty

Asi 10-15 % případů karcinomu prostaty je podmíněno geneticky. Jedná se o tzv. familiární karcinom, kdy jsou postiženi nejméně dva muži v jedné rodině [Kráal et al., 2010]. V posledních 30 letech byly provedeny studie se zaměřením na rizikové geny a jejich lokusy. U nádorových buněk jsou popisované mutace, delece, chromosomální aberace a změny metylace DNA [Schmidt et al., 2010].

Mezi hlavní geny, uplatňující se při vzniku CaP, patří gen ***RNASEL*** (ribonukleáza L), lokalizovaný na 1q25.3, jehož mutace se vyskytuje u dědičné formy CaP. ***RNASEL*** kóduje ribonukleázu, která se podílí na degradaci virové RNA [Meyer et al., 2010]. Gen ***MSRI*** (makrofágový vychytávací receptor 1), lokalizovaný na 8p22, zprostředkovává adhezi makrofágů a fagocytózu apoptotických buněk a mikrobů a jeho absence snižuje odolnost vůči bakteriálním infekcím. U tohoto genu byly nalezeny missense a nonsense mutace [Kral et al., 2011]. Dalšími významnými geny, podílejícími se na vzniku CaP, jsou ***BRCA1*** (breast cancer 1 gene), lokalizovaný na 17q21.31, a ***BRCA2*** (breast cancer 2 gene), lokalizovaný na 13q13.1, které regulují buněčný cyklus a reparaci poškozené DNA. Mutace těchto genů se nacházejí u agresivních forem onemocnění [Castro et al., 2012]. Mezi geny regulující androgenní aktivitu, které se významně podílejí na vzniku CaP, patří gen androgenního receptoru ***AR***, lokalizovaný na Xq12, který se uplatňuje při vývoji samčích pohlavních znaků a má důležitou úlohu při růstu a vývoji prostatických epiteliálních buněk. Mutace tohoto genu se vyskytují rovněž u CaP [Gottlieb et al., 2004]. Patří sem také gen cytochromu ***P450c17a*** označovaný ***CYP17***, lokalizovaný na 10q24.32, který ovlivňuje syntézu pohlavních hormonů [Schmidt et al., 2010]. Do skupiny tumor supresorových genů patří gen ***PTEN*** (homolog fosfatázy a tensinu), lokalizovaný na 10q23.31, kódující fosfatázu. U CaP bývá jeho hladina snižena [Carracedo et al., 2011]. Gen ***NKX3.1*** (homeobox NK3.1), lokalizovaný na 8p21.2, hraje důležitou roli ve vývoji prostaty a jeho snížená exprese se rovněž nalézá u CaP. Při časně prostatické kancerogenezi můžeme sledovat deleci retinoblastomového tumor supresorového genu ***RBI*** (retinoblastomový protein 1) (13q14.2), který negativně reguluje buněčný cyklus a potlačuje genovou expresi [Schmidt et al., 2010]. Gen ***CDKN1B*** (inhibitor 1B cyklin-dependentní kinázy), lokalizovaný na 12p13.1, inhibuje buněčný cyklus a reguluje buněčnou motilitu a apoptózu. Tento gen kóduje protein ***p27***, jehož sníženou hladinu nalézáme u CaP se špatnou prognózou [Dvořáček et al., 2005, s. 235]. Gen ***GSTP1*** (glutathion-S-

transferáza 1), umístěný na 11q13.2, má detoxikační funkci a chrání prostatické buňky před působením kancerogenů [Bastian et al., 2004].

Kromě genetických změn se na vzniku CaP mohou podílet také záněty prostaty (prostatitidy) nebo sexuálně přenosné infekce [Dvořáček et al., 2005, s. 236].

1.1.7 Diagnostika adenokarcinomu

Ke snížení mortality na karcinom prostaty přispěl screening, který se provádí plošně u asymptomatických mužů, nebo na přání pacienta či ošetřujícího lékaře [Dvořáček et al., 2005, s. 274].

Nejčastěji jsou vyšetřováni muži starší 50 let stanovením hladiny **PSA**, či digitálním rektálním vyšetřením (DRV) [Aus et al., 2006].

PSA, který je klinicky nejvýznamnější marker nádorového onemocnění prostaty při časně diagnostice CaP, je také vhodným ukazatelem progresu nádoru, jeho agresivity, úspěšnosti léčby a recidivy po léčbě [Zima, 2007, s. 490]. Zavedení tohoto markeru do laboratorní praxe přispělo k vyššímu zachytu CaP, především jeho časného stádia [Lukeš et al., 2001]. Jedná se o glykoprotein produkovaný epiteliálními buňkami prostaty, patří tedy mezi orgánově specifické antigeny, může však být zvýšen i u nemaligních onemocnění prostaty, jako jsou prostatitidy nebo benigní hyperplazie prostaty (BHP) [Greene et al., 2009]. Zvýšenou hladinu **PSA** lze také detekovat po urologických zákrocích nebo po pohlavním styku. Gen kódující **PSA** je lokalizován na 19. chromosomu. Fyziologickou funkcí **PSA** je zkapalnění spermatu, ve kterém je hojně zastoupen (0,2-0,5 mg/ml). Referenční rozmezí **PSA** je do 4 ng/ml (v séru), což bývá někdy zavádějící, jelikož asi u 20 % pacientů s CaP je hladina **PSA** nižší než 4 ng/ml. Také v jednotlivých věkových kategoriích se referenční hodnoty **PSA** liší. Pro časnou detekci CaP by se měla koncentrace **PSA** stanovovat u mužů od 45. roku života [Lukeš et al., 2001]. V séru se nachází **PSA** ve dvou formách, jako volný nebo jako vázaný s chymotrypsinem nebo alfa-2-makroglobulinem [Štern et al., 2008]. Při benigních onemocněních prostaty bývá v séru vyšší podíl volné formy **PSA**. V séru má celkový **PSA** poločas 1,9-2,3 dny, poločas volného **PSA** je 2 hodiny [Lukeš et al., 2001]. Studie ukazují na korelaci celkové hladiny **PSA** s klinickou a patologickou klasifikací a objemem nádoru. Riziko výskytu CaP se zvyšuje se vzrůstajícími hladinami **PSA** [Dvořáček et al., 2005, s. 262].

Mezi nádorové markery vyšetřované při podezření na CaP patří také kalikrein **hK2**, který se používá pro rozlišení CaP a benigní hyperplazie prostaty. U 60 %

pacientů s CaP bývá zvýšená také hladina kalikreinu **hK11** [Borgoño et al., 2004]. Dalším používaným markerem je **PSCA** (prostatický antigen kmenových buněk), který se zvyšuje při přítomnosti metastáz [Štern et al., 2008]. Specifický pro prostatu je i **PSMA** (prostatický specifický membránový antigen), jehož zvýšená hladina doprovází primární nádor i metastázy a pomáhá rozlišit CaP od BHP [Ghosh et al., 2004]. Nespecifickou pro prostatu je telomerázová reverzní transkriptáza (**TERT**), kterou lze často prokázat v nádorových buňkách [Štern et al., 2008].

K určení tvaru a velikosti prostaty se využívá digitální rektální vyšetření. Uplatňuje se spíše u větších nádorů, kde je možno hodnotit uzlíky a tužší konzistenci [Dvořáček et al., 2005, s. 275]. Dalším způsobem detekce karcinomu prostaty je TRUS (transrektální ultrasonografie), která odhalí strukturu prostaty, její objem, difúzní a ložiskové změny a využívá se i při biopsii a následném histologickém vyšetření [Belej, 2009]. K nevýhodě patří nepřesné rozlišení benigních a maligních změn [Delongchamps et al., 2006].

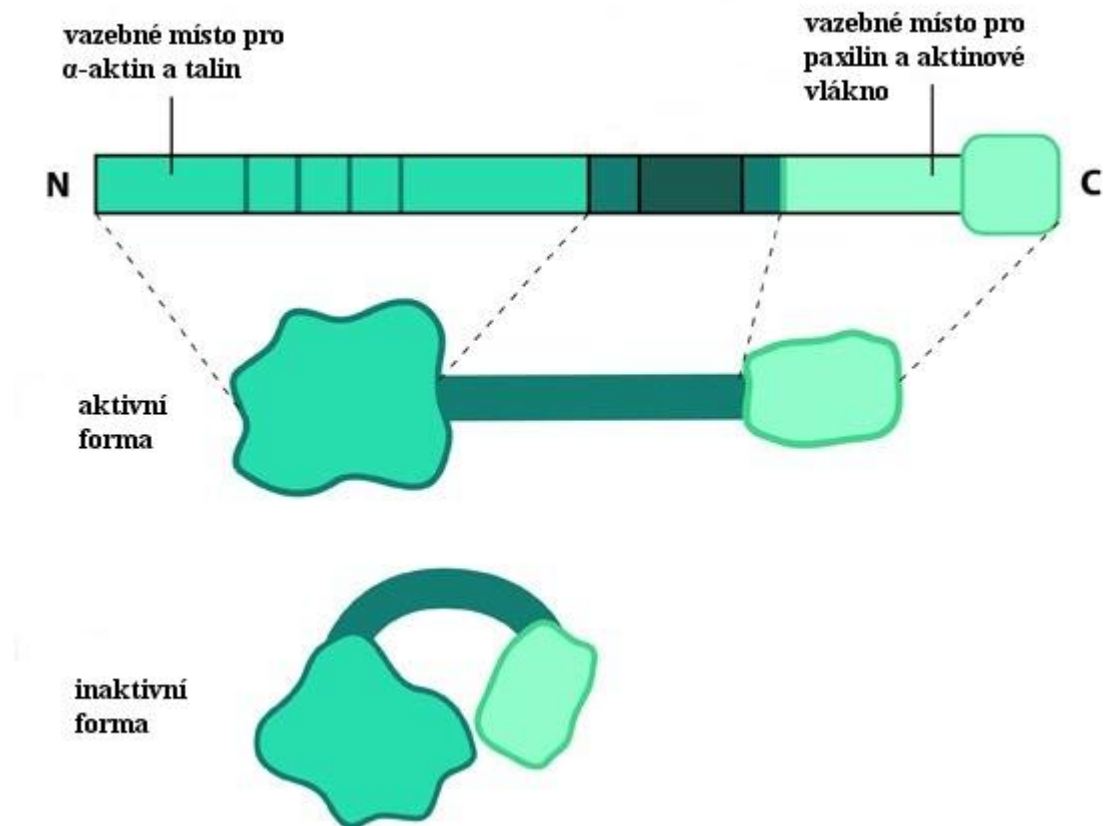
1.2 Vinkulin

Vinkulin (**VCL**) je 117 kDa velký adaptorový membránový protein obsahující 1066 aminokyselin a vazebná místa pro více než 15 proteinů [Bakolitsa et al., 2004; Carisey et al., 2011]. Patří do skupiny aktin-vázajících proteinů lokalizovaných v cytoskeletu eukaryot [Mierke, 2009]. Vinkulin se vyskytuje obvykle ve dvou formách, aktivní a inaktivní, které jsou ovlivňovány vzájemným působením počáteční oblasti neboli N-konce (Vh-doména) a koncové oblasti neboli C-konce (Vt-doména). Globulární N-konec obsahuje vazebná místa pro talin a α -aktin, na krátkém C-konci vinkulinu jsou vazebná místa pro F-aktin a paxilin. Obě domény vinkulinu jsou spojené flexibilním úsekem (Obrázek 2) [Janssen et al., 2006].

Funkcí vinkulinu je zajišťování buněčné migrace a adheze. Vinkulin je také důležitou složkou fokální adheze. Přenáší signály mezi cytoskeletem a adhezivními receptory. Uplatňuje se také při regulaci apoptózy. Původně byl vinkulin objeven v různých kulturách buněk na konci aktinových vláken, později se zjistilo, že je ve všech adhezních spojích [Janssen et al., 2006]. Gen **VCL** je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu 10 (10q22.2) [Ruiz et al., 2011].

Některé výzkumy poukazují na změnu exprese vinkulinu v souvislosti s nádorovou proliferací, například u karcinomu prostaty či kolorektálního karcinomu [Yang et al., 2010]. Dále je uváděna souvislost mezi úbytkem vinkulinu a dilatační kardiomyopatií a familiární hypertrofickou kardiomyopatií [Vasile et al., 2006]. Úbytek vinkulinu je spojován také s poruchami buněčné adheze a zvýšenou buněčnou motilitou [Ruiz et al., 2011]. Isoformou vinkulinu je metavinkulin (**MVCL**), který je přítomný ve svalech a v trombocytech [Zemljic-Harpf et al., 2009].

Obrázek 2. Struktura molekuly vinkulinu, zdroj: <http://www.mechanobio.info>, upraveno



1.2.1 Vinkulin a karcinom prostaty

Podle studie, provedené Ruizem et al. u pacientů s pokročilým nádorem prostaty, souvisí nadměrná exprese vinkulinu s amplifikací tohoto genu. Do studie bylo zahrnuto přes 400 vzorků pacientů s CaP, v různém stádiu onemocnění. Ukázalo se, že u kastrace-rezistentního CaP (jehož buňky jsou odolné vůči antiandrogenní léčbě) byla exprese vinkulinu vyšší, oproti vzorkům s benigní hyperplazií prostaty, kde byla exprese minimální až nulová. Nadměrná exprese vinkulinu tedy nejspíše přispívá k proliferaci nádorových buněk. Oblast 10q22, kde se gen pro vinkulin nachází, byla již dříve zkoumána, jelikož je bohatá na geny, uplatňující se při vzniku karcinomu prostaty. Amplifikace a s ní spojená nadměrná exprese genu jsou typické pro proteiny s onkogenními vlastnostmi. U této problematiky zatím není známá molekulární podstata [Ruiz et al., 2011; Shore et al., 2012].

1.3 Genová exprese

Obečně se aktivita genu určuje pomocí stanovení genové exprese. Přitom se sleduje pomocí např. Northernova přenosu tvorba mRNA nebo Westernova přenosu tvorba proteinů. Northernův blotting se v posledních letech nahrazuje RT-PCR. Genovou expresí se označuje proces, kdy je informace z DNA převedena do konkrétní buněčné struktury a funkce, danou příslušnými RNA a proteiny. Tedy konečným produktem genové exprese mohou být molekuly proteinů nebo také RNA [Pritchard et al., 2007, s. 29]. U strukturních genů (geny, ve kterých je uložena informace o primární struktuře proteinu) dochází nejprve k transkripci neboli přepisu určitého úseku DNA (genu) do mRNA (mediátorové RNA). mRNA pak slouží jako matrice pro syntézu proteinů. U eukaryot je produktem transkripce hnRNA (heterogenní jaderná RNA), která je prekurzorem mRNA. hnRNA může být převedena do zralé mRNA až po řadě úprav. Z jádra je pak přenesena zralá mRNA do cytoplasmy, kde je translatována [Kočárek, 2008, s. 148]. Monitorování tvorby mRNA je nejdůležitějším aspektem hodnocení genové exprese, i když ne jediným.

1.4 Metoda PCR

1.4.1 Definice PCR

Zavedení polymerázové řetězové reakce (PCR) Karym Mullisem (Cetus Corporation, Kalifornie) roku 1985 bylo pro molekulární biologii velmi významné. Mullis získal za tento objev v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii [McPherson et al., 2000, s. 3]. Metoda PCR slouží ke zmnožení (amplifikaci) konkrétního úseku DNA pomocí jednoduché enzymatické reakce. Získá se tak přesná kopie sekvence genomové DNA bez předchozího klonování ve vektorech. Reakce probíhá *in vitro* a k analýze stačí velmi malé množství vzorku [Pritchard et al., 2007, s. 150].

1.4.2 Jednotlivé fáze PCR

Polymerázová řetězová reakce je cyklická. Každý cyklus se skládá z denaturace templátové DNA, hybridizace (annealingu) primerů a syntézy nového vlákna DNA (elongace, extenze) [Pritchard et al., 2007, s. 150].

1. Denaturace

Dvouvláknová templátová molekula DNA se denaturuje na dvě jednotlivá templátová vlákna DNA. Mezi bázemi se přeruší vodíkové můstky a oba řetězce se oddělí. Vzniknou dva samostatné řetězce (*dsDNA* → 2 *ssDNA*). Denaturace probíhá při 93-95 °C (u lidské DNA) [Kočárek, 2008, s. 133].

2. Připojení (hybridizace, annealing) primerů

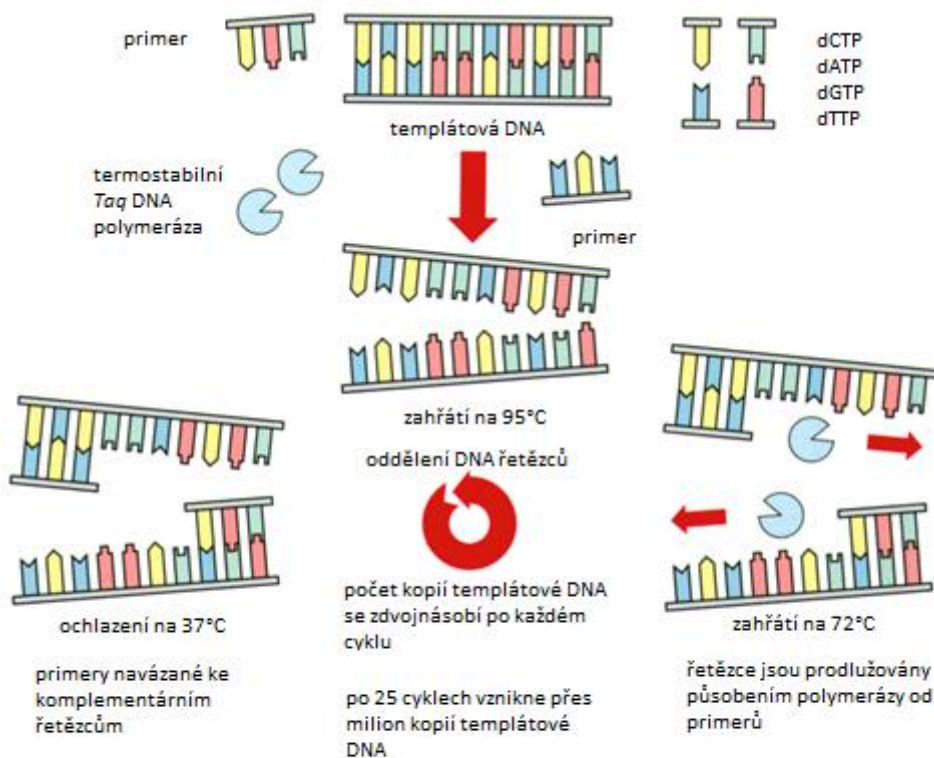
Teplota při hybridizaci dosahuje rozmezí 45-72 °C. Primery se komplementárně připojí k jednořetězcové DNA. Cílová sekvence, na kterou primery hybridizují, musí být specifická jen pro amplifikovanou oblast [Kočárek, 2008, s. 133].

3. Syntéza nových řetězců DNA (elongace)

Při teplotě 72 °C dochází k elongaci nukleotidových řetězců pomocí *Taq* DNA-polymerázy. Ta nasedá na 3' konce primerů a připojuje k nim nové nukleotidy. Nově vznikající řetězec se prodlužuje ve směru 5' → 3' [Kočárek, 2008, s. 133].

Každý cyklus trvá několik minut, přičemž se množství DNA vždy zdvojnásobí. Po 30 cyklech vzniká až 10⁸ kopií původní sekvence [Pritchard et al., 2007, s. 150].

Obrázek 3. Popis PCR reakce, zdroj: www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa, upraveno



1.4.3 Technické vybavení a reagentie pro PCR

- **Reakční směs**

Tlumivý roztok obsahující Tris-HCl (udržuje optimální pH 6,8-8,3), KCl (nutný pro navazování primerů), Mg^{2+} (kofaktor DNA-polymerázy), tvoří rozpustný komplex s jednotlivými dNTP, rozpoznávaný DNA-polymerázou; důležitá je jeho správná koncentrace [McPherson et al., 2000, s. 23; Zima, 2007, s. 687].

- **Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP)**

Základní kameny pro syntézu nového polynukleotidového řetězce. Koncentrace dNTP by měla být 50-200 μ M. Pro replikaci DNA jsou nutné dATP, dGTP, dCTP, dTTP [McPherson et al., 2000, s. 25; Zima, 2007, s. 687].

- **DNA-polymeráza**

Nejčastěji využívanou DNA-polymerázou je termostabilní *Taq* DNA-polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, která snáší teplotu až do 95°C. Dalšími termostabilními polymerázami jsou: polymerázy *Tfl*, *Tbr*, *Tth*, Stoffelův fragment, *Tli*, *Pfu*, *Pwo*, *U* *Tma* [McPherson et al., 2000, s. 42].

- **Oligonukleotidové jednořetězcové primery**

Pro reakci jsou nutné 2 primery rozdílné sekvence, komplementární k oběma koncům amplifikovaného úseku DNA, díky počítačovým programům lze vytvořit specifické primery [McPherson et al., 2000, s. 26].

- **Templátová DNA, RNA**

Izolovaná ze vzorku, matrice pro tvorbu nového vlákna. Nukleové kyseliny lze izolovat prakticky z jakéhokoliv zdroje. Lze použít vzorky lidské a zvířecí tkáně, kultury bakterií, řas a sinic nebo transgenní rostliny a živočichy. Templátovou nukleovou kyselinu lze izolovat i z velmi starých archeologických vzorků a pomocí PCR ji amplifikovat. K izolaci DNA i RNA slouží komerční kity, samozřejmě je práce s materiálem v co nejčistší formě [McPherson et al., 2000, s. 50].

- **Termocyklery**

Reakce se provádí v termocyklerech (Obrázek 4), ve kterých se automaticky mění teplota v časových intervalech podle příslušného teplotního programu. Zkumavky se směsí pro PCR se vkládají do termálního bloku, ve kterém se dle zvoleného programu zvyšuje a snižuje teplota. Blok se zkumavkami je kryt vyhřívaným víkem, které zabraňuje kondenzaci par na víčku mikrozukmavky. Dochází-li ke kondenzaci kapalně reakční směsi, nastává po otevření zkumavky riziko rozstříknutí aerosolu a kontaminace. Pokud víko chybí, obsah mikrozukmavek se převrství minerálním olejem [McPherson et al., 2000, s. 52; Šmarda et al., 2005, s. 74].

Obrázek 4. Termocykler, zdroj:www.biolabo.com



1.4.4 Reakční podmínky PCR

Reakční objem je 5 až 100 μl . Množství templátové DNA v reakci je mezi 1,0 a 500,0 ng. Na jednu reakci je potřeba 25-50 pmol každého primeru (20-30 nukleotidů dlouhého) s cca 50% obsahem GC a s rovnoměrnou distribucí bází. Optimální koncentrace u každého dNTP je 200 $\mu\text{mol/l}$ (rozpětí 200 až 400 $\mu\text{mol/l}$). Koncentrace Mg^{2+} je obvykle 4 mmol/l (tolerance 3 až 8 mmol/l), při vyšší koncentraci se snižuje specifita, vyšší koncentrace je naopak vhodná u primerů bohatých na GC. U *Taq* DNA-polymerázy je optimální množství 1-2 U pro každou reakci (tolerance 0,5-5 U, při vyšší koncentraci může dojít k chybné hybridizaci) [Zima, 2007, s. 687].

1.4.5 Výhody a nevýhody PCR

Mezi hlavní výhody PCR patří vysoká citlivost, k analýze stačí pouze takové množství DNA, které je obsaženo v jediném genomu. Dále je to vysoká rychlost reakce (3-48 h), bezpečnost práce (bez použití radioaktivity), molekulární produkt lze využít při další analýze. Metoda má také vysokou rozlišovací schopnost, lze ji využít i při silně degradované DNA.

K nevýhodám PCR řadíme nemožnost amplifikovat příliš dlouhé sekvence, dále je třeba znát sekvence úseků ohraničujících amplifikované sekvence. Při reakci je také

nezbytná absolutní čistota vzorku a neexistuje proofreadingový mechanismus, tudíž mutace, které mohou vzniknout během PCR, jsou dále rozšiřovány [Pritchard et al., 2007, s. 150].

1.4.6 Využití PCR

Metoda PCR se hojně využívá v prenatalní diagnostice, například u stanovení pohlaví u prenatalních buněk nebo v genetickém poradenství například v prenatalní diagnostice dědičných chorob. Dále se využívá při detekci mutací v genech, studiu polymorfismů DNA a v populační genetice. Pomocí PCR se také detekuje DNA tělu cizí, např. při bakteriální a virové infekci, nebo DNA cirkulující v krvi v extrémně nízkých koncentracích. Zvláště vhodná je diagnostika pomocí PCR například u viru HIV. Další využití je při monitorování terapie rakoviny a detekci leukemií, při typizaci nádorů a identifikaci onkogenů. Citlivost PCR je velmi vysoká a umožňuje detekci jediné buňky v populaci 10^6 normálních buněk. Své uplatnění má také ve výzkumu při izolaci a charakterizaci genů nebo jejich částí, sekvenování DNA, analýze klonů z genových knihoven a značení sond. PCR se uplatňuje také v archeologických výzkumech, soudnictví, kriminalistice a forenzní medicíně [Šmarda et al., 2005, s. 83].

1.4.7 RT- PCR

RT-PCR využíváme tehdy, pokud má být amplifikovanou nukleovou kyselinou RNA, nejčastěji mRNA. Je to metoda vhodná ke stanovení exprese genu, detekci infekčních agens a geneticky podmíněných nemocí [Zima, 2007, s. 686]. Jde o metodu rychlou a velmi citlivou. Při reakci se používá reverzní transkriptáza, která má schopnost přepsat genetickou informaci z mRNA do cDNA (komplementární DNA) [McPherson et al., 2000, s. 183]. Příkladem reverzní transkriptázy je **MMLV** (Moloneyho virus myší leukémie). Příslušný virus je schopen vyvolat v těle hostitele (myš) leukémii [Miyazaki et al., 2010]. Další reverzní transkriptázou je **AMV** (virus ptačí myeloblastózy). Tento virus způsobuje sarkomy a anémie u divokých i domácích ptáků a také u krysy. Jako zdroj reverzní transkriptázy lze také použít termofilní bakterii *Tth* (bakterie *Thermus thermophilus*), pocházející z japonského horkého pramene [Agari et al., 2008].

Templátem je zde původní cytoplasmatická RNA nebo purifikovaná mRNA. Reverzní transkripcí se informace z mRNA převede do cDNA a další postup je totožný s klasickou PCR. Reverzní transkripci i PCR lze provést v jedné reakci a zkumavce, což představuje velkou výhodu a snížení rizika kontaminace [Bustin et al., 2005].

1.4.8 Kvantitativní PCR v reálném čase (Real-Time PCR)

Tato metoda se liší od konvenční PCR tím, že se měří nárůst produktu během reakce, nikoliv na konci jako u klasické PCR. K tomu slouží fluorescenčně značené sondy nebo nespecifická fluorescenční barviva, která interkalují dvouřetězcový PCR-produkt, např. SYBR Green [Bustin, 2010]. Použit lze také duálně značené sondy *TaqMan*, jejichž koncové části jsou značené dvojicí fluoroforů, kdy jeden se označuje jako reporter (fluoreskující fluorofor) a značí 5'-konec sondy a druhým je zhášec (quencher), který nefluoreskuje a značí 3'-konec sondy. Tato technologie využívá exonukleázové aktivity *Taq* DNA-polymerázy, která tyto sondy štěpí. Sekvence sondy je komplementární k dané cílové sekvenci uvnitř amplifikovaného regionu [internetový zdroj www.generi-biotech.com; staženo 2013].

Metoda usnadňuje určení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA. Jedná se o velice přesnou metodu, která se využívá ke stanovení exprese genů a detekci mutací a polymorfismů [Strachan et al., 2004, s. 124].

1.4.9 Gelová elektroforéza nukleových kyselin

Gelová elektroforéza nukleových kyselin je metoda používaná k separaci molekul DNA nebo RNA. Molekuly DNA mají díky fosfátové skupině negativní náboj a v elektrickém poli tedy putují směrem ke kladné elektrodě [Alberts et al., 2005, s. 317]. Rychlost pohybu závisí na délce fragmentů, delší fragmenty putují v gelu pomaleji. Při elektroforéze se používají gely agarózové nebo polyakrylamidové. Agarózové gely se používají pro separaci molekul nukleových kyselin velikosti 100 bp až 50 kb, polyakrylamidové gely k separaci molekul velikosti 10 až 1000 bp. Vzorky a standard, podle kterého lze určit velikost molekuly DNA, se nanášejí do žlábků, vzniklých po vytažení hřebenu z gelu. Pro zviditelnění molekul DNA se do gelu přidává interkalační barvivo, v našem případě GelRed, které interkaluje mezi jednotlivé páry

bázi v DNA a po osvětlení UV zářením vytvoří fluoreskující komplex [Šmarda et al., 2005, s. 13].

Elektroforetická pohyblivost je nepřímo úměrná logaritmu velikosti molekul DNA. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA [Šmarda et al., 2005, s. 13].

2 Cíle práce

Cílem teoretické části této práce bylo stručné shrnutí informací o karcinomu prostaty se zaměřením na genetické změny, které karcinom prostaty provázejí, uvedení rizikových faktorů pro vznik karcinomu prostaty, popis nejčastějších typů adenokarcinomu a jeho diagnostika. Dalším cílem bylo vypracování stručné rešerše o možném kandidátním genu karcinomu prostaty vinkulinu a o jedné z metod pro hodnocení genové exprese, PCR.

Cílem experimentální části práce bylo sestavit a optimalizovat semikvantitativní RT-PCR pro hodnocení genové exprese genu *VCL*, vybrat skupinu pacientů s časným karcinomem prostaty a hyperplazií prostaty a stanovit u nich relativní expresi genu *VCL* metodou semikvantitativní RT-PCR.

3 Experimentální část

3.1 Soubor pacientů

Stanovení exprese genu vinkulinu jsem provedla u 9 pacientů, označených P 16, 22, 25, 27, 32, 34, 36, 37, 50. U těchto pacientů byla provedena izolace mRNA z tkáně karcinomu prostaty nebo tkáně BHP.

Tabulka 2. Soubor pacientů

číslo vzorku	věk pacienta v letech	diagnóza	hladina PSA v séru [ng/ml]	Gleasonovo skóre	TNM
P 16	61	CaP	8,49	3+3	2c
P 22	58	CaP	13,15	4+5	3b
P 25	71	CaP	18,60	3+4	2b
P 27	70	CaP	1,82	3+4	2a
P 32	71	CaP	4,95	5+4	3a
P 34	80	CaP	2,85	3+3	2a
P 36	80	CaP	2,85	3+3	2a
P 37	74	BHP	6,05	BHP	BHP
P 50	52	BHP	2,9	BHP	BHP

V tabulce 2 jsou uvedena čísla vzorků u jednotlivých pacientů a věk pacientů v době odběru tkáně. Dále je zde uvedeno, jestli se jedná o karcinom prostaty nebo benigní hyperplazii prostaty, hladina **PSA** a v případě karcinomu prostaty Gleasonovo skóre a klasifikační systém TNM. Biologický materiál a uvedené informace o pacientech mi poskytl MUDr. Marek Schmidt z Urologické kliniky 2. lékařské fakulty UK a FN Motol Praha.

3.2 Pomůcky a chemikálie

3.2.1 Reagencie

Metoda RT-PCR byla optimalizována při využití kitu OneStep RT-PCR od firmy QIAGEN.

OneStep RT-PCR Kit QIAGEN obsahuje:

- směs dNTP 10 mM
- enzymovou směs
- pufr 5x RT-PCR - 12,5 mM MgCl₂
- H₂O prostou RNAsy

Pufr 10x TBE složený z:

- 108 g TRIS- báze
- 55 g kyseliny borité
- 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) a doplněný na objem 1000 ml destilovanou vodou, při elektroforéze se používá 1x TBE pufr (tj. desetkrát zředěný)

K přípravě gelu jsem používala agarózu (Electrophoresis Grade) od firmy INVITROGEN.

Ke vzorkům se před elektroforézou přidává nanášecí pufr **5x TD**, který obsahuje:

- 20% Ficoll 400
- 25 mM EDTA (pH 8.0)
- 0,05% bromfenolovou modř

K obarvení nukleových kyselin se při elektroforéze používá komerční barvivo **GelRed** od firmy BIOTINUM (1 µl/1 ml gelu).

Spolu s vzorky se analyzuje velikostní standard, což je komerčně dostupná směs fragmentů DNA o známé velikosti. Používala jsem velikostní standard 100 bp DNA Ladder od firmy INVITROGEN.

3.2.2 Primery

Tabulka 3. Primery pro *VCL*

označení primeru	sekvence primeru	T_m [°C]	obsah GC [%]	molekulová hmotnost
VCL2R	5'GAATAAGTGCCCGCTTGGTA 3'	55,1	50	6157,0
VCL2F	5'CTTTCCCCTCTGACATGGAA 3'	54,3	50	6028,0

Testovala jsem dvě dvojice primerů VCL1 a VCL2. Kvalitnějších výsledků jsem dosáhla u dvojice VCL2. Signál u VCL1 byl velmi slabý.

Tabulka 4. Primery pro *GAPD*

označení primeru	sekvence primeru	T_m [°C]	obsah GC [%]	molekulová hmotnost
GAPD2L	5' CGAGATCCCTCCAAAATCAA 3'	52,2	45	6039,0
GAPD2R	5' TGTGGTCATGAGTCCTTCCA 3'	55,7	50	6099,0


K designování primerů a ověření jejich sekvence jsem použila program Primer 3 (Obrázek 5). Navržené primery byly dodány firmou KR D, s.r.o. V tabulce 3 a 4 jsou uvedeny informace od dodavatele. Označení primeru, sekvence primeru, T_m (melting temperature, neboli teplota tání), což je teplota, při níž je polovina molekul dvouřetězcové DNA denaturována na jednořetězcovou DNA. Dále je zde uveden procentuální obsah bází GC a molekulová hmotnost primeru.

Obrázek 5. Program Simgene, zdroj: <http://simgene.com/Primer3>

HOME | HOSTED TOOLS | BOOKMARK US | CONTACT US

SimGene.com

Plasmid Drawing | Primer Design | Sequence Alignment | Sequence Analysis | Sequence Format Conversion



Primer3

Primer3 is a free online tool to design and analyze primers for PCR and real time PCR experiments. Primer3 can also select single primers for sequencing reactions and can design oligonucleotide hybridization probes. The online tool constitutes some important features like primer detection, cloning, sequencing and Primer listing.

INPUT [Help?](#)

Enter or paste a sequence: Upload a file: Soubor nevybrán

Mark: Target Included Region Excluded Region Clear

Pick Left Primer
or Enter Left Primer Sequence

Pick Hybridization Probe
or Enter Probe Sequence

Pick Right Primer
or Enter Right Primer Sequence

GENERAL PARAMETERS

PRODUCT SIZE RANGES:

	MINIMUM	OPTIMUM	MAXIMUM
PRIMER SIZE	<input type="text" value="18"/>	<input type="text" value="20"/>	<input type="text" value="27"/>
PRIMER T _m	<input type="text" value="57.0"/>	<input type="text" value="60.0"/>	<input type="text" value="63.0"/>
PRIMER GC%	<input type="text" value="20.0"/>	<input type="text"/>	<input type="text" value="80.0"/>
PRODUCT T _m	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
PRODUCT SIZE	<input type="text" value="100"/>	<input type="text" value="200"/>	<input type="text" value="1000"/>
MAX T _m DIFFERENCE	<input type="text" value="100.0"/>	FIX THE	<input type="text" value="5"/>
MISPRIMING/REPEAT LIBRARY	<input type="text" value="None"/> ▼		

CONCENTRATION SETTINGS

MONOVALENT CATION	<input type="text" value="50.0"/>	ANNEALING OLIGOs	<input type="text" value="50.0"/>
DIVALENT CATION	<input type="text" value="0.0"/>	dNTPs	<input type="text" value="0.0"/>

3.2.3 Přístrojové vybavení

Tabulka 5. Typy přístrojů a pomůcky

Přístroj	výrobce
Bezpečnostní box Bio-II-A/P	TELSTAR
Termocykler TGradient	BIOMETRA
Elektroforetický zdroj Power PAC 300	BIO-RAD
Vyhodnocovací zařízení MiniBIS Pro	DNR Bio-Imaging Systems
Denzitometr CAMAG Scanner II	CAMAG
Špičky s filtrem, objem 5-10 μ l a 1-200 μ l	AXYGEN
Mikrozkumavky Eppendorf, objem 1,5 ml a 0,2 ml	AXYGEN
Pipety CAPP AUTOCLAVABLE, objem 0,5-10 μ l a 10-100 μ l	CAPP

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Určení T_a : gradientová PCR

Gradientová PCR se používá k optimalizaci reakčních podmínek při PCR. V této bakalářské práci jsem ji využila ke stanovení optimální teploty annealingu T_a , která hraje důležitou roli při zajištění specifičnosti reakce. Metoda se provádí jako klasická PCR, liší se pouze ve zvolené gradientové modifikaci programu na termocykleru a v uspořádání mikrozkumavek s reakční směsí (Tabulka 6). Po elektroforéze a následné detekci jsem tak určila, která teplota annealingu je pro stanovení exprese vinkulinu nejvhodnější.

Tabulka 6. Teplotní rozmezí u gradientové PCR

jamka č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
teplota [°C]	49	49,6	51,2	53,9	56,7	59,6	62,4	65,3	68,1	70,7	72,4	73,0

3.3.2 RT-PCR

1. V bezpečnostním boxu se připraví mastermix. Ve zkumavce se smíchá voda prostá RNAsy, pufr, oba primery, dNTP a nakonec se přidá enzym (Tabulka 7). Zkumavka je chlazená.
2. 9 μl mastermixu se napipetuje do připravených mikrozskumavek, které obsahují 1 μl izolované mRNA.
3. Mikrozskumavky musí být pečlivě uzavřeny a ihned přeneseny do termocykleru, kde je nastavený příslušný program (Tabulka 8 a 9).
4. Po proběhnutí PCR se vzorky přenesou na gel a provede se elektroforéza.

Tabulka 7. Objemy reagií pro přípravu mastermixu pro stanovení VCL a GAPD

reagencie	10 vzorků	15 vzorků
H ₂ O	60 μl	90 μl
5xpufr	20 μl	30 μl
dNTP	4 μl	6 μl
Primer1	1 μl	1,5 μl
Primer2	1 μl	1,5 μl
Enzym	4 μl	6 μl

Tabulka 8. Program RT-PCR pro VCL (35 cyklů)

Krok	teplota [°C]	čas [min]
Reverzní transkripce	50	30
Aktivace DNA-polymerázy	95	15
Denaturace	94	1
Annealing	61	1
Elongace	72	1
Konečná elongace	72	10

Tabulka 9. Program RT-PCR pro GAPD (35 cyklů)

Krok	teplota [°C]	čas [min]
Reverzní transkripce	50	30
Aktivace DNA-polymerázy	95	15
Denaturace	94	1
Annealing	65	1
Elongace	72	1
Konečná elongace	72	10

3.3.3 Příprava gelu a elektroforéza

- V Erlenmeyerově baňce se odváží 2,4 g agarózy.
- Agaróza se rozpustí v 120 ml 1x TBE pufriu.
- Baňka se vloží na 3 minuty do mikrovlnné trouby, poté se zkontroluje rozpuštění agarózy.
- K rozpuštěné agaróze se přidá 12 µl barviva GelRed a pečlivě se vše promíchá.
- Vzniklý gel se nalije do tanku s hřebenem a nechá se minimálně 20 minut tuhnout.
- Hotový gel se přenesse do tanku s elektroforetickým pufrem 1x TBE, kde bude probíhat elektroforéza a hřeben se vyjme z gelu.
- Ke každému vzorku se přidá 2,5 µl nanášecího pufriu 5x TD.
- Do jamek v gelu se nanese 12,5 µl vzorku, 12,5 µl slepého vzorku (blank) a 5 µl standardu.
- Vana se uzavře víkem a proběhne elektroforéza při 130 V po dobu 30 minut.

3.3.4 Vyhodnocení výsledků elektroforézy

Po provedení elektroforézy se gel přenesse do zobrazovacího systému MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems), který slouží k analýze výsledků. Zařízení tvoří uzavíratelná komora, do které se vkládá gel a která chrání obsluhu před UV-zářením. Obraz, který se vytvoří fluorescencí molekul nukleové kyseliny v gelu, je

snímán fotoaparátem a automaticky přenesen do počítače s nainstalovaným programem pro analýzu výsledků elektroforézy. Zde se výsledky zdokumentují, uloží a vyhodnotí, popřípadě vytisknou. Absorbance proužků byly kvantifikovány na denzitometru CAMAG Scanner II.

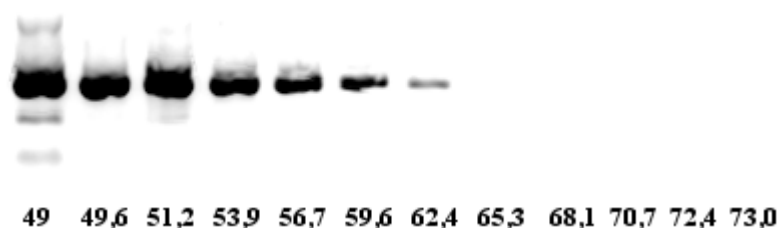
4 Výsledky

4.1 Vyhodnocení výsledků semikvantitativní RT-PCR

4.1.1 Určení teploty annealingu T_a : výsledky gradientové RT-PCR

I když lze teplotu T_m určit pomocí programu Primer 3 a uvádí ji i dodavatel primerů firma KR D, je vhodné určit teplotu annealingu T_a a optimalizovat ji na termocykleru, kde se vyšetření provádí. Obrázek 6 uvádí výsledky gradientové RT-PCR s vyznačenými teplotami vyhřívání ploténky termocykleru. Výsledná hodnota byla extrapolována mezi hodnotami 59,6 a 62,4 °C, tj. 61,0 °C.

Obrázek 6. Gradientová PCR

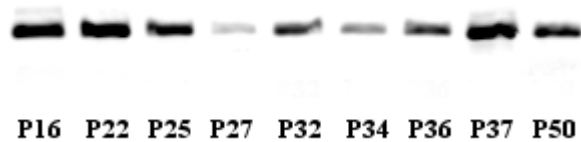


Teploty jsou uváděné v °C.

4.1.2 Výsledky exprese vinkulinu

Optimalizovanou semikvantitativní metodu RT-PCR jsem využila ke stanovení relativní exprese genu *VCL* u 9 pacientů s nádorem prostaty nebo BHP. Hodnoty relativní exprese genu lze použít při srovnání genové exprese mezi různými vzorky nebo pacienty (Obrázek 7).

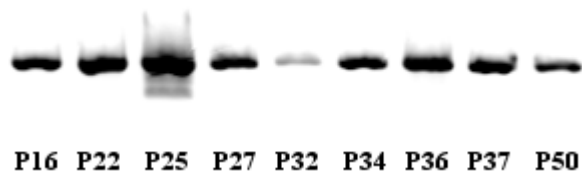
Obrázek 7. Expresse genu vinkulin



Pod jednotlivými pruhy jsou uvedena čísla vzorků.

4.1.3 Výsledky exprese genu *GAPD*

Obrázek 8. Expresse genu *GAPD*



Pod jednotlivými pruhy jsou uvedena čísla vzorků.

4.1.4 Hodnoty relativní exprese

Pro výpočet relativní exprese vinkulinu byl zvolen provozní (housekeepingový) gen *GAPD* kódující glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (Obrázek 8). Relativní exprese je podílem absorbance exprimovaného vinkulinu a absorbance genu *GAPD* (Tabulka 10). Absorbance byly změřeny denzitometricky a jsou průměrem tří měření u jednoho vzorku.

Tabulka 10. Hodnoty absorpance u vinkulinu a u *GAPD* a vypočítaná relativní exprese pro vinkulin

vzorek č.	absorbance <i>VCL</i>	absorbance <i>GAPD</i>	relativní exprese pro <i>VCL</i>
P 16	0,069	0,063	1,1
P 22	0,075	0,146	0,51
P 25	0,040	0,320	0,13
P 27	0,008	0,056	0,14
P 32	0,031	0,014	2,21
P 34	0,014	0,053	0,26
P 36	0,036	0,136	0,26
P 37	0,102	0,086	1,19
P 50	0,038	0,046	0,83

5 Diskuze

Přesto, že se prostatický specifický antigen považuje za relativně spolehlivý marker nádorového onemocnění prostaty, má svá omezení. Stejně jako vyšetření per rectum. To je také jedním z důvodů k hledání nových markerů v rozsáhlých klinických studiích se zaměřením na identifikaci kandidátních genů, jejichž změny nebo polymorfismy bývají přítomny u pacientů s karcinomem prostaty.

Z provedených studií zabývajících se změnou genové exprese u pacientů s karcinomem prostaty vyplývá, že vinkulin patří mezi slibné kandidátní geny zodpovědné za vznik karcinomu prostaty [Ruiz et al., 2011]. Aby se mohla potvrdit tato hypotéza, bude třeba dalšího intenzivního výzkumu u početné kohorty pacientů, nejlépe u několika stovek vzorků tkáně karcinomu prostaty nebo tkáně benigní hyperplazie prostaty. To bude součástí dalšího aplikovaného klinického výzkumu. Jedním z nutných přístupů a zároveň cílem mojí bakalářské práce bylo navrhnout a optimalizovat metodu RT-PCR a určit, zda je to metoda vhodná k využití v laboratorní praxi. Z této práce tedy nelze jednoznačně určit, zda má stanovení vinkulinu dostatečný prognostický a diagnostický význam.

Lze však konstatovat, že semikvantitativní RT-PCR je vhodnou metodou ke stanovení exprese genů a má své uplatnění v laboratorní praxi. V laboratoři ÚBLG 2. LF UK se podobná metoda používá s úspěchem k testování relativní exprese kandidátních genů [Babjuk et al., 2002].

Nutno však podotknout, že ačkoli jde o metodu poměrně rychlou a snadnou, je to také metoda velice citlivá. Zapotřebí je praktických dovedností laboranta, jelikož stačí nepatrná kontaminace při izolaci nukleové kyseliny ze vzorku nebo při samotné PCR. Izolační kontaminaci je zabráněno především použitím komplexní metody afinitní chromatografie při izolaci mRNA. Kontaminovat lze také mastermix nebo pracovní kit. V případě kontaminace nelze výsledky reprodukovat a musí se určit příčina kontaminace, popřípadě vyměnit komponenty kitu nebo primery.

Většina vzorků vyšetřované tkáně ve vyšetřovaném souboru byla odebrána pacientům s karcinomem prostaty a u dvou pacientů byla diagnostikována benigní hyperplazie prostaty. Z tabulky s výsledky relativní exprese je zřejmé, že u vzorků s BHP (pacient 37 a 50) je relativní exprese genu *VCL* srovnatelná s vzorky tkáně s karcinomem prostaty, což neindikuje, odhlédneme-li od nízkého počtu vyšetřených vzorků, že exprese genu *VCL* je u karcinomu prostaty vyšší než u BHP [Ruiz et al.,

2011]. Kvůli nedostatečnému souboru pacientů je to však statisticky absolutně neprůkazné. Mimoto, Ruiz se spolupracovníky sledoval genovou expresi a amplifikaci genu (*VCL*) u pokročilých nádorů, zatímco náš soubor představuje primární odběry solidního nádoru pacientů při jejich diagnostice. Prováděné studie jsou však omezené tím, že dosud nebyl popsán mechanismus, kterým by vinkulin vykonával tyto funkce [Ruiz et al., 2011].

V další klinické studii by se exprese vinkulinu stanovovala souběžně s více geny, u kterých byla prokázána souvislost mezi zvýšenou expresí a karcinomem prostaty, např. s geny *SHB* a *OCT3/4*.

ZÁVĚR

V bakalářské práci se mi podařilo splnit zadané cíle. Vypracovala jsem rešerši o karcinomu prostaty, vinkulinu a PCR. Pomocí počítačového programu jsem navrhla primery pro RT-PCR. Také jsem optimalizovala metodu pro odhad genové exprese genu kódujícího vinkulin pomocí semikvantitativní RT-PCR. Pomocí gradientové RT-PCR jsem určila teplotu annealingu primerů VCL2. Stanovila jsem relativní genovou expresi genu *VCL* u devíti pacientů s nádorem prostaty nebo benigní hyperplazií prostaty. Metoda bude dále používána v laboratoři ÚBLG 2. LF UK v klinických studiích.

REFERENČNÍ SEZNAM

- AGARI, Y.; KASHIHARA, A.; YOKOYAMA, S.; KURAMITSU, S.; SHINKAI, A. Global gene expression mediated by *Thermus thermophilus* SdrP, a CRP/FNR family transcriptional regulator. *Mol Microbiol.* 2008, 70(1): 60-75. ISSN 1365-2958.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Espero Publishing, 2005, 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- AUS, G.; ABOU, C. C.; BOLLA, M.; HEIDENREICH, A.; VAN POPPEL, H.; SCHMID, H. P.; WOLFF, J. M.; ZATTONI, F. Guidelines EAU pro karcinom prostaty. *Urol List.* 2006, 4(4): 89-150. ISSN 1214-2085.
- BABJUK, M.; SOUKUP, V.; MARES, J.; DUSKOVA, J.; SEDLACEK, Z.; TRKOVA, M.; PECEN, L.; DVORACEK, J.; HANUS, T.; KOCVARA, R.; NOVAK, J.; POVYSIL, C. The expression of PAX5, p53 immunohistochemistry and p53 mutation analysis in superficial bladder carcinoma tissue. Correlation with pathological findings and clinical outcome. *Int Urol Nephrol.* 2002-2003, 34(4): 495-501. ISSN 0301-1623.
- BAKOLITSA, C.; COHEN, D. M.; BANKSTON, L. A.; BOBKOV, A. A.; CADWELL, G. W.; JENNINGS, L.; CRITCHLEY, D. R.; CRAIG, S. W.; LIDDINGTON, R. C. Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature.* 2004, 430(6999): 583-586. ISSN 1476-4687.
- BASTIAN, P. J.; ELLINGER, J.; SCHMIDT, D.; WERNERT, N.; WELLMANN, A.; MÜLLER, S. C.; VON RÜCKER, A. GSTP1 hypermethylation as a molecular marker in the diagnosis of prostatic cancer: is there a correlation with clinical stage, Gleason grade, PSA value or age? *Eur J Med Res.* 2004, 9(11): 523-527. ISSN 0949-2321.
- BELEJ, K. Transrektální sonografie v diagnostice onemocnění prostaty. *Urolog. pro Praxi.* 2009, 10(1): 7-10. ISSN 1803-5299.
- BELEJ, K.; KAPLAN, O. Hormonální regulace a možnosti jejího ovlivnění v léčbě karcinomu prostaty. *Urolog. pro Praxi.* 2008, 9(1): 10-15. ISSN 1213-1768.
- BORGONO, C. A.; MICHAEL, I. P.; DIAMANDIS, E. P. Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res.* 2004, 2(5): 257-280. ISSN 1541-7786.

- BUSTIN, S. A. Developments in real-time PCR research and molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010, 10(6): 713–715. ISSN 1744-8352.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR-- a perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005, 34(3): 597-601. ISSN 0952-5041.
- CARISEY, A.; BALLESTREM, C. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur J Cell Biol.* 2011, 90(2-3): 157-163. ISSN 1618-1298.
- CARRACEDO, A.; ALIMONTI, A.; PANDOLFI, P. P. PTEN level in tumor suppression: how much is too little? *Cancer Res.* 2011, 71(3): 629-633. ISSN 1538-7445.
- CASTRO, E.; EELES, R. The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. *Asian J Androl.* 2012, 14(3): 409-414. ISSN 1745-7262.
- ČERMÁK, A.; PACÍK, D. Transrektální ultrazvukem vedené biopsie prostaty. *Urol List.* 2007, 5(4): 22-29. ISSN 1214-2085.
- DELONGCHAMPS, N. B.; SINGH, A.; HAAS, G. P. The role of prevalence in the diagnosis of prostate cancer. *Cancer Control.* 2006, 13(3): 158-168. ISSN 1073-2748.
- DVOŘÁČEK, J.; BABJUK, M. *Onkourologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 589 s. ISBN 80-7262-349-4.
- GHOSH, A.; HESTON, W. D. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2004, 91(3): 528-539. ISSN 0730-2312.
- GIOVANNUCCI, E.; LIU, Y.; PLATZ, E. A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer.* 2007, 121(7): 1571-1578. ISSN 0020-7136.
- GOTTLIEB, B.; BEITEL, L. K.; WU, J. H.; TRIFIRO, M. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat.* 2004, 23(6): 527-533. ISSN 1098-1004.
- GREENE, K. L.; ALBERTSEN, P. C.; BABAIAN, R. J.; CARTER, H. B.; GANN, P. H.; HAN, M.; KUBAN, D. A.; SARTOR, A. O.; STANFORD, J. L.; ZIETMAN, A.; CARROLL, P. Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *J Urol.* 2009, 182(5): 2232-2241. ISSN 1527-3792.

- JANSSEN, M. E.; KIM, E.; LIU, H.; FUJIMOTO, L. M.; BOBKOV, A.; VOLKMANN, N.; HANEIN, D. Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments. *Mol Cell*. 2006, 21(2): 271-281. ISSN 1097-2765.
- KOČÁREK, E. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia, 2008, 211 s. ISBN 978-80-86960-36-4.
- KRÁL, M.; ROSINSKA, V.; STUDENT, V.; GREPL, M.; HRABEC, M.; BOUCHAL, J. Genetic determinants of prostate cancer: a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011, 155(1): 3–9. ISSN 1213-8118.
- KRÁL, M.; ŠTUDENT, V.; KURFŮRSTOVÁ, D.; VIDLÁŘ, A.; KUČEROVÁ, L. Gleasonovo skóre v biopsii a po radikální prostatektomii- změny po konferenci ISUP 2005 a význam pro urologa. *Urolog. pro Praxi*. 2007, 8(4): 173-178. ISSN 1803-5299.
- KRÁL, M.; VYHNÁNKOVÁ, V.; ŠTUDENT, V.; BOUCHAL, J. Genetické riziko karcinomu prostaty. *Ces Urol*. 2010, 14(3): 139-147. ISSN 1211-8729.
- LUKEŠ, M.; ZÁLESKÝ, M.; ZACHOVAL, R.; URBAN, M.; HERÁČEK, J. Prostatický specifický antigen a karcinom prostaty. *Klinická onkologie*. 2001, 14(4): 114-119. ISSN 1802-5307.
- MCPHERSON, M. J.; MOLLER, S. G. *PCR*. 1st pub. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000, 276 p. ISBN 1-85996-017-0.
- MEYER, M. S.; PENNEY, K. L.; STARK, J. R.; SCHUMACHER, F. R.; SESSO, H. D.; LODA, M.; FIORENTINO, M.; FINN, S.; FLAVIN, R. J.; KURTH, T.; PRICE A. L.; GIOVANNUCCI, E. L.; FALL, K.; STAMPFER, M. J.; MA, J.; MUCCI, L. A. Genetic variation in RNASEL associated with prostate cancer risk and progression. *Carcinogenesis*. 2010, 31(9): 1597-1603. ISSN 1460-2180.
- MIERKE, C. T. The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells. *Cell Biochem Biophys*. 2009, 53(3): 115-126. ISSN 1559-0283.
- MIYAZAKI, Y.; GARCIA, E. L.; KING, S. R.; IYALLA, K.; LOELIGER, K.; STARCK, P.; SYED, S.; TELESNITSKY, A.; SUMMERS, M. F. An RNA structural switch regulates diploid genome packaging by Moloney murine leukemia virus. *J Mol Biol*. 2010, 396(1): 141-152. ISSN 1089-8638.
- NAŇKA, O.; ELIŠKOVÁ, M. *Přehled anatomie*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009, 416 s. ISBN 978-80-7262-612-0.

- PRITCHARD, D. J.; KORF, B. R. *Základy lékařské genetiky*. 1. české vyd. Praha: Galén, 2007, 182 s. ISBN 978-80-7262-449-2.
- RUIZ, C.; HOLZ, D. R.; OEGGERLI, M.; SCHNEIDER, S.; GONZALES, I. M.; KIEFER, J. M.; ZELLWEGER, T.; BACHMANN, A.; KOIVISTO, P. A.; HELIN, H. J.; MOUSSES, S.; BARRETT, M. T.; AZORSA, D. O.; BUBENDORF, L. Amplification and overexpression of vinculin are associated with increased tumour cell proliferation and progression in advanced prostate cancer. *J Pathol*. 2011, 223(4): 543-552. ISSN 1096-9896.
- SHORE, N.; MASON, M.; DE REIJKER, T. M. New developments in castrate-resistant prostate cancer. *BJU Int*. 2012, 109(6): 22-32. ISSN 1464-4096.
- SCHMIDT, M.; JAROLÍM, L.; KAWACIUK, I.; VESELÝ, Š.; CHOCHOLATÝ, M. Role výživy při vzniku a průběhu onemocnění karcinomem prostaty. *Urolog. pro Praxi*. 2007, 8(4): 143-145. ISSN 1803-5299.
- SCHMIDT, M.; JAROLÍM, L.; SOUKUP, J.; MAREŠ, J. Molekulární vlastnosti klinicky signifikantního karcinomu prostaty. *Ces Urol*. 2010, 14(3): 129-138. ISSN 1211-8729.
- STRACHAN, T.; READ, A. P. *Human molecular genetics 3*. 3rd ed. New York: Garland Press, 2004, 674 p. ISBN 08-153-4183-0.
- ŠMARDA, J.; DOŠKAŘ, J.; PANTUČEK, R.; RŮŽIČKOVÁ, V.; KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- ŠTERN, P.; VRANOVSKÝ, K.; ŠAFARČÍK, K. Karcinom prostaty-molekulární podstata, diagnostika a ekonomika prevence. *Klin. Biochem. Metab*. 2008, 16(37): 19-26. ISSN 1210-7921.
- VASILE, V. C.; WILL, M. L.; OMMEN, S. R.; EDWARDS, W. D.; OLSON, T. M.; ACKERMAN, M. J. Identification of a metavinculin missense mutation, R975W, associated with both hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab*. 2006, 87(2): 169-174. ISSN 1096-7192.
- XU, J.; SUN, J.; ZHENG, S. L. Prostate cancer risk-associated genetic markers and their potential clinical utility. *Asian J Androl*. 2013, 15(2): stránkování neuvedeno. ISSN 1745-7262.
- YANG, H. J.; CHEN, J. Z.; ZHANG, W. L.; DING, Y. Q. Focal adhesion plaque associated cytoskeletons are involved in the invasion and metastasis of human colorectal carcinoma. *Cancer Invest*. 2010, 28(2): 127-134. ISSN 1532-4192.

- ZEMPLJIC-HARPF, A.; MANSO, A. M.; ROSS, R. S. Vinculin and talin: focus on the myocardium. *J Investig Med.* 2009, 57(8): 849-855. ISSN 1708-8267.
- ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika*. 2. vyd. Praha: Galén, 2007, 906 s. ISBN 978-802-4614-236.

Internetové zdroje:

- HES, O.; MICHAL, M. 2012. Nádory prostaty. [online] [cit. 20. 3. 2013]. <<http://www.prostata.nadory.cz>>
- GENERI BIOTECH. Compounds and services for molecular biology. 2013. [online] [cit. 8. 4. 2013]. <<http://www.generi-biotech.com>>