



Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce

**Molekulární biomarkery solidních nádorů a jejich
využití v prognóze a prevenci nádorových onemocnění**

Mgr. Kateřina Elsnerová

Praha, 2020

OBSAH

Souhrn	4
Summary	5
1. Úvod	6
1.1. Epidemiologie, dignostika a terapie zhoubných nádorů	6
1.1.1. Zhoubné nádory vaječníků	6
1.1.2. Zhoubné nádory prsu.....	8
1.2. Prevence nádorových onemocnění	9
1.3. Molekulární nádorové markery	10
1.3.1. Transport v nádorových buňkách.....	11
1.3.2. Metabolismus léčiv v nádorových buňkách.....	12
1.3.3. Proliferace a regulace buněčného cyklu.....	12
1.3.4. Regulační mechanismy	13
2. Hypotézy a cíle práce	14
3. Materiál a metody	15
3.1. Vzorky tkání pacientek a buněčné linie.....	15
3.2. Zpracování a analýza vzorků tkání.....	16
3.2.1. Práce s RNA a analýza genové exprese	16
3.2.2. Práce s proteinem a analýza proteinové exprese.....	17
3.2.3. Práce s DNA a analýza metylace DNA.....	18
3.3. Zpracování a analýza vzorků krve.....	19
3.3.1. Stanovení jednonukleotidových polymorfizmů	19
3.3.2. Sekvenování nové generace	19

3.4. Práce s buněčnými liniemi.....	20
3.4.1. Stanovení cytotoxicity paklitaxelu a karboplatiny.....	20
3.4.2. Inhibice exprese kandidátního genu <i>PRC1</i> pomocí siRNA.....	20
4. Výsledky.....	21
4.1. Studie zabývající se karcinomem ovarií.....	21
4.1.1. Pilotní a validační studie zabývající se EOC	22
4.1.2. Exprese proteinů <i>ABCA2</i> a <i>PRC1</i> v EOC	22
4.1.3. Metylace promotorové oblasti genu <i>ABCB1</i> v EOC.....	23
4.1.4. SNP genů <i>ABCA2</i> a <i>PRC1</i> v EOC	23
4.1.5. Studium intraperitoneálních metastáz EOC	23
4.1.6. Práce s buněčnými liniemi karcinomu vaječníků	24
4.2. Studie zabývající se nádory prsu	24
4.2.1. Genetická variabilita genů <i>ABCC8</i> a <i>ABCD2</i> stanovená pomocí NGS	25
5. Diskuze.....	25
6. Závěry.....	30
7. Použitá literatura	33
8. Seznam publikací	39

SOUHRN

Zhoubné nádory vaječníků a prsu patří mezi nejrozšířenější nádorová onemocnění v ženské populaci. Významný nástroj pro časnou detekci nádorů, ale také pro sledování prognózy a prevenci progresu, představují molekulární biomarkery, jejichž studium bylo náplní předkládané práce.

Cílem práce bylo zjistit, (i) zda mezi nádorovou a nenádorovou tkání, respektive mezi kontrolami (K), primárními nádory (pT) a intraperitoneálními metastázami (iM) existují rozdíly v genové expresi; (ii) zda genová exprese, respektive výskyt genetických variant souvisí s klinickými daty pacientek, a mají tak potenciální prognostický význam.

V případě ovariálního karcinomu byla exprese řady genů v porovnání K - pT, stejně jako pT – iM významně změněna. Geny *ABCA7*, *ABCB2*, *ABCC3*, *ESR2*, *NH1H4* a *NR1H1* byly deregulovány jak v porovnání pT – iM, tak K – pT - iM. S klinickými daty pacientek významně asociovala genová exprese (*ABCA2/9/10/12*, *ABCB1*, *ABCC9*, *ABCG2*, *PLK1*, *PRC1*, *SLC16A14*) i výskyt některých polymorfismů v genech *ABCA2* a *PRC1*. Promotor genu *ABCB1* byl v nádorech hypermetylován a stupeň metylace souvisel s přechodí aplikací chemoterapie. Dále byla zavedena kultivace tří buněčných linií karcinomu ovarií a metodika stanovení cytotoxicity chemoterapeutik a inhibice kandidátního genu *PRC1* pomocí siRNA.

V krvi pacientek s nádory prsu byla metodou sekvenování nové generace analyzována zárodečná genetická variabilita genů *ABCC8* a *ABCD2*. Bylo objeveno 41, respektive 72 variant, 72 % z nich bylo nových. U šesti z nich byl predikován škodlivý vliv nebo vliv na vazbu transkripčních faktorů.

Významným přínosem práce je analýza celé rodiny ABC transportérů v tkáni ovariálního karcinomu a porovnání genové exprese ve tkáních K – pT - iM. Výsledky ukazují geny potenciálně významné pro prognózu pacientek s nádory vaječníků a prsu. Možnosti jejich využití v prevenci progresu a selhání terapie nádorových onemocnění budou předmětem dalších studií.

SUMMARY

Malignant tumors of ovary and breast are among the most widespread cancers in women. An important tool for early cancer detection, as well as for monitoring prognosis and preventing progression, are molecular biomarkers; biomarkers were the topic of this work.

The aim of this work was to find out (i) whether there are differences in gene expression between tumor and non-tumor tissues, and among controls (C), primary tumors (pT) and intraperitoneal metastases (iM), respectively; (ii) whether gene expression or genetic variants associate with clinical data of patients, thus being potentially relevant for prognosis.

In epithelial ovarian cancer (EOC), gene expression in comparison of either C – pT, or pT – iM was deregulated. Gene expression of *ABCA7*, *ABCB2*, *ABCC3*, *ESR2*, *NH1H4* and *NR1H1* was deregulated either in comparison of pT – iM, or C – pT – iM. Associations between clinical data and gene expression (*ABCA2/9/10/12*, *ABCB1*, *ABCC9*, *ABCG2*, *PLK1*, *PRC1* and *SLC16A14*), or presence of some polymorphisms in *ABCA2* and *PRC1* genes were found. *ABCB1* promotor was hypermethylated in tumors; methylation status was related to neoadjuvant chemotherapy application. Next, cultivation of three EOC cell lines, as well as methods for cytotoxicity measurement and for siRNA-mediated *PRC1* gene expression silencing were adopted.

In breast cancer, germline mutations in *ABCC8* and *ABCD2* genes were analyzed by next generation sequencing. Forty-one and 72 variants were discovered, respectively; 72 % were new. Six variants were predicted to be potentially harmful or to influence binding of transcription factors.

The greatest importance of this work is the analysis of the whole ABC transporter family in EOC tissues, and comparison of gene expression levels in C – pT – iM. The results highlight genes that are important for ovarian and breast cancer patients prognosis. The possibilities of their use in preventing progression and therapy failure will be subject to future studies.

1. ÚVOD

1.1. EPIDEMIOLOGIE, DIGNOSTIKA A TERAPIE ZHOUBNÝCH NÁDORŮ

Z hlediska incidence představují nádorová onemocnění celosvětově významný epidemiologický problém. Počet nových případů za rok má, stejně jako počet úmrtí spojených s nádorovými onemocněními, dlouhodobě stoupající tendenci (Bray F. *et al.*, 2012; Ferlay J. *et al.*, 2010; Ferlay J. *et al.*, 2015). U mužů vykazují celosvětově nejvyšší incidenci nádory plic, u žen jsou však na prvním místě nádory prsu. Spolu s nimi patří mezi celosvětově nejrozšířenější nádorová onemocnění také gynekologické zhoubné nádory (karcinom děložního hrdla, těla dělohy a vaječnicků; Ferlay J. *et al.*, 2015).

1.1.1. Zhoubné nádory vaječnicků

Zhoubné nádory vaječnicků jsou sedmé nejčastější nádorové onemocnění a zároveň osmá nejčastější příčina úmrtí v souvislosti s nádorovými onemocněními v ženské populaci. Incidence nádorů vaječnicků je nejvyšší ve vyspělých zemích, kde má také nejvyšší podíl mortality a incidence mezi všemi gynekologickými nádory (Ferlay J. *et al.*, 2015).

Nádory vaječnicků nevykazují specifické symptomy a doposud nebyla vyvinuta spolehlivá screeningová metoda pro včasný záchyt. Základními vyšetřovacími metodami při podezření na nádor jsou skiagram hrudníku a ultrazvuk, nedílnou součástí vyšetření je také stanovení sérového markeru CA-125 (z angl. cancer antigen 125). Následuje určení klinického stádia onemocnění; je stanoven rozsah onemocnění, tj. stage (I – IV) a TNM kategorie (velikost primárního nádoru, rozsah postižení lymfatických uzlin, přítomnost vzdálených metastáz), kromě toho je stanoven také grade nádoru (1 – 3), který odpovídá stupni diferenciaci nádorových buněk, a histologický typ (Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009).

Osmdesát až 90 % zhoubných nádorů ovarii tvoří karcinomy (EOC, z angl. epithelial ovarian cancer); v předkládané práci proto byly předmětem studia. EOC se dále dělí na nádory serózní, mucinózní, endometroidní, světlobuněčné, nediferencované a další, které se liší svými histologickými charakteristikami, rizikovými faktory i prognózou (Cibula D. *et* Petruželka L., 2009). Nejčastějším typem je pak tzv. high-grade serózní karcinom (HGSC, serózní karcinom se stupněm diference nádorových buněk 2/3), který tvoří přibližně 70 % ze všech případů EOC (Prat J., 2012).

Léčebný postup je u nádorů vaječníků volen podle rozsahu onemocnění. Je-li nádor operabilní, primární léčbou je chirurgické odstranění nádoru, které je ve většině případů následováno chemoterapií (nejčastěji je podána karboplatina v kombinaci s paklitaxelem). U vyšších stádií je nejprve indikována neoadjuvantní chemoterapie následovaná operací, další postup je volen podle úspěšnosti primární terapie a stavu pacientky (www.onkogyneekologie.com). Jestliže do šesti měsíců od ukončení primární chemoterapie dojde k progresi nebo návratu onemocnění, nádor je hodnocen jako chemorezistentní, v opačném případě jako chemosenzitivní (Jayson G.C. *et al.*, 2014).

Nádory vaječníků jsou ve více než 60 % případů diagnostikovány v pokročilých stádiích, kdy jsou již přítomny metastázy (Cibula D. *et* Petruželka L., 2009). Nádorové buňky se mohou šířit pasivním intraperitoneálním rozsevem, krevním řečištěm nebo mízními uzlinami (Nakayama K. *et al.*, 2012). Pro pasivní i hematogenní rozsev je klíčový proces epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT; Yeung T.L. *et al.*, 2015), při němž dochází ke změně genetického profilu nádorových buněk. Buňky primárního nádoru a metastáz se přitom od sebe liší expresí markerů EMT (Nakayama K. *et al.*, 2012). Rozvoj metastáz je příčinou 90 % úmrtí spojených s nádorovými onemocněními (Chaffer C.L. *et* Weinberg R.A., 2011). Pochopení mechanismu vzniku a šíření metastáz je proto klíčové pro

zlepšení výsledků terapie pacientek se zhoubnými nádory vaječníků (Yeung T.L. *et al.*, 2015).

1.1.2. Zhoubné nádory prsu

Zhoubné nádory prsu jsou celosvětově nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním a také nejčastější příčinou úmrtí spojených s nádorovými onemocněními v ženské populaci. Celosvětově i v České republice má incidence dlouhodobě stoupající tendenci, úmrtnost však mírně klesá. Významný vliv na snižování úmrtnosti mají preventivní mamografická vyšetření (Ferlay J. *et al.*, 2015; Skovajsová M. *et al.*, 2014).

Při podezření na nádor je provedena biopsie (Strnad P. *et Daneš J.*, 2001), dále je v diagnostice nádorů prsu využíváno také stanovení sérových markerů, zejména proteinů CA 15-3 (z angl. cancer antigen 15-3) a CEA (z angl. carcinoembryonic antigen), z nichž je CA 15-3 citlivější (Guadagni F. *et al.*, 2001).

Zhoubné nádory prsu se dělí na neinvazivní (*in situ* karcinomy) a invazivní, které jsou dále rozlišovány na nádory duktální a lobulární, kromě toho však existuje i řada méně častých typů. Nejčastějším typem zhoubných nádorů prsu je invazivní duktální nádor (Strnad P. *et Daneš J.*, 2001). Kromě typu tkáně, ze které nádor vznikl, je pro klasifikaci karcinomu prsu důležitý také genetický profil nádorových buněk. Významné jsou zejména rozdíly v expresi estrogenového (ER) a progesteronového (PR) receptoru, receptoru HER2 a proliferačního markeru Ki67 (je kódován genem *MKI67*). Liší se také v odpovědi na protinádorovou terapii, a je proto nutné je léčit jako různá onemocnění (Perou C.M. *et al.*, 2000; Sørlie T. *et al.*, 2001).

Standardem pro léčbu karcinomu prsu je chirurgické odstranění nádoru, přičemž radikalita operace závisí na stádiu onemocnění (Kummerow K.L. *et al.*, 2015). Na rozdíl od jiných nádorů se mohou buňky karcinomu prsu šířit a vytvářet časně metastázy již v preinvazivních stádiích (Hüsemann Y. *et al.*,

2008). Po operaci proto často následuje radioterapie, chemoterapie nebo hormonální terapie, jejímž cílem je eliminovat nádorové buňky, které není možné odstranit operací (Coates A.S. *et al.*, 2015).

Časem může i u původně operabilního nádoru dojít k relapsu a vzniku metastatického onemocnění. Pacientkám pak může být podána hormonální terapie i chemoterapie, v některých případech je aplikována cílená biologická léčba nebo radioterapie (Cassidy J. *et al.*, 2010).

1.2. PREVENCE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Prevence je nejdůležitějším způsobem boje s nemocí, je nedílnou součástí lékařské péče o pacienty (Fait T. *et al.*, 2011). Prevence v onkologii zahrnuje identifikaci rizikových faktorů, jejím cílem je ale také diagnostika časných stádií, předcházení relapsu a omezení negativních následků protinádorové terapie (Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009). Obvykle jsou rozlišovány čtyři úrovně prevence: primární, sekundární, terciární a kvartérní.

Cílem primární prevence je zabránění vzniku onemocnění a tedy snížení jeho incidence. Vzhledem k tomu, že u většiny nádorů není známá specifická příčina vzniku, v primární prevenci onkologických onemocnění platí obecná doporučení týkající se životního prostředí a životního stylu (abstinence kouření, správné stravovací návyky, pravidelná pohybová aktivita, ochrana před expozicí karcinogenům, aj.; Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009; Fait T. *et al.*, 2011). Výjimečné postavení mezi onkologickými nemocemi mají nádory děložního hrdla, u nichž je možností primární prevence očkování (Lowy D.R., 2016). Specifická primární prevence je možná také u pacientek s mutacemi v genech *BRCA1/2* (z angl. breast cancer 1, resp. 2), jimž je preventivně indikována ovariectomie nebo mastektomie (Metcalf K.A. *et al.*, 2005; Metcalfe K. *et al.*, 2014).

Sekundární prevence se týká záchytu nádorů ve stádiu prekanceróz, případně v časných stádiích invazivního nádoru; jejím cílem je tedy omezení rozvoje onemocnění a snížení úmrtnosti. Důležitými nástroji sekundární prevence jsou sledování varovných příznaků (např. hmatné bulky, změny ve vylučování moči nebo stolice, neobvyklá bolest) a screening (Cibula D. *et* Petruželka L., 2009; Fait T. *et al.*, 2011). U nádorů vaječníků zatím bohužel žádná metoda pro časnou detekci neexistuje, avšak u nádorů prsu, děložního hrdla a kolorekta již byl screeningový program úspěšně zaveden (Dušková J. *et al.*, 2014; Seifert B. *et al.*, 2014; Skovajsová M. *et al.*, 2014; Suchánek Š. *et al.*, 2014).

Terciární a kvartérní prevence zahrnuje péči o pacienty, u nichž již byla diagnostikována nemoc. Terciární prevence se zabývá sledováním pacientů s cílem včasného záchytu relapsu nebo progresu onemocnění. Jejím klíčovým krokem je péče o pacienty ve specializovaných onkologických centrech a ukazatelem její úspěšnosti je délka celkového přežití pacientů. Kvartérní prevence se týká obrany pacientů proti nesprávnému užívání léků nebo proti nežádoucím invazivním zákrokům, snaží se zvyšovat celkovou kvalitu života (Cibula D. *et* Petruželka L., 2009; Fait T. *et al.*, 2011).

V terciární a kvartérní prevenci nádorových onemocnění hrají důležitou roli biomarkery, které mohou sloužit pro stanovení prognózy, pro určení vhodného terapeutického režimu, ale také pro detekci relapsu nebo sledování účinnosti léčby (Duffy M.J. *et al.*, 2015). Takovéto markery jsou předmětem výzkumu a jejich studium je i náplní předkládané práce.

1.3. MOLEKULÁRNÍ NÁDOROVÉ MARKERY

V současné době se v onkogynekologii uplatňuje snaha o personalizaci léčebných postupů, s čímž souvisí zavedení užívání biologických markerů (biomarkerů, molekulárních markerů) do klinické praxe. Biomarkery mají

význam pro stanovení či zpřesnění diagnózy (diagnostické markery), pro určení prognózy a vhodného terapeutického režimu i pro hodnocení průběhu terapie (prognostické a prediktivní markery; Duffy M.J. *et al.*, 2015). Faktory, které souvisejí s agresivitou či rezistencí nádorových buněk vůči chemoterapeutikům, jsou navíc využitelné nejen jako prognostické markery, ale také jako potenciální terapeutické cíle.

Výzkum nových potenciálních biomarkerů se zaměřuje na procesy, které jsou pro nádorové buňky klíčové, které jim umožňují přežít a šířit se. Jedná se především o funkce související s transportem endogenních látek, s metabolismem protinádorových léčiv, s proliferací a regulací buněčného cyklu a s dalšími ději. Jednotlivé procesy, resp. významné geny a proteiny, kterými se zabývala tato práce, jsou popsány v následujících kapitolách.

1.3.1. Transport v nádorových buňkách

Buněčný transport zajišťuje příjem živin a eliminaci odpadních nebo toxických látek (Wilkens S., 2015), významnou roli hraje také v buněčné signalizaci (Palmgren M.G. *et Nissen P.*, 2011). V případě nádorových buněk a protinádorové terapie je významně studován především transport léčiv, který je často spojován s lékovou rezistencí, resp. se selháním terapie.

Léková rezistence může být způsobena sníženým příjmem nebo naopak zvýšenou eliminací léčiva z buňky, může však souviset i s dalšími buněčnými procesy (aktivace detoxikačních enzymů, aktivace opravy DNA, inhibice apoptózy). V souvislosti se sníženým příjmem jsou studovány SLC (z angl. solute carrier) transportéry (Januchowski R. *et al.*, 2014; Kalayda G.V. *et al.*, 2012), zvýšený eflux může být zprostředkován ATP-dependentními transportéry z rodiny ABC (z angl. ATP-binding cassette; Auner V. *et al.*, 2010; Gottesman M.M. *et al.*, 2002) nebo ATPázami typu P (Moreno-Smith M. *et al.*, 2013; Samimi G. *et al.*, 2004).

1.3.2. Metabolismus léčiv v nádorových buňkách

Chemoterapeutika jsou součástí standardní léčby u většiny nádorových onemocnění. Po vstupu do buněk dochází k interakci léčiva a jeho metabolitů s řadou buněčných mechanismů. Na metabolismu léčiv se mj. podílejí enzymy z rodiny cytochromu P450, superoxid dismutázy (SOD), glutaredoxin nebo glutathion peroxidáza, které tak mají vliv na výsledek terapie a jsou proto předmětem řady studií (Bergmann T.K. *et al.*, 2011; Hu Y. *et al.*, 2005; Nakajima M. *et al.*, 2005; Schwartz D.R. *et al.*, 2002).

1.3.3. Proliferace a regulace buněčného cyklu

Proliferace je spolu s buněčnou smrtí a diferenciací klíčová pro udržení homeostázy ve tkáních. Deregulace těchto procesů, způsobená mutacemi nebo změnou v expresi regulačních faktorů, však může vést k nádorovému bujení (Wiman K.G. *et Zhivotovsky B.*, 2017). Faktory, které v těchto procesech hrají klíčovou roli, tak mohou sloužit jako terapeutické cíle (Diaz-Moralli S. *et al.*, 2013). Mezi proteiny, které se významně podílejí na regulaci buněčného cyklu a které jsou zároveň potencionálními cíly protinádorové terapie, patří p53 (kódován genem *TP53*), PLK1 (z angl. polo-like kinase 1), Ki67 nebo PRC1 (z angl. protein regulator of cytokinesis 1; Ehrlichova M. *et al.*, 2013; Kamal C.K. *et al.*, 2012; Zhang R. *et al.*, 2015).

Striktně regulován a kontrolován je také samotný proces replikace. Jedním z mechanismů, které se při opravách chyb vzniklých při replikaci, ale také při poškození DNA, uplatňují, je tzv. MMR (z angl. mismatch repair) dráha. Základními prvky této dráhy jsou proteiny MSH2 a MSH6, resp. MLH1 a PMS2 (Kunkel T.A. *et Erie D.A.*, 2015). Zatímco u EOC je úloha MMR genů v karcinogenezi předmětem studií (Xiao X. *et al.*, 2014; Song H. *et al.*, 2006), u hereditárního typu kolorektálního karcinomu již byl jejich vliv potvrzen (Martin S.A. *et al.*, 2010).

1.3.4. Regulační mechanismy

Genová, resp. proteinová exprese jednotlivých faktorů, které se uplatňují při různých buněčných procesech, je regulována řadou mechanismů. Patří mezi ně např. působení transkripčních faktorů nebo exprese buněčných receptorů. Jak již bylo zmíněno, velký význam hrají hormonální receptory (ER, PR) a receptor HER2 u karcinomu prsu (Perou C.M. *et al.*, 2000), u EOC je HER2 nezávislým markerem bezpříznakového i celkového přežití pacientek (Camilleri-Broët S. *et al.*, 2004). Atraktivní potenciální cíle protinádorové terapie představují také jaderné receptory FXR (z angl. farnesoid X-activated receptor, kódován genem *NR1H4*) nebo VDR (z angl. vitamin D receptor, kódován genem *NR1H3*; Herraez E. *et al.*, 2012; Zhang X. *et al.*, 2006).

Jedním z klíčových epigenetických mechanismů řízení genové exprese je metylace CpG dinukleotidů v DNA; pozornost se soustředí především na metylaci promotorových oblastí (Jones P.A., 2012). Důsledkem metylace je inhibice transkripce (Robertson K.D., 2005). Aberantní metylace však může vést k deregulaci genové exprese a ke vzniku řady onemocnění včetně zhoubných nádorů (Jones P.A., 2012; Robertson K.D., 2005).

Díky pokrokům v medicíně úmrtnost pacientek trpících zhoubnými nádory vaječníků a prsu v posledních letech klesá, tato onemocnění však stále představují významné zdravotní riziko. V případě EOC je potřeba zaměřit se na diagnostiku časných stádií, tedy sekundární úroveň prevence. V případě obou studovaných typů nádorů je pak významná také terciární a kvartérní prevence. Zde mohou hrát významnou roli molekulární biomarkery, které nacházejí uplatnění jak v prevenci relapsu a progresu onemocnění, tak při stanovení vhodného terapeutického režimu. Jejich výzkum je proto stále aktuální a významný a byl předmětem předkládané práce.

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Hlavní hypotézou, vycházející z literatury a také z výsledků dlouhodobého výzkumu probíhajícího na Oddělení toxikogenomiky SZÚ, byl předpoklad, že

- i) na molekulární úrovni existují rozdíly mezi nádory a nenádorovou tkání,
- ii) tyto rozdíly souvisí s klinickými charakteristikami nádoru a mohou tak sloužit jako biomarkery potenciálně využitelné v prevenci relapsu či progresu onemocnění, v prevenci nesprávného využívání léčiv nebo v prognóze.

První část práce se zabývala biomarkery ovariálního karcinomu. Pro studii byly vybrány geny související s transportem a metabolismem léčiv, s buněčným cyklem a reparací DNA nebo geny buněčných receptorů, které by mohly souviset se vznikem a rozvojem onemocnění a odpovědí na léčbu.

Nádory vaječníků jsou většinou diagnostikovány ve stádiích, kdy jsou již přítomné metastázy. Porozumění mechanismu jejich vzniku a šíření je tak klíčové pro nastavení i úspěšnost terapie. V literatuře již byly popsány molekulární rozdíly mezi primárním nádorem a metastázami, především v expresi markerů EMT. Hypotézou proto bylo, že by mohly existovat rozdíly také v expresi dalších faktorů.

Důležitou součástí validace potenciálních biomarkerů jsou experimenty na buněčných liniích, které je možné využít jak pro funkční studie, tak také pro stanovení účinnosti léčiv.

Dílčí cíle studie zabývající se ovariálním karcinomem byly následující:

1. Zjistit, zda existují rozdíly v expresi vybraných genů mezi nádorovou a nenádorovou tkání a mezi primárními nádory a metastázami a zda genová exprese souvisí s klinickými daty pacientek.
2. Zjistit, zda existují rozdíly v expresi vybraných kandidátů mezi nádorovou a nenádorovou tkání také na úrovni proteinu, zda je v nádorové tkáni ovlivněna úroveň metylace DNA nebo výskyt jednonukleotidových

polymorfismů (SNP, z angl. single nucleotide polymorphism) v těchto genech a zda tyto změny souvisí s klinickými daty pacientek.

3. Zavést kultivaci buněčných linií karcinomu vaječníků, zavést metodiku hodnocení cytotoxicity protinádorových léčiv a zavést metodiku inhibice genové exprese pomocí siRNA.

Druhá část práce se zabývala nádory prsu. Předmětem studia byly transportéry *ABCC8* a *ABCD2*, u nichž bylo na Oddělení toxikogenomiky SZÚ již dříve ukázáno, že u nádorů prsu hrají významnou roli. Předkládaná práce vycházela z hypotézy, že tyto transportéry mohou obsahovat změny na úrovni genotypu a že tyto změny mohou souviset s prognózou pacientek.

Cílem studie zabávající se nádory prsu bylo:

1. Zavést metodiku sekvenování nové generace (NGS, z angl. next generation sequencing) na vzorcích DNA izolovaných z periferní krve pacientek s nádory prsu.
2. Zjistit, jaké genetické varianty se vyskytují v genech *ABCC8* a *ABCD2* a zda zárodečná genetická variabilita souvisí s klinickými daty pacientek nebo zda mají potenciální funkční význam.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. VZORKY TKÁNÍ PACIENTEK A BUNĚČNÉ LINIE

Ve studii zabývající se karcinomem vaječníků byly použity vzorky krve pacientek s EOC, primárních nádorů, intraperitoneálních metastáz vycházejících z EOC a kontrolních ovariálních tkání. Vzorky byly získány z Gynekologicko-porodnické kliniky Fakultní nemocnice Motol v Praze (prof. Lukáš Rob) nebo z Gynekologicko-porodnické kliniky Fakultní nemocnice v Plzni (doc. Jiří Bouda). Vzorky krve pacientek s karcinomem prsu byly získány z Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze (MUDr. Václav Pecha).

Všechny pacientky poskytly informovaný souhlas se zařazením do studie. Jednotlivé studie byly schváleny etickými komisemi příslušných institucí a byly provedeny v souladu s Helsinskou deklarácí. Všechny vzorky byly histopatologicky vyšetřeny.

V rámci práce byla také zavedena kultivace a experimenty se třemi lidskými buněčnými liniemi karcinomu ovarií: NCI/ADR-RES (National Cancer Institute, Frederick, MD, USA), OVCAR-3 (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Německo) a SKOV-3 (Cell Lines Service GmbH).

3.2. ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZA VZORKŮ TKÁNÍ

Vzorky tkání (primární karcinom vaječníků, intraperitoneální EOC metastázy, kontrolní ovariální tkáň) byly v misce s tekutým dusíkem podrceny na prášek. S použitím AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitu (Qiagen, Hildesheim, Německo) byla izolována DNA, RNA a protein. DNA byla také izolována pomocí fenol-chloroformové extrakce (Topić E. *et* Gluhak J., 1991), kterou provedl pan S. Horský (SZÚ).

3.2.1. Práce s RNA a analýza genové exprese

RNA izolovaná z tkání pomocí AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitu byla využita pro analýzu genové exprese metodou real-time PCR (polymerázová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction) s relativní kvantifikací.

Nejprve byla pomocí kitu Quant-iT RiboGreen RNA Reagent and Kit (Invitrogen, Eugene, OR, USA) stanovena koncentrace RNA. U vybraných vzorků byla stanovením hodnoty RIN (z angl. RNA integrity number) zhodnocena kvalita RNA. Celková RNA byla dále přepsána do cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas, Vilnius, Litva). Čistota a kvalita cDNA byly posouzeny pomocí PCR, respektive real-time PCR. Následně byly ve vzorcích cDNA preamplifikovány sekvence

odpovídající vybraným genům (PerfeCTa PreAmp SuperMix, Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA).

Real-time PCR byla provedena s použitím chemikálií TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a přístroje ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Vzorky byly analyzovány v duplikátech. Teplotní profil reakce byl pro jednotlivé geny optimalizován na nejvyšší možnou účinnost (90 – 100 %).

Data získaná pomocí real-time PCR byla normalizována vůči expresi tří referenčních genů. Referenční geny byly vybrány na základě hodnocení stability genové exprese pomocí programů NormFinder (Molecular Diagnostic Laboratory, Aarhus University Hospital, Aarhus, Dánsko) a geNorm (Vandesompele J. *et al.*, 2002).

Relativní genová exprese byla mezi jednotlivými typy vzorků porovnána pomocí programů REST 2009 (Qiagen) nebo SPSS v16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Validita výsledků byla posouzena pomocí tzv. FDR korekce (z angl. false discovery rate; Benjamini Y. *et* Hochberg Y., 1995). V softwaru SPSS v16.0 byly dále analyzovány vztahy hladiny genové exprese ke klinickým datům pacientek. Jako signifikantní byly u všech testů považovány výsledky s hodnotou $p < 0,05$.

3.2.2. Práce s proteinem a analýza proteinové exprese

Proteiny izolované ze vzorků tkání pomocí AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitu byly využity pro detekci proteinů ABCA2 a PRC1 pomocí imunoblotu. Koncentrace celkového proteinu byla stanovena pomocí Pierce BCA Protein Assay Kitu (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Protein ABCA2 nebylo možné ve vzorcích stanovit. Protein PRC1 byl analyzován s použitím aparatury Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a pomocí následujících protilátek: primární monoklonální králičí IgG protilátka PRC1 Antibody (EP1513Y, Novus Biologicals, Littleton, CO,

USA), sekundární koží protilátka proti králičímu IgG Anti-Rabbit IgG značená křenovou peroxidázou (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Jako referenční gen byl detekován β -aktin; byla použita monoklonální králičí IgG protilátka β -Actin (13E5) Rabbit mAb #4970 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Pro vizualizaci byl použit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) a přístroj Odyssey Fc (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA). Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno v programu Image Studio v4.0.21 (LI-COR Biotechnology).

Data byla normalizována vzhledem k expresi β -aktinu a vzhledem k expresi v referenčním vzorku. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu SPSS v16.0 (porovnání exprese proteinu v nádorech a kontrolních vzorcích, korelace proteinové a genové exprese, vztahy s klinickými daty pacientek).

3.2.3. Práce s DNA a analýza metylace DNA

DNA izolovaná ze vzorků tkání pomocí fenol-chloroformové extrakce byla využita pro analýzu metylace v promotorové oblasti genu *ABCB1*. Koncentrace DNA ve vzorcích byla stanovena pomocí Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kitu (Invitrogen).

Methylace DNA byla analyzována metodou metylačně-specifické vysokorozlišovací analýzy křivek tání (HRM, z angl. high-resolution melting) po provedení bisulfitové konverze nádorové DNA (EpiTect Bisulfite Kit, Qiagen) s následnou real-time PCR amplifikací (EpiTect HRM Kit, Qiagen; přístroj Rotor-Gene 6000, Corbett Research, Sydney, Austrálie). Úroveň metylace DNA byla porovnána s hladinou exprese genu *ABCB1* a také byl hodnocen vztah ke klinickým datům pacientek s EOC (program SPSS v16.0).

3.3. ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZA VZORKŮ KRVE

Z periferní krve pacientek s nádory vaječníků nebo prsu byla pomocí fenol-chloroformové extrakce izolována DNA. Koncentrace DNA ve vzorcích byla stanovena pomocí Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kitu (Invitrogen).

3.3.1. Stanovení jednonukleotidových polymorfizmů

V krvi pacientek s EOC byl v DNA genů *ABCA2* a *PRCI* zkoumán výskyt jednonukleotidových polymorfizmů. Byly vybrány takové SNP, jejichž minoritní alela se v evropské populaci vyskytuje minimálně ve 3 % případů, nebo které mají klinický význam.

Pro detekci SNP byly využity dvě metody. Tři SNP v genu *ABCA2* a tři SNP v *PRCI* byly analyzovány pomocí alelické diskriminace (metoda je založena na real-time PCR, použit byl TaqMan Genotyping Master Mix a TaqMan SNP Genotyping Assay, Applied Biosystems, a přístroj ViiA7 Real-Time PCR System). Další tři SNP v genu *PRCI* byly detekovány pomocí HRM analýzy (byl použit 2x Type-it HRM PCR MasterMix, Qiagen, a přístroj Rotor-Gene 6000).

Z počtu jednotlivých genetických variant byla vypočtena frekvence variantních alel. Pomocí programu SPSS v16.0 byly hodnoceny vztahy mezi výskytem jednotlivých variant a klinickými daty pacientek. U vybraných variant byla v programu HaploView v4.2 (Barrett J.C. *et al.*, 2005) hodnocena síla vazby mezi jednotlivými SNP a v programu RegulomeDB v1.1 (Boyle A.P. *et al.*, 2012) byl hodnocen jejich potenciální funkční význam.

3.3.2. Sekvenování nové generace

Metodou sekvenování nové generace bylo v krvi pacientek s nádorem prsu na přístroji GS Junior (Roche, Branford, CT, USA) analyzováno 39 exonů genu *ABCC8* a 10 exonů genu *ABCD2*. DNA byla fragmentována pomocí přístroje Bioruptor Plus (Diagenode, Liege, Belgie). Pro přípravu knihoven a pro

sekvenování byly použity chemikálie SeqCap EZ Choice, Rapid Library Preparation Kit, emPCR Kit a GS Junior Titanium Sequencing Kit (vše Roche). Základní nastavení sekvenace bylo „Full Processing for Shotgun or Paired End Sequencing, 200 cycles (500 bases).“

Získaná data byla zpracována pomocí softwaru Sequence Pilot (JSI Medical Systems, Ettenheim, Německo). Vztahy jednotlivých variant s klinickými daty pacientek byly hodnoceny v programu SPSS v15.0. Potenciální význam zjištěných SNP byl hodnocen s použitím programů Regulome DB v1.1, SIFT (Sim N.-L. *et al.*, 2012), PolyPhen-2 (Adzhubei I.A. *et al.*, 2010) a HaploReg v2 a v3 (Ward L.D. *et Kellis M.*, 2012).

3.4. PRÁCE S BUNĚČNÝMI LINIEMI

V rámci předkládané studie byla zavedena práce se třemi buněčnými liniemi karcinomu vaječníků (NCI/ADR-RES, OVCAR-3, SKOV-3).

3.4.1. Stanovení cytotoxicity paklitaxelu a karboplatiny

Buněčné linie EOC byly charakterizovány z hlediska cytotoxicity paklitaxelu a karboplatiny. Pro stanovení cytotoxicity byl využit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) a přístroj xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA).

3.4.2. Inhibice exprese kandidátního genu PRC1 pomocí siRNA

Na buněčných liniích EOC byly provedeny pilotní experimenty pro zavedení inhibice exprese kandidátního genu PRC1 pomocí specifické siRNA (z angl. short interfering RNA). Byly použity chemikálie Silencer Select Pre-Designed siRNA proti PRC1, kontrolní siRNA Silencer Select GAPDH Positive Control a Silencer Select Negative Control No. 1 a transfekční činidlo Lipofectamine 3000 (vše Invitrogen).

Z transfekovaných buněk byla izolována RNA (čínidlo TRI Reagent, Sigma-Aldrich) a protein (lyzační pufr s tabletami PhosSTOP a cOmplete ULTRA Tablets, Roche). Účinnost inhibice exprese studovaného genu PRC1 a kontrolního genu GAPDH byla stanovena na úrovni mRNA metodou real-time PCR a na úrovni proteinu pomocí imunoblotu.

4. VÝSLEDKY

4.1. STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE KARCINOMEM OVARIÍ

Studie zabývající se ovariálním karcinomem byla tvořena několika fázemi, které na sebe navazovaly. V pilotní fázi byla porovnána exprese genů v nádorové tkáni EOC a v kontrolách a byl sledován vztah mezi genovou expresí a klinickými daty pacientek. Nejvýznamnější výsledky pilotní fáze byly ověřeny ve validační fázi. Význam vybraných kandidátních genů byl dále studován z hlediska proteinové exprese, výskytu SNP a metylace DNA. Byly také zavedeny funkční experimenty na buněčných liniích EOC. Validací a rozšiřující fáze byly provedeny ve spolupráci s kolegyněmi Mgr. E. Cerovskou (SZÚ, PřF UK), Mgr. A. Spálenkovou (SZÚ, 3LF UK) a R. Václavíkovou, Ph.D. (SZÚ). Kromě toho také ve spolupráci s Mgr. M. Burócziovou (UEM, AV ČR) probíhal pod vedením MUDr. Pavla Vodičky, CSc. výzkum vlivu genů MMR dráhy na progresi a prognózu EOC.

Potenciální význam vybraných genů pro rozvoj metastáz a progresi EOC byl studován v primárních EOC, intraperitoneálních metastázách EOC a v kontrolách. Hladina exprese v jednotlivých typech tkání byla vzájemně porovnána, dále byl zkoumán vztah mezi genovou expresí v metastázách a klinickými daty pacientek.

Jako součást studie byla zavedena kultivace tří buněčných linií karcinomu ovarií a práce s nimi (stanovení cytotoxicity, inhibice genové exprese pomocí

siRNA). Experimenty studující mechanismus působení jednotlivých kandidátů budou na Oddělení toxikogenomiky SZÚ následovat.

4.1.1. Pilotní a validační studie zabývající se EOC

V pilotní fázi byla porovnána exprese 94 cílových genů v nádorech vaječníků (n = 60) a v kontrolních tkáních (n = 14). U 12 genů byla zjištěna velmi nízká exprese pod mezí detekce. U 32 genů nebyl zjištěn signifikantní rozdíl, avšak 37 genů mělo v nádorech sníženou expresi a 13 genů bylo up-regulováno.

Ve validační části bylo v 57 vzorcích ovariálních nádorů a 14 kontrolách studováno 35 genů. Expese 12 genů nebyla v nádorech oproti kontrolám změněna, 17 genů mělo v nádorech nižší, šest genů naopak vyšší expresi. Pouze u šesti genů se výsledky zjištěné v pilotní a validační části lišily.

Dále byl studován vztah mezi hladinou genové exprese a klinickými daty pacientek (stage, grade, histologický typ, exprese proliferačního markeru Ki67, délka přežití do progresse onemocnění – PFS, z angl. progression-free survival). Ve validační části nebylo vzhledem k rozložení dat možné hodnotit stage a histologický typ. Významné výsledky byly zjištěny především u genů ABCA2/12, ABCB1, PLK1 a PRC1, které souvisely se stádiem, stupněm diferenciací EOC nebo s expresí Ki67, a geny ABCA9/10, ABCC9, ABCG2 a SLC16A14, které významně asociovaly s délkou PFS. Geny ABCA2, ABCB1 a PRC1 byly vybrány jako kandidátní geny pro další studium.

4.1.2. Expese proteinů ABCA2 a PRC1 v EOC

Protein PRC1 byl pomocí imunoblotu stanoven v 55 vzorcích primárních EOC a v devíti kontrolách; mezi těmito dvěma typy tkání nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v hladině proteinu PRC1. Rovněž nebyly pozorovány žádné významné asociace s klinickými daty pacientek ani korelace mezi hladinou proteinové a genové exprese. Metodiku detekce ABCA2 se nepodařilo zavést a bude zavedena s využitím nových specifických protilátek.

4.1.3. Metylace promotorové oblasti genu *ABCB1* v EOC

Úroveň metylace promotoru genu *ABCB1* byla stanovena v 61 vzorcích EOC a v 11 kontrolách. Pacientky byly rozděleny podle toho, zda jim před operací byla indikována neoadjuvantní chemoterapie, nebo ne.

Nádorová tkáň byla oproti kontrolám v 85 % případů hypermetylována. Míra metylace promotoru *ABCB1* u pacientek před chemoterapií negativně korelovala s expresí genu *ABCB1*, u pacientek po chemoterapii nikoliv. U pacientek bez chemoterapie rovněž vyšší úroveň metylace asociovala s časnými stádii EOC.

4.1.4. SNP genů *ABCA2* a *PRCI* v EOC

Ve vzorcích periferní krve 98 pacientek s ovariálním karcinomem byly stanoveny vybrané SNP genů *ABCA2* (n = 3) a *PRCI* (n = 6). U jednotlivých polymorfismů byla stanovena distribuce fenotypů a frekvence alel.

Výskyt jednotlivých alel byl porovnán s klinickými daty pacientek. SNP rs908832 v genu *ABCA2* asocioval se stupněm diferenciace, SNP rs2271862 v *ABCA2* asocioval s PFS pacientek. Výskyt polymorfismů rs2290203, rs8028856 a rs8031684 v genu *PRCI* asocioval se stádiem nebo HGSC typem EOC, rs12910825, rs8042680 a rs2290203 v *PRCI* navíc pravděpodobně ovlivňují vazbu transkripčních faktorů (*in silico* analýza).

4.1.5. Studium intraperitoneálních metastáz EOC

V této části práce byla studována exprese 66 genů ve 44 primárních nádorech ovarií (pT), 29 intraperitoneálních metastázách (iM) a ve 14 kontrolách (K).

Mezi primárními nádory a metastázami nebyl u 51 genů zjištěn rozdíl, tři geny však byly down-regulovány a 12 genů bylo up-regulováno v metastázách oproti primárním nádorům. V porovnání K – pT – iM nebyla změněna exprese 44 genů, 12 genů mělo v řadě K – pT – iM sníženou

expresi, 10 genů naopak zvýšenou. Expres genů ABCA7, ABCB2, ABCC3, ESR2, NH1H4 a NR1H1 byla deregulována v obou těchto porovnáních.

Dále byla porovnána hladina genové exprese s klinickými daty (histologický typ, PFS, citlivost pacientek vůči chemoterapii). Stádium a grade nebylo vzhledem k rozložení dat možné hodnotit. Geny ABCA2, ABCF3, ABCG8 a PMS1 měly vyšší expresi v HGSC v porovnání s ostatními typy EOC, expres genů ABCA2/8/9/10, ABCB1, ABCC9, ABCG2, ATP7A, SLC16A14 a SOD3 pozitivně korelovala s PFS pacientek. U genů ABCA9/10, ABCC9, ABCG2 a SLC16A14 byl tento vztah zjištěn také v primárních EOC.

4.1.6. Práce s buněčnými liniemi karcinomu vaječníků

Jako součást práce byla zavedena kultivace tří buněčných linií EOC. Cílem bylo zavést metodiku pro stanovení cytotoxicity chemoterapeutik a metodiku inhibice genové exprese.

Stanovením cytotoxicity bylo zjištěno, že buněčná linie NCI/ADR-RES je vůči paklitaxelu stokrát až tisíckrát více rezistentní než linie OVCAR-3 a SKOV-3 (řádově 10 $\mu\text{mol/l}$ vs. 10 – 100 nmol/l), vůči působení karboplatiny jsou všechny tři linie srovnatelně citlivé (řádově 100 – 1000 $\mu\text{mol/l}$).

S použitím specifických siRNA byla metodou RNA interference v buněčných liniích zavedena inhibice exprese PRC1 na úrovni genu. Inhibice exprese na úrovni proteinu bude optimalizována.

4.2. STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE NÁDORY PRSU

Cílem poslední části bylo zavést metodiku sekvenování nové generace. Hypotéza, vycházející z předchozích výsledků naší laboratoře, předpokládala, že DNA genů *ABCC8* a *ABCD2* pacientek se liší od standardního genotypu a že tyto změny mají funkční význam. Sekvenováno bylo 24 vzorků DNA

izolované z periferní krve pacientek s nádory prsu. Tato část práce byla provedena ve spolupráci s kolegou V. Hlaváčem, Ph.D. (SZÚ).

4.2.1. Genetická variabilita genů *ABCC8* a *ABCD2* stanovená pomocí NGS

Na přístroji GS Junior bylo metodou NGS sekvenováno 39 exonů genu *ABCC8* a 10 exonů genu *ABCD2*. Bylo identifikováno 41, respektive 72 zárodečných variant, z nichž celkem 81 (72 %) bylo objeveno nově.

In silico analýzou byly tři SNP v genu *ABCC8* a tři SNP v genu *ABCD2* označeny jako negativní markery. V případě SNP rs757110 v genu *ABCC8* a rs117275340 v genu *ABCD2* byl navíc ukázán potenciální vliv na vazbu řady transkripčních faktorů.

5. DISKUZE

Tématem předkládané práce bylo studium prognostického a prediktivního významu molekulárních biomarkerů nádorů vaječníků a prsu, které mají potenciální uplatnění v terciární a kvartérní prevenci.

Cílem části zabývající se karcinomem ovarií bylo zjistit, zda existují rozdíly v expresi vybraných genů mezi nádory a nenádorovou tkání (kontrolami) a jak tyto změny souvisí s klinickými daty pacientek. V pilotní části studie byla z 94 genů exprese 50 genů v nádorech deregulována, s výjimkou šesti genů byly trendy nalezené v pilotní části potvrzeny ve validační části. Dále byla v obou částech studie zjištěna řada významných vztahů mezi hladinou genové exprese a klinickými daty. Jako kandidáti pro další výzkum byly vybrány geny *ABCA2*, *ABCB1* a *PRC1*. Cílem této fáze pak bylo zjistit, zda jsou kandidátní geny v nádorech ovlivněny také na úrovni proteinu anebo genotypu (SNP, metylace) a jak tyto změny souvisí s prognózou pacientek.

Transkripce genu *ABCB1* byla v nádorech v porovnání s kontrolami snížena, jak již bylo pozorováno dříve (Ehrlichová M. *et al.*, 2013). V souladu s tím byl pomotor *ABCB1* v nádorech výrazně hypermetylován. U pacientek před chemoterapií vyšší hladina metylace korelovala s nižší genovou expresí, po aplikaci neoadjuvantní chemoterapie nikoliv; obdobná zjištění byla již získána s použitím buněčných linií karcinomu prsu (Reed K. *et al.*, 2010). Tyto výsledky potvrzují úlohu transportéru *ABCB1* v chemorezistenci nádorových buněk (Gottesman M.M. *et al.*, 2002), ukazují však, že ke vzniku rezistence pravděpodobně dochází až v průběhu léčby. Zároveň zdůrazňují význam genotypu pro prognózu a výsledek terapie.

Expresí genu *ABCA2* nebyla v nádorech deregulována, nižší transkripce v nádorech však souvisela s vyšším stupněm diferenciací nádoru a s vyšší expresí proliferčního markeru Ki67. Dále byl studován význam tří SNP v genu *ABCA2*. Zjištěný vztah mezi SPN rs908832 a stupněm diferenciací nádoru potvrdil výsledky pilotní a validační části studie, významná je také asociace SNP rs2271862 s delším PFS. Úloha těchto SNP v EOC doposud nebyla popsána. Transportér *ABCA2* pravděpodobně souvisí s chemorezistencí nádorových buněk a se vznikem nádorů (Ween M.P. *et al.*, 2015) a je významným kandidátem pro další studium.

Expresí genu *PRC1* byla v nádorové tkáni zvýšena a pozitivně korelovala s hladinou Ki67, jak již bylo popsáno (Ehrlichová M. *et al.*, 2013). Byla zavedena také imunodetekce proteinu *PRC1* v ovariální tkáni, expresí proteinu v nádorech oproti kontrolám však nebyla signifikantně změněna. Dále byl zkoumán význam šesti SNP v genu *PRC1*. SNP rs8031684 souvisel s HGSC typem, rs2290203 a rs8028856 asociovaly se stádiem EOC. U SNP rs2290203, rs12910825 a rs8042680 v genu *PRC1* byl navíc *in silico* predikován potenciální vliv na regulaci genové exprese *PRC1* a na jeho funkci. V předchozích pracích již byla ukázána souvislost mezi rs2290203 a rs8042680 a rizikem vzniku nádorů prsu (Cai Q. *et al.*, 2014; Zhao Z. *et al.*,

2016). Gen *PRC1* a SNP v genu *PRC1* jsou proto potenciálními prognostickými faktory také u EOC.

Další část práce se zabývala intraperitoneálními metastázami EOC. Výchozí hypotéza předpokládala, že mezi metastázami a primárními nádory existují rozdíly nejen v expresi genů souvisejících s EMT (Nakayama K. *et al.*, 2012), ale také v expresi dalších genů. Cílem bylo zjistit, zda tyto rozdíly souvisí s prognózou pacientek. Z 66 studovaných genů byla v metastázách v porovnání s primárními nádory exprese 15 genů deregulována. V porovnání v řadě K – pT – iM bylo deregulováno 22 genů. Významným zjištěním je, že geny *ABCA7*, *ABCB2*, *ABCC3* a *NR1H1* měly zvýšenou a geny *ESR2* a *NR1H4* sníženou expresi v obou těchto porovnáních. U genů *ABCA7* a *ESR2* tyto změny zůstaly signifikantní i po FDR korekci.

Zvýšená exprese genu *ABCA7* byla zjištěna také v pilotní fázi studia EOC a v nedávné studii, kde byla navíc zvýšena i exprese proteinu. V buněčných liniích EOC pak vedla inhibice exprese *ABCA7* ke snížení migrace buněk a tím k urychlení EMT (Liu X. *et al.*, 2018), což je v souladu s naší hypotézou. Je tedy zřejmé, že transportér *ABCA7* je pro rozvoj EOC významný, a je proto kandidátem pro další studium.

V případě genu *ESR2* byla v souladu s našimi výsledky také v dalších pracích zjištěna snížená genová exprese v nádorové oproti nenádorové ovariální tkáni (Feng Y. *et al.*, 2019; Suzuki F. *et al.*, 2008). Nedávná studie navíc ukázala, že aktivace estrogenového receptoru, který je genem *ESR2* kódován, v metastazujících buňkách karcinomu prsu vede k buněčné smrti a potlačuje metastatické bujení v plicích. Tyto výsledky naznačují potenciální význam ER pro léčbu metastáz karcinomu prsu (Zhao L. *et al.*, 2018), avšak význam mohou mít i pro léčbu metastáz EOC.

Ve tkáni intraperitoneálních metastáz EOC byla dále pozorována pozitivní korelace transkripce 10 genů (*ABCA2/8/9/10*, *ABCB1*, *ABCC9*, *ABCG2*, *ATP7A*, *SLC16A14*, *SOD3*) s délkou přežívání pacientek (PFS). Je zajímavé,

že vztah mezi genovou expresí a PFS byl u genů ABCA9/10, ABCC9, ABCG2 a SLC16A14 detekován také v primárních nádorech.

V případě genů ABCA9 a ABCA10 byla zjištěna také nižší exprese v primárních nádorech v porovnání s kontrolami, ABCA10 byl navíc down-regulován v řadě K – pT – iM. Dále exprese obou těchto genů v primárních nádorech korelovala s hladinou Ki67. U genu ABCA9 byl vztah s délkou přežívání pacientek s EOC zjištěn rovněž v práci Hedditch E.L. *et al.* (2014), u ABCA10 nikoliv. Rozdílný výsledek může souviset s odlišným histologickým typem studovaných vzorků v jednotlivých pracích. Úloha transportérů ABCA9/10 v karcinogenezi je zatím málo prozkoumána (Ween M.P. *et al.*, 2015). Naše výsledky však ukazují, že nízká hladina jejich mRNA v nádorové tkáni je negativním prognostickým markerem EOC.

Transkripce genu ABCC9 byla v primárních nádorech oproti kontrolám snížena, v porovnání K – iM však byla zvýšena. Stejně tak je v rozporu směr vztahu mezi hladinou exprese ABCC9 a délkou PFS pacientek zjištěný v primárních nádorech a metastázách. Úloha genu ABCC9 v EOC nebyla doposud popsána. Zda jsou rozdílné výsledky důsledkem progresu EOC, nebo zda jsou nesprávné, je tak potřeba ověřit dalšími experimenty.

Gen ABCG2 asocioval s délkou PFS pacientek v primárních nádorech i v metastázách, dále byla jeho exprese snížena ve směru K – pT – iM. V primárních nádorech navíc nižší transkripce souvisela s vyšší proliferací nádorových buněk. Vztah mezi expresí ABCG2 a rezistentním fenotypem zjištěn nebyl, ačkoliv v literatuře je transportér ABCG2 spojován s chemorezistencí (Gottesman M.M. *et al.*, 2002). U nádorů vaječníků jsou tato tvrzení založena zejména na *in vitro* experimentech (Eyre R. *et al.*, 2014; Januchowski R. *et al.*, 2014), ve vzorcích tkání pacientek doposud prokázána nebyla (Auner V. *et al.*, 2010). Možným vysvětlením je indukce rezistence v důsledku podání chemoterapie jako u transportéru ABCB1. Význam ABCG2 v karcinogenezi EOC je však nesporný.

Je zajímavé, že výsledky stanovené pro gen ABCG2 jsou prakticky totožné s výsledky genu SLC16A14. Transportér SLC16A14 je v literatuře rovněž spojován s lékovou rezistencí buněčných linií EOC (Januchowski R. *et al.*, 2014), *in vivo* jeho funkce v EOC zatím zkoumána nebyla. Výsledky ukázané v předkládané práci však naznačují, že by se mohlo jednat o potenciální biomarker prognózy EOC.

Pro studium funkce potenciálních kandidátních genů a cytotoxického působení chemoterapeutik mají velký význam experimenty s nádorovými buněčnými liniemi. Pro tento účel byla zavedena kultivace tří buněčných linií karcinomu vaječníků (NCI/ADR-RES, OVCAR-3, SKOV-3) a sledována jejich citlivost vůči paklitaxelu a karboplatině. Podle údajů v literatuře je linie NCI/ADR-RES rezistentní vůči paklitaxelu (Ehrlichová M. *et al.*, 2005), zatímco linie OVCAR-3 a SKOV-3 jsou citlivé až středně citlivé vůči karboplatině a paklitaxelu (Beaufort C.M. *et al.*, 2014), což bylo potvrzeno i v této práci; linie OVCAR-3 a SKOV-3 byly vůči paklitaxelu stokrát až tisíckrát citlivější než linie NCI/ADR-RES (10 – 100 nmol/l, respektive 10 μmol/l). V případě karboplatiny u všech tří linií působily cytotoxicky stejné koncentrace (100 – 1000 μmol/l).

V buněčných liniích EOC byla dále zavedena inhibice genové exprese metodou RNA interference s použitím siRNA, konkrétně siRNA proti kandidátnímu genu PRC1.

V poslední části předkládané práce byla zavedena metodika sekvenování nové generace na přístroji GS Junior. Metoda byla následně využita k sekvenování DNA izolované z periferní krve pacientek s nádory prsu s cílem zjistit, zda a jaké genetické varianty jsou v DNA zastoupeny. Význam jednotlivých zárodečných variant byl dále studován pomocí *in silico* analýzy.

Zkoumáno bylo 39 exonů genu *ABCC8* a 10 exonů genu *ABCD2*. Celkem bylo nalezeno 41, respektive 72 genetických variant, z toho 72 % bylo identifikováno nově. Tři záměny v genu *ABCC8* a tři v genu *ABCD2* byly

označeny jako potenciálně patogenní. V případě dvou záměn se jednalo o již identifikované SNP (rs757110 v genu *ABCC8*, rs117275340 v genu *ABCD2*), ostatní varianty byly nové. V případě SNP rs757110 *ABCC8* a rs117275340 *ABCD2* byl navíc predikován vliv na vazebné místo v sekvenci.

Vzhledem k nízké frekvenci výskytu jednotlivých genetických variant mohl být vztah s klinickými daty pacientek hodnocen pouze u rs757110 v genu *ABCC8*, žádný vztah však nalezen nebyl, ačkoliv v souvislosti s výskytem rs757110 bylo dříve popsáno vyšší riziko vzniku karcinomu prsu (Lehman T. *et al.*, 2008). Rozdíl ve výsledcích může být způsoben velikostí souboru; v předkládané práci byly použity vzorky pouze od 24 pacientek.

Mezi největší limity předkládané studie patří relativně malé soubory použitých vzorků. Pro identifikaci potenciálních prognostických markerů, která byla cílem práce, jsou tyto soubory dostačující, pro potvrzení jejich funkce bude potřeba analyzovat větší počty vzorků v jednotlivých souborech. Mezi přínosy této práce patří také zavedení některých nových metod na Oddělení toxikogenomiky SZÚ (stanovení cytotoxicity a RNA interference v buněčných liniích EOC, sekvenování nové generace včetně hodnocení výsledků). Dalším významným přínosem je analýza genové exprese celé rodiny ABC transportérů ve tkáních EOC a porovnání genové exprese v kontrolách, primárních nádorech a intraperitoneálních metastázách EOC. Práce poskytuje řadu nových informací, které doposud nebyly v literatuře publikovány, a identifikuje potenciální biomarkery, jejichž možnosti využití v terciární a kvartérní prevenci nádorových onemocnění budou předmětem dalších studií.

6. ZÁVĚRY

Tématem předkládané práce byly molekulární biomarkery zhoubných nádorů vaječníků a prsu. V jednotlivých částech práce byly objeveny významné

vztahy mezi genovou expresí, respektive genotypem (SNP, metylace DNA, zárodečná variabilita) v nádorové tkáni či v krvi pacientek a klinickými daty pacientek (stage, grade, exprese proliferačního markeru Ki67, PFS, odpověď na chemoterapii), a byly tak identifikovány geny, respektive genetické varianty potenciálně využitelné v prevenci progresu, v prognostice a stanovení vhodného využití léčiv v rámci individualizované terapie.

1. Práce zabývající se primárními nádory vaječníků

V části zabývající se ovariálním karcinomem bylo ukázáno, že exprese řady genů je v nádorové tkáni deregulována, a byly zjištěny významné vztahy s klinickými charakteristikami. Významné se zdají být především geny ABCA2/12, ABCB1, PLK1 a PRC1, které souvisely se stádiem, stupněm diferenciaci nebo s mírou proliferace nádorových buněk (exprese markeru Ki67), a geny ABCA9/10, ABCC9, ABCG2, MSH2 a SLC16A14, které významně asociovaly s délkou přežívání pacientek. Geny ABCA2, ABCB1 a PRC1 byly vybrány pro další studium, jehož cílem bylo zjistit, zda a jak ovlivňují prognózu pacientek změny na úrovni genotypu (metylace, SNP).

Gen *ABCB1* byl studován z hlediska metylace DNA. Promotor genu byl v nádorové tkáni hypermetylován a stupeň metylace, tedy hladina genové exprese, byla ovlivněna předchozí aplikací chemoterapie.

Geny ABCA2 a PRC1 byly analyzovány z hlediska výskytu vybraných polymorfismů. Výskyt SNP rs908832 v genu *ABCA2* souvisel se stupněm diferenciaci nádoru, stejně jako hladina genové exprese ABCA2 v nádorové tkáni. Výskyt SNP rs2271862 v genu *ABCA2* zase asocioval s PFS pacientek.

Výskyt polymorfismů rs2290203, rs8028856 a rs8031684 v genu *PRC1* asocioval se stádiem nebo HGSC typem EOC. Výskyt SNP rs12910825, rs8042680 a rs2290203 v genu *PRC1* navíc pravděpodobně ovlivňuje vazbu transkripčních faktorů.

2. Práce zabývající se intraperitoneálními metastázami vaječníků

Cílem této části práce bylo zjistit, zda se genová exprese liší také mezi primárními nádory a intraperitoneálními metastázami EOC a zda genová exprese v metastázách souvisí s prognózou pacientek. Porovnána byla exprese genů v primárních nádorech a metastázách a také v řadě kontroly – primární nádory – metastázy. Exprese genů ABCA7, ABCB2, ABCC3, ESR2, NH1H4 a NR1H1 byla významně deregulována v obou těchto porovnáních.

Dále byly objeveny geny, jejichž exprese v intraperitoneálních metastázách asociovala s bezpříznakovým přežíváním pacientek. U genů ABCA9/10, ABCC9, ABCG2 a SLC16A14 byl tento vztah zjištěn také u primárních ovariálních nádorů.

3. Práce s buněčnými liniemi karcinomu vaječníků

Jako součást práce byla zavedena kultivace tří buněčných linií EOC. Cílem bylo zavést metodiku pro stanovení cytotoxicity chemoterapeutik a metodiku inhibice genové exprese pomocí siRNA.

Stanovením cytotoxicity bylo potvrzeno, že buněčná linie NCI/ADR-RES je vůči paklitaxelu rezistentní, zatímco linie OVCAR-3 a SKOV-3 jsou senzitivní. Vůči působení karboplatiny jsou všechny tři linie srovnatelně citlivé. S použitím siRNA byla zavedena inhibice exprese PRC1 na úrovni genu.

4. Práce zabývající se nádory prsu

Cílem poslední části bylo zavést metodiku sekvenování nové generace. Hypotéza předpokládala, že DNA z krve pacientek s karcinomem prsu obsahuje významné změny na úrovni genotypu, které mají funkční význam.

Na přístroji GS Junior bylo metodou NGS sekvenováno 39 exonů v genu *ABCC8* a 10 exonů v genu *ABCD2*. Bylo identifikováno 41, respektive 72 zárodečných variant, z nichž bylo 72 % objeveno nově. *In silico* analýzou

byly predikovány potenciálně škodlivé varianty, v případě SNP rs757110 v genu *ABCC8* a rs117275340 v genu *ABCD2* byl navíc ukázán potenciální vliv na vazbu řady transkripčních faktorů.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. *Knihy*

Cassidy J., Bissett D., Spence R.A.J., *et al.* *Oxford Handbook of Oncology*. Third edition. Oxford: Oxford University Press, 2010. ISBN 978-0-19-956313-5.

Cibula D., Petruželka L. *Onkogyneekologie*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2665-6.

Fajt T., Vrablík M., Češka R., *et al.* *Preventivní medicína*. 2. rozšířené vydání. Praha: Maxdorf, 2011. ISBN 978-80-7345-237-7.

Strnad P., Daneš J. *Nemoci prsu pro gynekology*. Praha: Grada Publishing, 2001. ISBN 80-7169-714-1.

2. *Vědecké publikace*

Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*. 2010; **7**(4), 248-249.

Auner V., Sehouli J., Oskay-Oezcelik G., *et al.* ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecol. Oncol.* 2010; **117**(2), 198-201.

Barrett J.C., Fry B., Maller J., *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; **21**(2), 263-265.

Beaufort C.M., Helmijr J.C.A., Piskorz A.M., *et al.* Ovarian Cancer Cell Line Panel (OCCP): Clinical Importance of *In Vitro* Morphological Subtypes. *PLoS ONE*. 2014; **9**(9): e103988.

Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Statist. Soc. B*. 1995; **57**(1), 289-300.

Bergmann T.K., Brasch-Andersen C., Green H., *et al.* Impact of *CYP2C8*3* on paclitaxel clearance: a population pharmacokinetic and pharmacogenomic study in 93 patients with ovarian cancer. *Pharmacogenomics J.* 2011; **11**(2), 113-120.

- Boyle A.P., HONG E.L., Hariharan M., *et al.* Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 2012; **22**(9), 1790-1797.
- Bray F., Jemal A., Grey N., *et al.* Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 2012; **13**(8), 790-801.
- Cai Q., Zhang B., Sung H., *et al.* Genome-wide association analysis in East Asians identifies breast cancer susceptibility loci at 1q32.1, 5q14.3 and 15q26.1. *Nat. Genet.* 2014; **46**(8), 886–890.
- Camilleri-Broët S., Hardy-Bessard A.C., Le Tourneau A., *et al.* HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group. *Ann. Oncol.* 2004; **15**(1), 104-112.
- Coates A.S., Winer E.P., Goldhirsch A., *et al.* Tailoring therapies – improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann. Oncol.* 2015; **26**(8), 1533-1546.
- Diaz-Moralli S., Tarrado-Castellarnau M., Miranda A., *et al.* Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 2013; **138**(2), 255-271.
- Duffy M.J., Sturgeon C.M., Sölétormos G., *et al.* Validation of New Cancer Biomarkers: A Position Statement from the European Group on Tumor Markers. *Clin. Chem.* 2015; **61**(6), 809-820.
- Dušková J., Beková A., Dvořák V., *et al.* Výsledky Národního programu screeningu karcinomu děložního hrdla v České republice. *Klin. Onkol.* 2014; **27**(Suppl 2), 2S69-2S78.
- Ehrlichová M., Koc M., Truksa J., *et al.* Cell Death Induced by Taxanes in Breast Cancer Cells: Cytochrome c is Released in Resistant but not in Sensitive Cells. *Anticancer Res.* 2005; **25**(6B), 4215-4224.
- Ehrlichova M., Mohelnikova-Duchonova B., Hrdy J., *et al.* The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma. *Genomics.* 2013; **102**(2), 96-101.
- Eyre R., Harvey I., Stemke-Hale K., *et al.* Reversing paclitaxel resistance in ovarian cancer cells via inhibition of the ABCB1 expressing side population. *Tumor Biol.* 2014; **35**(10), 9879-9892.
- Feng Y., Peng Z., Liu W., *et al.* Evaluation of the epidemiological and prognosis significance of ESR2 rs3020450 polymorphism in ovarian cancer. *Gene.* 2019; **710**, 316-323.
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F., *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* 2010; **127**(12), 2893-2917.

- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015; **136**(5), E359-E386.
- Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; **2**(1), 48-58.
- Guadagni F., Ferroni P., Carlini S., *et al.* A Re-Evaluation of Carcinoembryonic Antigen (CEA) as a Serum Marker for Breast Cancer: A Prospective Longitudinal Study. *Clin. Cancer Res.* 2001; **7**(8), 2357-2362.
- Hedditch E.L., Gao B., Russell A.J., *et al.* ABCA Transporter Gene Expression and Poor Outcome in Epithelial Ovarian Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014; **106**(7), dju149.
- Herraez E., Gonzalez-Sanchez E., Vaquero J., *et al.* Cisplatin-Induced Chemoresistance in Colon Cancer Cells Involves FXR-Dependent and FXR-Independent Up-Regulation of ABC Proteins. *Mol. Pharmaceutics.* 2012; **9**(9), 2565-2576.
- Hu Y., Rosen D.G., Zhou Y., *et al.* Mitochondrial Manganese-Superoxide Dismutase Expression in Ovarian Cancer. *J. Biol. Chem.* 2005; **280**(47), 39485-39492.
- Hüsemann Y., Geigl J.B., Schubert F., *et al.* Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer. *Cancer Cell.* 2008; **13**(1), 58-68.
- Chaffer C.L., Weinberg R.A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science.* 2011; **331**(6024), 1559-1564.
- Januchowski R., Zawierucha P., Ruciński M., *et al.* Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. *Biomed. Pharmacother.* 2014; **68**(4), 447-453.
- Jayson G.C., Kohn E.C., Kitchener H.C., *et al.* Ovarian cancer. *Lancet.* 2014, **384**(9951), 1376-1388.
- Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genetics.* 2012; **13**(7), 484-492.
- Kalayda G.V., Wagner C.H., Jaehde U. Relevance of copper transporter 1 for cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *J. Inorg. Biochem.* 2012; **116**, 1-10.
- Kamal C.K., Simionescu C.E, Margaritescu C., *et al.* P53 and Ki67 immunoexpression in mucinous malignant ovarian tumors. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2012; **53**(3 Suppl), 799-803.
- Kummerow K.L., Du L., Penson D.F., *et al.* Nationwide Trends in Mastectomy for Early-Stage Breast Cancer. *JAMA Surg.* 2015; **150**(1), 9-16.

- Kunkel T.A., Erie D.A. Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu. Rev. Genet.* 2015; **49**, 291-313.
- Lehman T., Mallireddy V., Seddon M., *et al.* Association between an ABCC8/SUR1 polymorphism and breast cancer risk. Proceedings: AACR 99th Annual Meeting 2008, San Diego, CA, USA. Abstract v *Cancer Res. Supplement* 2008; **68**(9), 1934.
- Liu X., Li Q., Zhou J., *et al.* ATP-binding cassette transporter A7 accelerates epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells by upregulating the transforming growth factor- β signaling pathway. *Oncol. Lett.* 2018; **16**(5), 5868-5874.
- Lowy D.R. HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions. *J. Clin. Invest.* 2016; **126**(1), 5-11.
- Martin S.A., Lord C.J., Ashworth A. Therapeutic Targeting of the DNA Mismatch Repair Pathway. *Clin. Cancer Res.* 2010; **16**(21), 5107-5113.
- Metcalf, Kelly A., Lynch, Henry T., Ghadirian, Parviz, *et al.* The risk of ovarian cancer after breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol. Oncol.* 2005; **96**(1), 222-226.
- Metcalf K., Gershman S., Ghadirian P., *et al.* Contralateral mastectomy and survival after breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations: retrospective analysis. *Br. Med. J.* 2014; **348**, g226.
- Moreno-Smith M., Halder J.B., Meltzer P.S., *et al.* ATP11B mediates platinum resistance in ovarian cancer. *J. Clin. Invest.* 2013; **123**(5), 2119-2130.
- Nakajima M., Fujiki Y., Kyo S., *et al.* Pharmacokinetics of Paclitaxel in Ovarian Cancer Patients and Genetic Polymorphisms of CYP2C8, CYP3A4, and MDR1. *J. Clin. Pharmacol.* 2005; **45**(6), 674-682.
- Nakayama K., Nakayama N., Katagiri H., *et al.* Mechanisms of Ovarian Cancer Metastasis: Biochemical Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; **13**(9), 11705-11717.
- Palmgren M.G., Nissen P. P-Type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* 2011; **40**, 243-266.
- Perou C.M., Sùrlie T., Eisen M.B., *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; **406**(6797), 747-752.
- Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* 2012; **460**(3), 237-249.

- Reed K., Hembruff S.L., Sprowl J.A., *et al.* The temporal relationship between *ABCB1* promoter hypomethylation, *ABCB1* expression and acquisition of drug resistance. *Pharmacogenomics J.* 2010; **10**(6), 489-504.
- Robertson K.D. DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genetics.* 2005; **6**(8), 597-610.
- Samimi G., Safaei R., Katano K., *et al.* Increased Expression of the Copper Efflux Transporter ATP7A Mediates Resistance to Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin in Ovarian Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* 2004; **10**(14), 4661-4669.
- Seifert B., Májek O., Zavoral M., *et al.* Výsledky Národního programu screeningu kolorektálního karcinomu v České republice – testy na okultní krvácení do stolice. *Klin. Onkol.* 2014; **27**(Suppl 2), 2S87-2S97.
- Schwartz D.R., Kardia S.L. R., Shedden K.A., *et al.* Gene Expression in Ovarian Cancer Reflects Both Morphology and Biological Behavior, Distinguishing Clear Cell from Other Poor-Prognosis Ovarian Carcinomas. *Cancer Res.* 2002; **62**(16), 4722-4729.
- Sim N.-L., Kumar P., Hu J., *et al.* SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012; **40**(W1), W452–W457.
- Skovajsová M., Májek O., Daneš J., *et al.* Výsledky Národního programu screeningu karcinomu prsu v České republice. *Klin. Onkol.* 2014; **27**(Suppl 2), 2S69-2S78.
- Song H., Ramus S.J., Quaye L., *et al.* Common variants in mismatch repair genes and risk of invasive ovarian cancer. *Carcinogenesis.* 2006; **27**(11), 2235-2242.
- Sørli T., Perou C.M., Tibshirani R., *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS.* 2001; **98**(19), 10869-10874.
- Suchánek Š., Májek O., Zavoral M., *et al.* Výsledky Národního programu screeningu kolorektálního karcinomu v České republice – kolonoskopická vyšetření. *Klin. Onkol.* 2014; **27**(Suppl 2), 2S98-2S105.
- Suzuki F., Akahira J., Miura I., *et al.* Loss of Estrogen Receptor β Isoform Expression and Its Correlation with Aberrant DNA Methylation of the 5'-untranslated Region in Human Epithelial Ovarian Carcinoma. *Cancer Sci.* 2008; **99**(12), 2365-2372.
- Topić E., Gluhak J. Isolation of Restrictible DNA. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1991; **29**(5), 327-330.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; **3**(7), 0034.1.

Ward L.D., Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res.* 2012; **40**(D1), D930-D934.

Ween M.P., Armstrong M.A., Oehler M.K., *et al.* The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2015; **96**(2), 220-256.

Wilkins S.. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep.* 2015; **7**.

Wiman K.G., Zhivotovsky B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. *J. Intern. Med.* 2017; **281**(5), 483-495.

Xiao X., Melton D.W., Gourley C. Mismatch repair deficiency in ovarian cancer – Molecular characteristics and clinical implications. *Gynecol. Oncol.* 2014; **132**(2), 506-512.

Yeung T.-L., Leung C.S., Yip K.-P., *et al.* Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015; **309**(7), C444-C456.

Zhang R., Shi H., Ren F., *et al.* Misregulation of polo-like protein kinase 1, P53 and P21^{WAF1} in epithelial ovarian cancer suggests poor prognosis. *Oncol. Rep.* 2015; **33**(3), 1235-1242.

Zhang X., Nicosia S.V., Bai W. Vitamin D receptor is a novel drug target for ovarian cancer treatment. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2006; **6**(3), 229-244.

Zhao L., Huang S., Mei S., *et al.* Pharmacological activation of estrogen receptor beta augments innate immunity to suppress cancer metastasis. *PNAS.* 2018; **115**(16), E3673-E3681.

Zhao Z., Wen W., Michailidou K., *et al.* Association of genetic susceptibility variants for type 2 diabetes with breast cancer risk in women of European ancestry. *Cancer Causes & Control.* 2016; **27**(5), 679-693.

3. Internetové zdroje

Guidelines. *Onkogynekologie* [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: http://www.onkogynekologie.com/wp-content/uploads/2011/03/Guideline_C56_Epit_2013.pdf

8. SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace in extenso, které jsou podkladem práce (s IF)

Soucek P., Hlavac V., Elsnerova K., *et al.* Whole Exome Sequencing Analysis of ABCC8 and ABCD2 Genes Associating With Clinical Course of Breast Carcinoma. *Physiol. Res.* 2015; **64**(Suppl. 4), S549-S557. IF(2018) = 1,701

Elsnerova K., Mohelnikova-Duchonova B., Cerovska E., *et al.* Gene expression of membrane transporters: Importance for prognosis and progression of ovarian carcinoma. *Oncol. Rep.* 2016; **35**(4), 2159-2170. IF(2018) = 3,041

Elsnerova K., Bartakova A., Tihlarik J., *et al.* Gene Expression Profiling Reveals Novel Candidate Markers of Ovarian Carcinoma Intraperitoneal Metastasis. *J. Cancer.* 2017; **8**(17), 3598-3606. IF(2018) = 3,182

Vaclavikova R., Klajic J., Brynychova V., Elsnerova K., *et al.* Development of high-resolution melting analysis for ABCB1 promoter methylation: Clinical consequences in breast and ovarian carcinoma. *Oncol. Rep.* 2019; **42**(2), 763-774. IF(2018) = 3,041

Publikace in extenso, které jsou podkladem práce (bez IF)

Václavíková R., Elsnerová K., Mohelníková-Duchoňová B., *et al.* Markery progresu a vzniku metastáz u ovariálního karcinomu sledované na základě genových expresních profilů. *Plzeň. Léč. Sborn.* 2015; **81**, 39-55. Hodnoceno dle systému RIV

Publikace in extenso bez vztahu k tématu práce (s IF)

Cerovska E., Elsnerova K., Vaclavikova R., *et al.* The role of membrane transporters in ovarian cancer chemoresistance and prognosis. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2017; **13**(7), 741-753. IF(2018) = 3,487

Hlavac V., Kovacova M., Elsnerova K., *et al.* Use of Germline Genetic Variability for Prediction of Chemoresistance and Prognosis of Breast Cancer Patients. *Cancers.* 2018; **10**(12), 511. IF(2018) = 6,162

Seborova K., Vaclavikova R., Soucek P., Elsnerova K., *et al.* Association of ABC gene profiles with time to progression and resistance in ovarian cancer revealed by bioinformatics analyses. *Cancer Med.* 2019; **8**(2), 606-616. IF(2018) = 3,357