

UNIVERZITA KARLOVA

3. lékařská fakulta



Dizertační práce

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

**Molecular biomarkers of solid tumors and their use in prognosis
and prevention of cancer**

Školitelka: RNDr. Radka Václavíková, Ph.D.

Praha, 2020

Mgr. Kateřina Elsnerová

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Radce Václavíkové, Ph.D. za odborné vedení a pomoc v průběhu celého studia při experimentální práci i při psaní článků a této dizertační práce. Velké díky patří také vedoucímu Oddělení toxikogenomiky SZÚ doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc. a dalším kolegům, zejména Ing. Marii Ehrlichové, Mgr. Alžbětě Spálenkové a Mgr. Viktorovi Hlaváčovi, Ph.D., za předání zkušeností a přátelské povzbuzení.

Poděkování za spolupráci patří také laboratoři MUDr. Pavla Vodičky, CSc. (UEM, AV ČR), všem lékařům na spolupracujících odděleních a spoluautorům publikací.

Na závěr chci poděkovat svému manželovi a dceři za trpělivost a pochopení a rodičům i dalším členům rodiny za všestrannou podporu, bez nichž by sepsání dizertační práce bylo takřka nemožné.

Práce byla podpořena následujícími grantovými agenturami a institucemi: GAČR (č. grantu P303/12/G163 a 19-10543S), Národní program udržitelnosti I poskytovaný Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (č. grantu LO1503), Ministerstvo zdravotnictví (č. grantu NT14055-3, NT14056 a 15-25884A).

Kateřina Elsnerová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 5. 5. 2020

Kateřina Elsnerová

Identifikační záznam:

ELSNEROVÁ, Kateřina. *Molekulární biomarkery solidních nádorů a jejich využití v prognóze a prevenci nádorových onemocnění. [Molecular biomarkers of solid tumors and their use in prognosis and prevention of cancer]*. Praha, 2020. Počet stran: 114, počet příloh: 9. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta 2020. Školitelka RNDr. Radka Václavíková, Ph.D.

Klíčová slova:

Molekulární biomarkery; ovariální karcinom; karcinom prsu; genová exprese; NGS; intraperitoneální metastázy; ABC transportéry. [Molecular biomarkers; ovarian carcinoma; breast cancer; gene expression; NGS; intraperitoneal metastases; ABC transporters.]

OBSAH

1. Literární přehled	8
1.1. Epidemiologie, dignostika a terapie zhoubných nádorů	8
1.1.1. Zhoubné nádory vaječnicků.....	9
1.1.1.1. Epidemiologie a rizikové faktory nádorů vaječnicků.....	9
1.1.1.2. Diagnostika a klasifikace nádorů vaječnicků	12
1.1.1.3. Terapie nádorů vaječnicků.....	14
1.1.1.4. Metastatické šíření nádorů vaječnicků	16
1.1.2. Zhoubné nádory prsu	17
1.1.2.1. Epidemiologie a rizikové faktory nádorů prsu	17
1.1.2.2. Diagnostika a klasifikace nádorů prsu	19
1.1.2.3. Terapie nádorů prsu	20
1.2. Prevence nádorových onemocnění	22
1.3. Molekulární nádorové markery	23
1.3.1. Transport v nádorových buňkách	24
1.3.1.1. ABC transportéry	25
1.3.1.2. SLC transportéry.....	28
1.3.1.3. ATPázy typu P	30
1.3.2. Metabolismus léčiv v nádorových buňkách.....	31
1.3.3. Proliferace a regulace buněčného cyklu	32
1.3.3.1. Geny MMR dráhy	33
1.3.4. Regulační mechanismy	34
1.3.4.1. Receptory a transkripční faktory.....	34
1.3.4.2. Metylace DNA	35
2. Hypotézy a cíle práce.....	37
3. Materiál a metody	39

3.1. Vzorky tkání pacientek a buněčné linie	39
3.1.1. Vzorky od pacientek s karcinomem vaječníků nebo karcinomem prsu	39
3.1.2. Buněčné linie karcinomu vaječníků.....	39
3.2. Zpracování a analýza vzorků tkání	40
3.2.1. Izolace RNA, DNA a proteinu z tkání	41
3.2.2. Práce s RNA a analýza genové exprese.....	41
3.2.2.1. Stanovení koncentrace a kontrola kvality RNA	41
3.2.2.2. Syntéza a kontrola kvality cDNA	42
3.2.2.3. Preamplifikace cDNA.....	43
3.2.2.4. Stanovení genové exprese pomocí real-time PCR s relativní kvantifikací.....	43
3.2.2.5. Statistické vyhodnocení dat získaných pomocí real-time PCR	44
3.2.3. Práce s proteinem a analýza proteinové exprese	45
3.2.3.1. Stanovení koncentrace proteinu	45
3.2.3.2. Imunoblot.....	45
3.2.3.3. Statistické vyhodnocení údajů získaných z imunoblotů	46
3.2.4. Práce s DNA a analýza metylace DNA	46
3.2.4.1. Stanovení koncentrace DNA	46
3.2.4.2. Metylačně-specifická vysokorozlišovací analýza křivek tání	47
3.2.4.3. Statistické vyhodnocení metylačně-specifických HRM analýz.....	48
3.3. Zpracování a analýza vzorků krve	48
3.3.1. Stanovení jednonukleotidových polymorfizmů vybraných genů	49
3.3.1.1. Alelická diskriminace	49
3.3.1.2. Vysokorozlišovací analýza křivek tání detekující SNP	51
3.3.1.3. Statistické vyhodnocení stanovení SNP	52
3.3.2. Sekvenování nové generace.....	52
3.3.2.1. Hodnocení dat získaných pomocí NGS	53
3.4. Práce s buněčnými liniemi	53

3.4.1. Kultivace buněčných linií	54
3.4.2. Stanovení cytotoxicity paklitaxelu a karboplatiny.....	54
3.4.2.1. Stanovení cytotoxicity pomocí kitu CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	54
3.4.2.2. Stanovení cytotoxicity pomocí přístroje xCELLigence RTCA DP.....	55
3.4.3. Inhibice exprese kandidátních genů a proteinů pomocí siRNA	55
3.4.3.1. Statistické vyhodnocení inhibice exprese PRC1 pomocí siRNA	56
4. Výsledky	58
4.1. Studie zabývající se ovariálním karcinomem	58
4.1.1. Pilotní studie	59
4.1.1.1. Výběr referenčních genů.....	61
4.1.1.2. Porovnání genové exprese v primárních EOC a kontrolách v pilotní studii	61
4.1.1.3. Vztah genové exprese ke klinickým datům pacientek v pilotní studii	62
4.1.2. Validační studie	65
4.1.2.1. Porovnání genové exprese v primárních EOC a kontrolách ve validační studii.....	65
4.1.2.2. Vztah genové exprese ke klinickým datům pacientek ve validační studii	66
4.1.3. Studium kandidátních genů a proteinů	67
4.1.3.1. Exprese proteinů ABCA2 a PRC1 v EOC.....	68
4.1.3.2. Metylace promotorové oblasti genu ABCB1.....	68
4.1.3.3. SNP genů ABCA2 a PRC1	70
4.1.4. Studium intraperitoneálních metastáz EOC.....	73
4.1.4.1. Porovnání genové exprese v kontrolách, primárních EOC a intraperitoneálních metastázách.....	74
4.1.4.2. Vztah genové exprese ke klinickým datům pacientek s intraperitoneálními EOC metastázami	76
4.1.5. Charakterizace buněčných linií.....	78

4.1.5.1. Cytotoxicita PCT a karboPt stanovená pomocí kitu CellTiter 96R AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay	78
4.1.5.2. Cytotoxicita PCT a karboPt stanovená pomocí přístroje xCELLigence RTCA DP.....	80
4.1.5.3. Inhibice exprese PRC1 pomocí siRNA	81
4.2. Studie zabývající se karcinomem prsu.....	83
4.2.1. Genetická variabilita genů <i>ABCC8</i> a <i>ABCD2</i> stanovená metodou NGS.....	85
4.2.1.1. Význam genetické variability genů <i>ABCC8</i> a <i>ABCD2</i>	85
5. Diskuze	88
5.1. Analýza genové exprese v nádorech vaječnicků, analýza metylace a výskytu SNP v kandidátních genech	88
5.2. Analýza genové exprese v intraperitoneálních metastázách vycházejících z EOC	89
5.3. Stanovení cytotoxicity a inhibice genové exprese pomocí siRNA v buněčných liniích karcinomu ovaríí.....	92
5.4. Analýza zárodečné genetické variability genů <i>ABCC8</i> a <i>ABCD2</i> v krvi pacientek s nádory prsu stanovená metodou NGS.....	93
6. Závěry	95
Souhrn.....	97
Summary.....	98
Použitá literatura	99
Seznam příloh	114

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

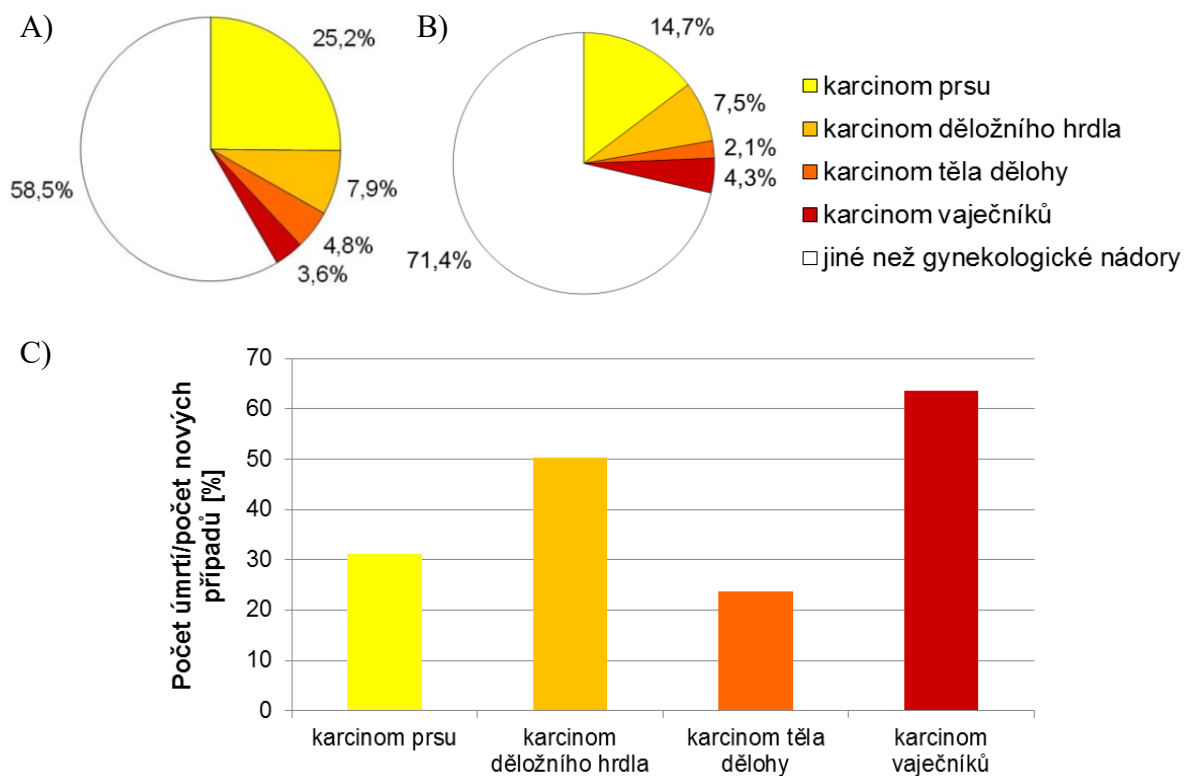
1.1. EPIDEMIOLOGIE, DIGNOSTIKA A TERAPIE ZHOUBNÝCH NÁDORŮ

Z hlediska incidence představují nádorová onemocnění celosvětově významný epidemiologický problém. Počet nových případů za rok má dlouhodobě stoupající tendenci; v roce 2008 bylo zjištěno 12,7 milionů nových případů nádorových onemocnění (Ferlay J. *et al.*, 2010), v roce 2012 vzrostl počet nových případů na 14,1 milionů (Ferlay J. *et al.*, 2015) a podle odhadů se tento počet zvýší v roce 2030 na 20,3 milionů nově diagnostikovaných zhoubných nádorů (Bray F. *et al.*, 2012). Stoupající tendenci má také počet úmrtí spojených s nádorovými onemocněními (Bray F. *et al.*, 2012; Ferlay J. *et al.*, 2010; Ferlay J. *et al.*, 2015).

Celosvětově nejvyšší incidenci u mužů dlouhodobě vykazují nádory plic. U žen jsou však na prvním místě nádory prsu následované kolorektálními nádory a nádory plic. Téměř totožné údaje se týkají i počtu úmrtí souvisejících s nádorovými onemocněními (Ferlay J. *et al.*, 2015). V České republice mají u mužů nejvyšší incidenci nádory prostaty, avšak u žen jsou na prvním místě opět nádory prsu (www.uzis.cz).

Spolu s nádory prsu patří mezi celosvětově nejrozšířenější nádorová onemocnění také gynekologické zhoubné nádory. V ženské populaci zauímají karcinom prsu, děložního hrdla, těla dělohy a vaječnicků, spolu s kolorektálním karcinomem, nádory žaludku a plic, prvních sedm příček v počtu nových případů za rok 2012. Celkově tvoří 41,5 % všech případů a 28,6 % všech úmrtí souvisejících s nádorovými onemocněními. Vysoký je také podíl úmrtí na gynekologické nádory vzhledem k celkovému počtu pacientek; nejvyšší podíl pacientek, které na dané onemocnění zemřou, vykazují karcinom děložního hrdla a karcinom vaječnicků (Ferlay J. *et al.*, 2015; obr. 1, s. 9).

Péče o onkologické pacienty zahrnuje prevenci, diagnostiku a terapii. V současné době se však klade stále větší důraz také na prognózu onemocnění. Biologické markery, které by umožnily určit pacientovu prognózu či sledovat průběh onemocnění, jsou důležitým nástrojem prevence progresu onemocnění (sekundární a terciární prevence) a vzniku metastáz. Představují významný posun směrem k individualizaci a zkvalitnění léčby a jsou proto předmětem výzkumu (Jančárková N. *et al.*, 2006).



Obr. 1: Procentuální zastoupení (A) nově diagnostikovaných karcinomů prsu a gynekologických nádorů a (B) počtu úmrtí souvisejících s karcinomem prsu a gynekologickými nádory vzhledem k celkovému počtu případů v ženské populaci v roce 2012. (C) Podíl počtu úmrtí a nových případů jednotlivých typů zhoubných nádorů žen (podle Ferlay J. *et al.*, 2015).

1.1.1. Zhoubné nádory vaječníků

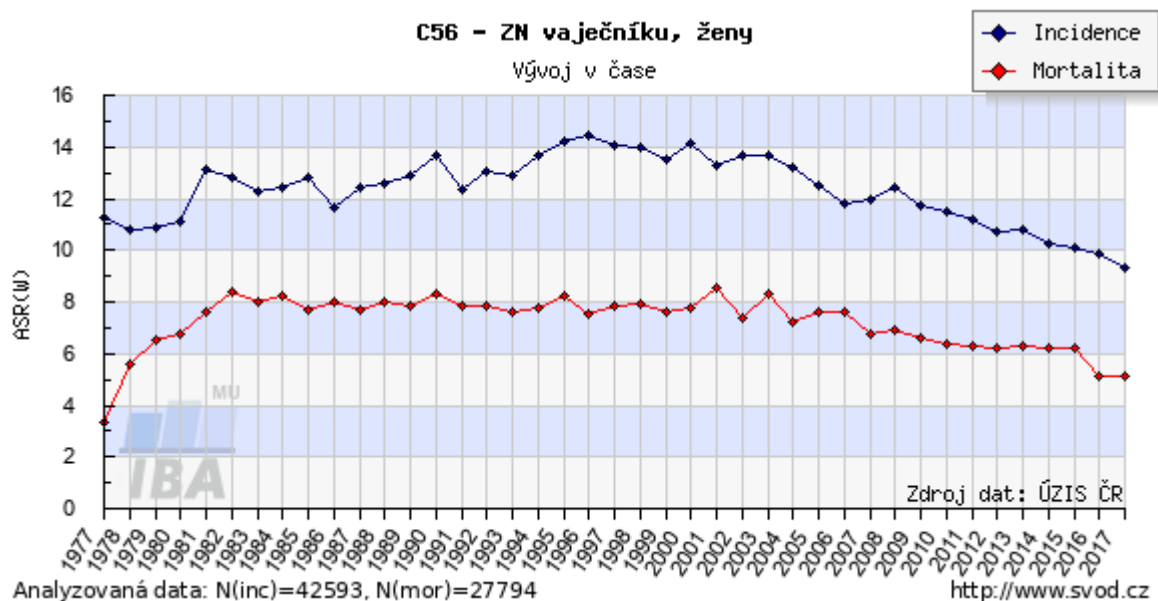
1.1.1.1. Epidemiologie a rizikové faktory nádorů vaječníků

Zhoubné nádory vaječníků postihují ročně více než 200 000 žen. Jedná se o sedmé nejčastější nádorové onemocnění a zároveň osmou nejčastější příčinu úmrtí v souvislosti s nádorovými onemocněními v ženské populaci. Incidence nádorů vaječníků je nejvyšší ve vyspělých zemích, kde má také nejvyšší podíl mortality a incidence mezi všemi gynekologickými nádory (Ferlay J. *et al.*, 2015).

Vzhledem k tomu, že ovariální nádory nevykazují specifické symptomy a zatím nebyla vyvinuta spolehlivá screeningová metoda pro detekci časných stádií tohoto onemocnění, zhoubné nádory vaječníků jsou většinou diagnostikovány v pozdních stádiích; v roce 2017 tvořila v České republice stádia III a IV (viz kap. 1.1.1.2., s. 12) 59,2 % případů (www.svod.cz). Celkové přežití pacientek se zhoubnými nádory vaječníků je proto pouze

cca 30 % (Yeung T.L. *et al.*, 2015) a pětileté přežití je 44 % v případě všech stádií dohromady (Siegel R. *et al.*, 2014). Čím je stage vyšší, tím nižší je procento pacientek přežívajících pět let; u stádia IV je to již pouze 7 % (Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009).

V posledních letech byl zaznamenán pokles incidence nádorů vaječníků (obr. 2), který souvisí s diagnózou pacientek v časnějších stádiích onemocnění a nejčastěji je přisuzován užívání hormonální antikoncepce (Lowe K.A. *et al.*, 2013). Ukazuje se, že čím je doba užívání hormonální antikoncepce delší, tím delší a výraznější je také její protektivní efekt (Tsilidis K.K. *et al.*, 2011; Tworoger S.S. *et al.*, 2007). Úmrtnost je však i přesto stále velmi vysoká; v České republice je karcinom vaječníků příčinou přibližně 700 úmrtí ročně a přežití se zlepšuje pouze minimálně (Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009). Je proto potřeba zaměřit se na nové metody screeningu a diagnostiky časných stádií onemocnění a na zvýšení účinnosti léčby (Lowe K.A. *et al.*, 2013).



Obr. 2: Věkově standardizovaná incidence a mortalita na zhoubné nádory vaječníků u žen v České republice v letech 1977 – 2017 (www.svod.cz).

Kromě hormonální antikoncepce byl v rozsáhlé studii ukázán také protektivní efekt dalších antikoncepčních metod, zejména podvázání vejcovodů a zavedené nitroděložní tělísko (Ness R.B. *et al.*, 2011), i když předchozí studie naznačovala spíše zvýšení rizika vzniku nádorů vaječníků u žen, které používaly nitroděložní tělísko (Tworoger S.S. *et al.*, 2007). Dále má na riziko vzniku karcinomu vaječníků pozitivní vliv také kojení či vyšší počet

porodů (Faber M.T. *et al.*, 2013; Tsilidis K.K. *et al.*, 2011). Obecně je přijímána teorie, že nádory vaječníků vznikají v důsledku poškození, ke kterému dochází při ovulaci a následné proliferaci buněk ovariálního epitelu (Preston-Martin S. *et al.*, 1990). Mechanismus ochrany tedy pravděpodobně spočívá v regulaci počtu ovulací (Faber M.T. *et al.*, 2013).

Riziko vzniku nádorů vaječníků se naopak zvyšuje u žen, které jsou neplodné (Tworoger S.S. *et al.*, 2007) a v nedávné rozsáhlé studii bylo potvrzeno také signifikantně vyšší riziko u žen, které v průběhu menopauzy užívaly hormonální terapii, v porovnání s ženami, které hormonální terapii nikdy neužívaly. Riziko bylo tím vyšší, čím delší byla celková doba užívání (Lacey J.V. *et al.*, 2002). Dále bylo vyšší riziko zjištěno u pacientek s endometriózou, avšak tento vliv je možné částečně kompenzovat užíváním hormonální antikoncepce (Modugno F. *et al.*, 2004). Kouření, které je považováno za rizikový faktor řady civilizačních onemocnění, má rovněž na rozvoj nádorů vaječníků vliv; zvýšené riziko bylo pozorováno u mucinózního typu, u serózního a endometroidního typu však ne (Faber M.T. *et al.*, 2013).

Výrazným vrozeným rizikovým faktorem vzniku nádorů vaječníků je mutace v tumor-supresorových genech *BRCA1* a *BRCA2* (z angl. breast cancer 1, resp. 2), která se uplatňuje u hereditárního typu nádorů vaječníků a prsu. Nosiči mutace v genu *BRCA1* mají výrazně vyšší riziko vzniku nádorů prsu a vaječníků, zvýšené riziko bylo zjištěno také u kolorektálního karcinomu nebo karcinomu prostaty (Ford D. *et al.*, 1994). U pacientek s karcinomem ovarií, které jsou zároveň nosičkami mutace genu *BRCA1*, byl prokázán nástup onemocnění o 10 let dříve než u kontrolní skupiny pacientek (Rubin S.C. *et al.*, 1996). Riziko vzniku karcinomu ovaria je výrazně vyšší u pacientek s primárním nádorem prsu a s některým z těchto dvou onemocnění v rodinné anamnéze, výrazně se zvyšuje také u pacientek, kterým byl nádor prsu diagnostikován před 40. rokem věku (Bergfeldt K. *et al.*, 2002). Takovým pacientkám je proto indikována mutační analýza genů *BRCA1/2* (Bartoňková H. *et al.*, 2003) a z důvodu prevence sekundárního nádorového onemocnění je pacientkám s nádorem prsu a zjištěnou mutací genů *BRCA1/2* doporučována ovariectomie (Metcalf K.A. *et al.*, 2005).

1.1.1.2. Diagnostika a klasifikace nádorů vaječníků

Nádory vaječníků nevykazují specifické symptomy a doposud nebyla vyvinuta spolehlivá screeningová metoda pro včasný záchyt tohoto onemocnění. Při podezření na nádor vaječníků by pacientka měla být vyšetřena v onkogynekologickém centru; základními vyšetřovacími metodami jsou skiagram hrudníku a ultrazvukové vyšetření, které umožňuje rozlišení hraničních (border line), benigních a maligních tumorů. Je-li potřeba, vyšetření může být doplněno dalšími zobrazovacími technikami – počítačovou tomografií (CT) nebo magnetickou rezonancí (MR). Nedílnou součástí základního vyšetření je také stanovení sérového markeru CA-125 (z angl. cancer antigen 125; Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009).

Glykoprotein CA-125 je v případě nádorů vaječníků nejčastěji používaným diagnostickým markerem, avšak sledování jeho hladiny bylo původně vyvinuto pro monitorování stavu pacientek s již diagnostikovanými nádory (Kobayashi E. *et al.*, 2012). Jeho koncentrace v séru je totiž zvýšena nejen u zhoubných nádorů vaječníků, ale také u benigních ovariálních lézí a nádorů jiných ženských orgánů (O'Connell G.J. *et al.*, 1987). Spolehlivěji proto může CA-125 predikovat relaps onemocnění (Rustin G.J.S. *et al.*, 1996). V nedávno publikované studii bylo ukázáno, že hladina CA-125 v době diagnózy může být ovlivněna řadou faktorů, např. věkem a rasou pacientky, obezitou či přítomností nádorů prsu nebo vaječníků v rodinné anamnéze. Vliv těchto faktorů by proto měl být zohledněn při stanovování koncentrace CA-125 v séru žen s podezřením na nádor vaječníků (Babic A. *et al.*, 2017).

Kromě CA-125 byla zvýšená koncentrace v séru zjištěna také u proteinu HE4 (z angl. human epididymis secretory protein 4). Podle Ferraro S. *et al.* (2013) je HE4 specifitčtější markerem pro stanovení ovariálního karcinomu než CA-125, poskytuje navíc specifitčtější rozlišení maligních a benigních lézí (Hellström I. *et al.*, 2003). Řada studií ukázala, že stanovení obou dvou proteinů, CA-125 a HE4, zároveň zvýší správnost detekce ovariálního karcinomu (Huhtinen K. *et al.*, 2009; Azzam A.Z. *et al.*, 2013). Podle doporučení z roku 2016 by proto HE4 měl být používán buď samostatně nebo v kombinaci s dalšími diagnostickými metodami pro detekci ovariálních nádorů, CA-125 by měl být používán především pro sledování odpovědi na chemoterapii (Sölétormos G. *et al.*, 2016). Důležitou součástí charakterizace ovariálních nádorů je stanovení histologického typu. Podle původu jsou nádory vaječníků rozlišovány na nádory neepitelové a epitelové; v obou případech se jedná o velmi heterogenní skupinu. Mezi nádory neepitelového původu patří nádory ze zárodečných buněk, gonadostromální nádory a řada dalších. V dospělé populaci

tvoří neepitelové nádory pouze malou část ze zhoubných tumorů vaječníků, u dětí a mladých žen jsou častější (Cibula D. *et* Petruželka L., 2009; Colombo N. *et al.*, 2012). V nedávné studii bylo zjištěno, že signifikantně vyšší riziko vzniku neepitelového ovariálního nádoru mají ženy narozené před 37. týdnem těhotenství, vliv věku matky při porodu však prokázán nebyl (Sieh W. *et al.*, 2014).

Epitelové nádory jsou mezi nádory vaječníků nejčastější, zároveň jsou nejčastěji diagnostikovány ženám po menopauze. Řadí se mezi ně benigní, maligní i tzv. border line nádory. Border line nádory jsou označovány jako nádory s hraniční malignitou. Jedná se o neinvazivní tumory, jejichž prognóza je ve srovnání s invazivními karcinomy výrazně lepší (Cibula D. *et* Petruželka L., 2009). Přežití pacientek s vyššími stádii border line ovariálních nádorů je horší než v běžné populaci (Hannibal C.G. *et al.*, 2014), avšak i tak je prognóza příznivá a zákroky zachovávající možnost pacientky v budoucnu otěhotnět nenesou vyšší riziko relapsu (Helpman L. *et al.*, 2015). Mezi faktory zvyšující riziko vzniku border line nádoru zejména serózního typu patří zánětlivé onemocnění v pánevní oblasti. Vliv zánětu na riziko vzniku karcinomu vaječníků překvapivě zjištěn nebyl (Rasmussen C.B. *et al.*, 2017). Naopak endometrióza, která zvyšuje riziko vzniku některých typů karcinomu vaječníků, riziko vzniku border line nádorů nezvyšuje (Pearce C.L. *et al.*, 2012).

Karcinomy vaječníků (EOC, z angl. epithelial ovarian cancer) tvoří 80 – 90 % ze zhoubných ovariálních nádorů; 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 a rizikovými faktory. Rozdílná je i prognóza pacientek s jednotlivými typy karcinomů; zhoršuje se v řadě mucinózní, endometroidní, serózní, světlobuněčný a nediferencovaný karcinom (Cibula D. *et* Petruželka L., 2009). Vůbec nejčastějším typem je pak tzv. high-grade serózní karcinom (HGSC, tedy serózní karcinom se stupněm diference nádorových buněk 2/3), který tvoří přibližně 70 % ze všech případů EOC. HGSC jsou charakterizovány vysokou proliferací a inaktivací proteinů p53 (kódován genem *TP53*) a BRCA1. Ačkoliv je primární nádor většinou senzitivní vůči podané chemoterapii, často dochází k relapsu onemocnění a rozvoji chemorezistence, což zhoršuje prognózu pacientek (Prat J., 2012).

V případě maligních nádorů vaječníků epitelového i neepitelového původu i border line nádorů následuje stanovení klinického stádia onemocnění, tzv. staging, který je klíčový pro zvolení vhodného léčebného postupu. Podle mezinárodního doporučení FIGO (Federation of International Gynaecologists and Obstetricians) je stanoven rozsah onemocnění, tzn. je

určen stage a TNM kategorie nádoru (tab. 1). TNM klasifikace zahrnuje velikost primárního nádoru (T), rozsah postižení lymfatických uzlin (N) a přítomnost vzdálených metastáz (M; Cibula D. *et* Petruželka L., 2009). Kromě těchto charakteristik je určen také grade nádoru (1 – 3), který odpovídá stupni diferenciaci nádorových buněk.

Tab. 1: Souhrn TNM a FIGO klasifikací zhoubných nádorů ovaria (Cibula D. *et* Petruželka L., 2009).

TNM		FIGO
T1	postižení ovaria/ovarií	I
T1a	postižení jednoho ovaria, pouzdro intaktní, bez nádoru na povrchu ovaria, negativita ascitu nebo laváže	IA
T1b	postižení obou ovarii, dále jako T1a	IB
T1c	postižení jednoho nebo obou ovarii + ruptura pouzdra / nádor na povrchu, pozitivita ascitu nebo laváže	IC
T2	šíření nádoru v pánvi	II
T2a	šíření na dělohu/tubu, negativita ascitu nebo laváže	IIA
T2b	šíření na jiné pánevní tkáně, negativita ascitu nebo laváže	IIB
T2c	šíření na dělohu/tubu/jiné pánevní tkáně, pozitivita ascitu nebo laváže	IIC
T3	peritoneální metastázy mimo pánev	III
T3a	mikroskopické peritoneální metastázy mimo pánev	IIIA
T3b	makroskopické metastázy mimo pánev ≤ 2 cm	IIIB
T3c	makroskopické metastázy mimo pánev > 2 cm	IIIC
T4	vzdálené metastázy	IV
N1	postižení pánevních a/nebo paraaortálních lymfatických uzlin	IIIC
M1	vzdálené metastázy	IV

1.1.1.3. Terapie nádorů vaječníků

Léčebný postup je u nádorů vaječníků volen podle rozsahu onemocnění, který je stanoven na základě předoperačních vyšetření a biopsie. 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 však nejprve indikována neoadjuvantní chemoterapie (nejčastější je opět kombinace karboplatiny a paklitaxelu) následovaná operací. Další postup je volen podle úspěšnosti primární terapie a podle stavu pacientky (www.onkogyneologie.com).

Karboplatina, podobně jako cisplatina a další platinová léčiva, vytváří kovalentní adukty s DNA cílových buněk a blokuje proliferaci, což vede k apoptóze (např. v Dasari S. *et Tchounwou P.B.*, 2014). Oproti tomu paklitaxel působí jako tzv. mitotický jed. Vazbou na tubulin zabraňuje depolymerizaci mikrotubulů na volný tubulin a inhibuje tak mitózu cílových buněk (Dumontet C. *et Jordan M.A.*, 2010). Kromě toho také v buňkách indukují apoptózu (Ofir R. *et al.*, 2002). Největšími problémy protinádorové terapie založené na karboplatině a paklitaxelu je jejich toxicita vůči zdravým tkáním a chemorezistence, která snižuje účinnost léčby (Dumontet C. *et Jordan M.A.*, 2010; Kelland L., 2007).

Terapeutický postup doporučený předními odborníky v oblasti onkogynekologie vychází ze současných poznatků založených na odborných studiích. Bylo ukázáno, že účinek chemoterapie založené na paklitaxelu a platinovém derivátu je signifikantně lepší než chemoterapie obsahující paklitaxel a cyklofosfamid (Piccart M.J. *et al.*, 2000). Z porovnání kombinace cisplatiny nebo karboplatiny s paklitaxelem pak vyplývá, že účinek těchto terapeutických režimů je srovnatelný, avšak karboplatina je lépe tolerována a zlepšuje kvalitu života pacientek (du Bois A. *et al.*, 2003). Kombinace karboplatiny a paklitaxelu je tedy dnes indikována jako standard v léčbě ovariálního karcinomu. Burger R.A. *et al.* (2011) ukázali, že přídavek bevacizumabu ke standardnímu chemoterapeutickému režimu prodlužuje dobu do progresu onemocnění, neprodlužuje však celkovou dobu přežití. Stejně tak přídavek gemcitabinu, topotekanu nebo doxorubicinu nemá na celkovou dobu přežití vliv (Bookman M.A. *et al.*, 2009). Tyto látky jsou proto využívány spíše při léčbě recidivy. Po ukončení primární terapie jsou pacientky s nádory vaječníků dále sledovány. V České republice probíhají kontroly nejprve každé 3 měsíce první 3 roky, poté každých 6 měsíců další dva roky a následně jedenkrát ročně. Kontroly zahrnují komplexní gynekologické vyšetření a stanovení koncentrace markeru CA-125. V případě obtíží je indikováno ultrazvukové nebo jiné vyšetření (Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009).

U většiny pacientek diagnostikovaných v pokročilém stádiu dojde po primární terapii k recidivě onemocnění (Jayson G.C. *et al.*, 2014). Jestliže k progresi nebo návratu onemocnění dojde po více než šesti měsících po ukončení primární chemoterapie, nádor je hodnocen jako chemosenzitivní. V případě pacientek s nádorem senzitivním vůči platinovým léčivům je doporučeno podat jako sekundární chemoterapii opět kombinaci karboplatiny s paklitaxelem, protože oproti monoterapii založené na paklitaxelu prodlužuje dobu přežití pacientek (ICON and AGO Collaborators, 2003). Dobrých výsledků je dosaženo také kombinací karboplatiny s gemcitabinem, případně i s bevacizumabem

(Aghajanian C. *et al.*, 2012). Pozitivní efekt bevacizumabu v kombinaci s jinými látkami (paklitaxel, doxorubicin, topotecan) byl ukázán také u nádorů rezistentních vůči platinovým léčivům (Pujade-Lauraine E. *et al.*, 2014).

1.1.1.4. Metastatické šíření nádorů vaječníků

Jak již bylo zmíněno, ve více než 60 % případů jsou nádory vaječníků diagnostikovány v pokročilém stádiu. Tato stádia jsou již charakterizována přítomností metastáz, které mohou být lokalizovány v dutině břišní (FIGO stage III) nebo ve vzdálených orgánech – nejčastěji v parenchymu jater, v plicích nebo pleuře (FIGO stage IV; viz tab. 1, s. 14; Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009). Rozvoj metastáz je přitom příčinou 90 % úmrtí spojených s nádorovými onemocněními (Chaffer C.L. *et Weinberg R.A.*, 2011).

Buňky nádoru vaječníků se mohou šířit pasivním intraperitoneálním rozsevem, krevním řečištěm nebo mízními uzlinami (Nakayama K. *et al.*, 2012). Vzdálené metastázy se u nádorů vaječníků vyskytují méně často než metastázy v dutině břišní, což vedlo v řadě prací k závěru, že buňky ovariálních nádorů se šíří do okolních tkání pasivně a že hematogenní rozsev se u nádorů vaječníků neuplatňuje (Coffman L.G. *et al.*, 2016; Nakayama K. *et al.*, 2012). Tuto teorii podporovaly také výsledky studií, které zjistily, že genetické profily primárních ovariálních nádorů a jejich metastáz jsou si podobné (Yeung T.L. *et al.*, 2015). V posledních letech však řada prací prokázala, že hematogenní rozsev hraje u nádorů vaječníků významnou roli (Coffman L.G. *et al.*, 2016; Pradeep S. *et al.*, 2014).

Při pasivním rozsevu jsou buňky uvolněny z nádoru a pohybem ascitické tekutiny jsou transportovány k dalším orgánům v dutině břišní. Hematogenní šíření zahrnuje vstup nádorových buněk do krevního řečiště, jejich transport a uvolnění v místě vzniku metastázy. V obou případech je nejčastěji napadeno omentum, což potvrzuje hypotézu o vzájemné kompatibilitě místa primárního nádoru a tkáně, v níž daný nádor preferenčně tvoří metastázy (tzv. seed-and-soil hypotéza). Z omenta se pak nádorové buňky mohou šířit do dalších orgánů v břišní dutině (Yeung T.L. *et al.*, 2015).

Pro pasivní i hematogenní rozsev je klíčový proces epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT; Yeung T.L. *et al.*, 2015), při kterém jsou buňky epitelu odděleny od bazální membrány, získávají vlastnosti mezenchymálních buněk a zvyšují se jejich adhezni

schopnosti a pohyblivost. Za marker EMT je považována ztráta E-cadherinu, který je v buňkách epitelu důležitý pro buněčnou adhezi (Nakayama K. *et al.*, 2012).

Přítomnost metastáz v době diagnózy je spolu s celkovým stavem pacientky a objemem reziduálního nádoru po operaci klíčovým faktorem pro prognózu nádorů v pokročilém stádiu (Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009). 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

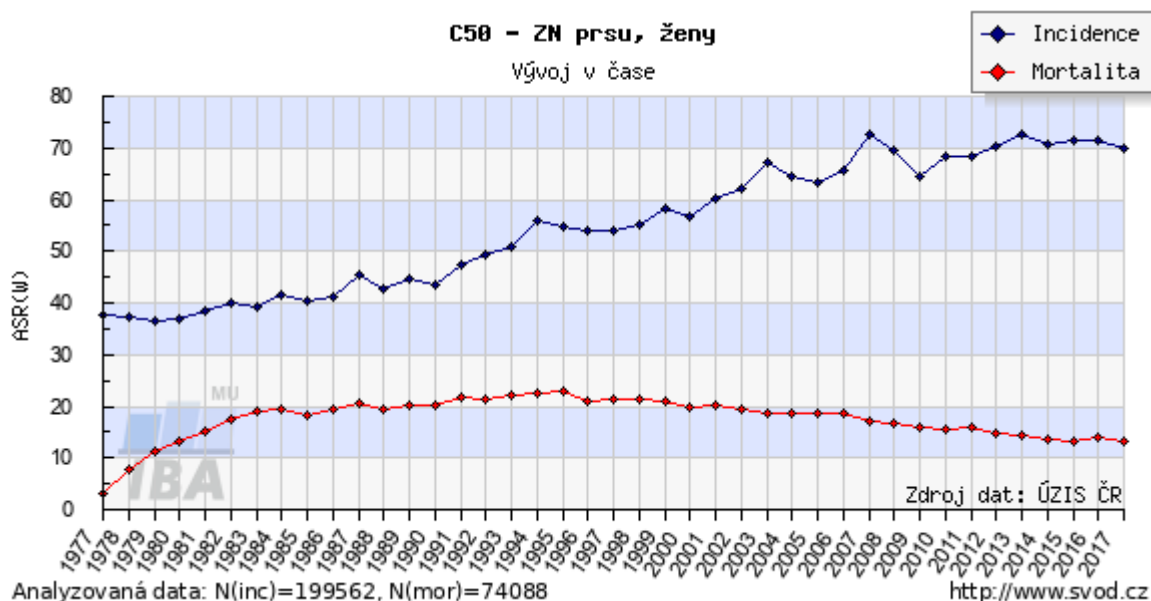
1.1.2.1. Epidemiologie a rizikové faktory nádorů prsu

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 (Ferlay J. *et al.*, 2015; Skovajsová M. *et al.*, 2014).

Významný vliv na snižování úmrtnosti na karcinom prsu mají preventivní mamografická vyšetření. Již od poloviny 90. let 20. století začal v České republice tzv. neorganizovaný screening, od roku 2002 pak byl zaveden Národní program screeningu karcinomu prsu. Od konce 90. let je proto patrný vzestup incidence, ovšem mortalita postupně klesá (obr. 3, s. 18). U žen, které přicházejí na preventivní vyšetření, se zvýšil podíl nádorů zachycených v časných stádiích, která jsou spojena s lepší prognózou a výrazně nižší úmrtností. Časná stádia rovněž vyžadují nižší náklady na léčbu (Skovajsová M. *et al.*, 2014). Nádory prsu se však nevyskytují pouze u žen, incidence tohoto onemocnění v posledních letech stoupá také u mužů. I tak ale nádory prsu u mužů představují méně než 1 % z celkového počtu diagnostikovaných nádorů prsu (Yalaza M *et al.*, 2016).

Mezi rizikové faktory vzniku karcinomu prsu patří genetická predispozice stejně jako řada faktorů životního stylu a prostředí. Výrazně vyšší riziko vzniku prsního karcinomu mají oproti běžné populaci nosiči mutace v genech *BRCA1* a nebo *BRCA2* (viz kap. 1.1.1.1., s. 9 – 11). Ženy s touto mutací mají navíc vyšší riziko vzniku kontralaterálního nádoru; riziko je tím vyšší, čím je nižší věk pacientky v době diagnózy (Malone K.E. *et al.*, 2010). Signifikantního snížení úmrtnosti pacientek na nádory prsu je však možné dosáhnout preventivní kontralaterální mastektomií (Metcalf K. *et al.*, 2014). U mužů patří mezi nejvýznamnější rizikové faktory věk, obezita a předchozí expozice radiaci, riziko

významně zvyšují také nádor prsu v rodinné anamnéze nebo mutace v genu *BRCA2* (Yalaza M *et al.*, 2016).



Obr. 3: Věkově standardizovaná incidence a mortalita na zhoubné nádory prsu u žen v České republice v letech 1977 – 2017 (www.svod.cz).

Řada studií prokázala, že významnými karcinogeny nádorů prsu jsou pohlavní hormony, zejména estrogeny (např. Yager J.D. *et Davidson* N.E., 2006). V souvislosti s hladinou pohlavních hormonů jsou za rizikové faktory považovány věk při menarche, věk při menopauze, počet těhotenství a věk při prvním těhotenství ženy, které však není možné výrazně ovlivnit. Oproti tomu je významným faktorem zvyšujícím riziko vzniku nádorů prsu obezita; bylo ukázáno, že s obezitou souvisí zvýšená hladina estrogenů v krvi, což má za následek vyšší riziko vzniku nádorů prsu. Prevence obezity by tedy mohla významně přispět ke snížení incidence a mortality zhoubných nádorů prsu (Dartois L. *et al.*, 2016; Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, 2003).

Předmětem řady studií je také vliv hormonálních preparátů na vznik karcinomu prsu. Výsledky prací zabývajících se vlivem hormonální antikoncepce jsou nejednotné, avšak podle nejnovějších publikací nemá její užívání na riziko vzniku karcinomu prsu žádný vliv (Hunter D.J. *et al.*, 2010; Kahlenborn C. *et al.*, 2006; Phipps A.I. *et al.*, 2011; Vessey M. *et Yeates* D., 2013). Užívání hormonální terapie oproti tomu zvyšuje riziko vzniku nádorů prsu, avšak jeho vliv se liší podle rasy, tělesné hmotnosti a denzity prsní tkáně. V

černošské populaci, u žen s nadváhou nebo obezitou a s nízkou denzitou prsu se riziko vzniku nádoru nezvyšuje (Hou N. *et al.*, 2013). Zajímavé je, že protektivní efekt fyzické aktivity, prokázaný v nedávno publikované meta-analýze, je u žen, které užívaly hormonální terapii, potlačen (Pizot C. *et al.*, 2016).

Rostlinnými analogy estrogenů jsou isoflavonoidy, zejména genistein, hojně se vyskytující v sójových bobech. Vliv příjmu genisteinu na prognózu pacientek s nádory prsu je předmětem výzkumu (Allred C.D. *et al.*, 2001; Nechuta S.J. *et al.*, 2012), stejně jako vliv polyfenolů obsažených v čaji na riziko vzniku karcinomu prsu (Sun C.L. *et al.*, 2006). Kromě toho bylo publikováno, že riziko karcinomu prsu se zvyšuje s vyšším příjmem alkoholu – efekt byl prokázán u nádorů exprimujících receptor lidského epidermálního růstového faktoru HER2 (z angl. human epidermal growth factor receptor 2; Gago-Dominguez M. *et al.*, 2016). Také kouření přispívá ke vzniku nádorů prsu. Riziko se zvyšuje zejména u žen, které začaly kouřit před prvním porodem (Gaudet M.M. *et al.*, 2013).

1.1.2.2. Diagnostika a klasifikace nádorů prsu

Zhoubné nádory i nezhoubná onemocnění prsu se ve většině případů projevují přítomností rezistence v prsní tkáni, případně bolestí nebo výtokem z bradavky. Díky tomu hraje v záchytu nádorů prsu velkou roli samovyšetření pacientek nebo klinické vyšetření v rámci gynekologické prohlídky (Strnad P. *et Daneš J.*, 2001). Mezi zobrazovacími metodami má největší význam mamograf, tedy radiodiagnostické vyšetření, které je v České republice v rámci screeningu určeno ženám od 45 let (Skovajsová M. *et al.*, 2014). Mladší ženy jsou v případě potřeby vyšetřeny ultrazvukem. Při podezření na nádor prsu je provedena biopsie; pozitivní výsledek spolu s nálezy z předchozích vyšetření potvrzuje diagnózu a umožňuje tak zahájit léčbu pacientky (Strnad P. *et Daneš J.*, 2001).

Kromě již zmíněných vyšetření je v diagnostice nádorů prsu využíváno také stanovení sérových markerů, zejména proteinů CA 15-3 a CEA (z angl. carcinoembryonic antigen), z nichž je CA 15-3 citlivější (Guadagni F. *et al.*, 2001). Hladina antigenu CA15-3 koreluje se stádiem onemocnění, avšak pro detekci časných stádií není toto stanovení dostatečně citlivé. Vyšší citlivost vykazuje CA 15-3 jako marker odpovědi pacientek na terapii (Guadagni F. *et al.*, 2001). Může tak sloužit pro časný záchyt relapsu nebo vzniku metastáz (Kallioniemi O.P. *et al.*, 1988; Safi F. *et al.*, 1991).

Nádory prsu jsou většinou nezhooubné, nejčastěji se jedná o cysty nebo fibroadenomy, které se nemohou šířit do okolních tkání a ani nepředstavují zvýšené riziko pozdějšího vzniku zhoubného nádoru. Rovněž karcinomy *in situ* nemají schopnost tvořit vzdálené metastázy, avšak pokud by nebyla včas zahájena léčba, může se tento typ nádoru změnit na invazivní, zhoubný nádor. Podle tkáně, ze které nádor vzniká, jsou karcinomy *in situ* rozlišovány na nádory duktální a lobulární, které tvoří 15 – 30 %, resp. 10 – 15 % všech maligních onemocnění prsu. Invazivní karcinomy jsou opět rozlišovány na nádory duktální a lobulární, kromě toho však existuje i řada méně častých typů (např. tubulární, medulární, mucinózní). Invazivní duktální nádor je nejčastějším typem zhoubných nádorů prsu, tvoří 70 – 85 % případů. Lobulární karcinom představuje 10 – 14 % (Strnad P. *et* Daneš J., 2001).

Kromě typu tkáně, ze které nádor vznikl, je pro klasifikaci karcinomu prsu důležitý také genetický profil nádorových buněk. Jednotlivé typy se liší na molekulární úrovni; 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). V současné době je prosazován přechod od generalizovaných terapeutických postupů k personalizované terapii.

1.1.2.3. Terapie nádorů prsu

Standardem pro léčbu karcinomu prsu je chirurgické odstranění nádoru. Radikalita operace závisí na stádiu onemocnění; u časných stádií je preferován zákrok se zachováním prsu. V současné době tvoří konzervativní operace více než 60 % zákroků (Kummerow, K.L. *et al.*, 2015). Agarwal S. *et al.* (2014) ukázali, že pacientky s časným stádiem nádoru prsu, které podstoupily konzervativní zákrok, mají signifikantně vyšší úroveň pětiletého i desetiletého přežití než pacientky, které podstoupily mastektomii, případně mastektomii v kombinaci s radioterapií. Tento trend však doposud nebyl vysvětlen.

Na rozdíl od jiných nádorů se mohou buňky karcinomu prsu šířit a vytvářet časně metastázy již v preinvazivních stádiích onemocnění (Hüsemann Y. *et al.*, 2008). Po operaci proto často následuje radioterapie anebo chemoterapie, jejímž cílem je eliminovat nádorové buňky, které není možné odstranit chirurgickým výkonem. Volba terapeutického

režimu záleží na molekulárním subtypu a menopauzálním statutu pacientky; základní typy jsou, spolu s doporučenými režimy adjuvantní terapie, uvedeny v tabulce 2 (Coates A.S. *et al.*, 2015).

Tab. 2: Doporučené adjuvantní terapie podle molekulárních subtypů nádorů prsu (podle Coates A.S. *et al.*, 2015).

Molekulární subtyp	Terapeutický režim
ER-, PR-, HER2- (triple negativní)	chemoterapie (antracyklin + taxan, u pacientek s mutací v genech <i>BRC1</i> také platinové deriváty)
ER-, PR-, HER2+	chemoterapie (antracyklin, taxan, trastuzumab)
ER+, PR+, HER2+	chemoterapie (antracyklin, taxan, trastuzumab) spolu s hormonální terapií (v závislosti na menopauzálním statutu pacientky)
ER+, PR+, HER2-	hormonální terapie v závislosti na menopauzálním statutu pacientky (tamoxifen), případně spolu s chemoterapií

U nádorů exprimujících estrogení receptor by podle doporučení mezinárodní komise měla být použita hormonální léčba (Coates A.S. *et al.*, 2015; Goldhirsch A. *et al.*, 2009). Nejvýznamnějším modulátorem ER je tamoxifen, který způsobuje akumulaci buněk v G1 fázi buněčného cyklu a inhibuje tak proliferaci (Osborne C.K. *et al.*, 1983). U nádorů s vysokou expresí HER2 se uplatňuje cílená biologická léčba. Trastuzumab, monoklonální protilátka proti HER2, vazbou na receptor inhibuje signální dráhy, čímž dochází k potlačení proliferace (např. v Hudis C.A., 2007). Nejobtížněji léčitelnou skupinou jsou pacientky s tzv. triple negativním nádorem, který neexprimuje ani jeden ze zmíněných hormonálních receptorů a u něhož tudíž není možné použít léčbu cílící na tyto receptory. V případě nádorů, které neexprimují hormonální receptory, by o nasazení chemoterapie mělo být rozhodnuto na základě genového profilu nádoru (Coates A.S. *et al.*, 2015; Goldhirsch A. *et al.*, 2009).

I u původně operabilního nádoru může časem dojít k relapsu a vzniku metastatického onemocnění. Metastázy se nejčastěji tvoří v plicích, pleuře, játrech, kostech a mozku, v lymfatických uzlinách a na kůži. Pacientkám může být podána hormonální terapie (např. tamoxifen nebo inhibitory aromatázy) i chemoterapie (např. paklitaxel nebo cyklofosfamid v kombinaci s epirubicinem), v některých případech je aplikována cílená biologická léčba

nebo radioterapie. Metastatické onemocnění sice není současnými metodami možné vyléčit, avšak 20 % pacientek přežívá déle než pět let. Udržení kvality života je tedy i u těchto pacientek velice důležité (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, které by mohly vést ke vzniku nádorového onemocnění, 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 pacienta, tj. abstinence kouření, omezení konzumace alkoholu, správné stravovací návyky, udržování optimální tělesné hmotnosti a pravidelná pohybová aktivita, ochrana před expozicí karcinogenům, bezpečné sexuální chování (Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009; Fait T. *et al.*, 2011). Výjimečné postavení mezi onkologickými nemocemi mají nádory děložního hrdla, které jsou prakticky ve všech případech vyvolány infekcí HPV (z angl. human papillomavirus); v primární prevenci tohoto typu nádorů se proto významně uplatňuje očkování (Lowy D.R., 2016). Specifická primární prevence je možná také u pacientek s mutacemi v genech *BRCA1/2*, jimž je preventivně indikována ovariectomie nebo mastektomie (Metcalfé K.A. *et al.*, 2005; Metcalfé K. *et al.*, 2014). U žen s mutacemi v genech *BRCA1/2* před menopauzou byl prokázán také protektivní efekt užívání tamoxifenu (Narod S.A., 2010).

Sekundární prevence se týká záchytu nádorů ve stádiu prekanceróz, případně v časných stádiích invazivního nádoru; jejím cílem tedy je omezení rozvoje onemocnění a snížení úmrtnosti. Důležitými nástroji sekundární prevence jsou jednak pozornost pacienta zaměřená na varovné známky, které by mohly znamenat přítomnost nádoru (tj. např. hmatné bulky, změny ve vylučování moči nebo stolice, neobvyklá bolest nebo nevysvětlitelný úbytek hmotnosti), a jednak 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 a také u cervikálních a kolorektálních nádorů již byl screeningový program, který významně snižuje mortalitu, 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 zachytu 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 předcházet důsledkům progredujícího nádoru na lidský organismus, ale také na celkovou kvalitu jeho života (Cibula D. *et Petruželka L.*, 2009; Fait T. *et al.*, 2011).

V terciární a kvartérní prevenci pacientů s nádorovými onemocněními 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 v současnosti 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).

Nové biomarkery se tradičně hledají mezi geny a proteiny, jejichž exprese je v nádorové tkáni nebo krvi pacientů deregulována, avšak významnými biomarkery mohou být také nekódující molekuly RNA; krátké miRNA (z angl. micro-RNA) a dlouhé lncRNA (z angl. long non-coding RNA), které se podílejí na regulaci genové exprese na transkripční i post-transkripční úrovni (Qi P. *et Du X.*, 2013; Liz J. *et Esteller M.*, 2016). V nedávných pracích bylo ukázáno, že exprese specifických miRNA a lncRNA může souviset s proliferací (Kobayashi M. *et al.*, 2014; Qiu J.J. *et al.*, 2015), s metastatickým potenciálem (Qiu J.J. *et al.*, 2014) nebo s chemorezistencí nádorových buněk (Vecchione A. *et al.*, 2013). Stále větší význam v diagnostice a při monitorování průběhu terapie pak získávají

také nádorové buňky (CTC, z angl. circulating tumor cells) a volná nádorová DNA (cfDNA, z angl. cell-free DNA) cirkulující v krvi pacientů. Cirkulující nádorové buňky jsou schopné vytvářet vzdálené metastázy (Baccelli I. *et al.*, 2013) a jejich počet pozitivně koreluje s kratším přežíváním (Kuboki Y. *et al.*, 2013). Analýzou CTC a cfDNA je také možné detekovat markery chemorezistence (Kolostova K. *et al.*, 2015; Murtaza M. *et al.*, 2013).

V odborné literatuře je každý rok publikováno velké množství článků s tematikou nádorových markerů. Část z nich se věnuje již zavedeným markerům, řada prací se však zabývá výzkumem nových potenciálních diagnostických i prognostických markerů. Jen malá část nově nalezených biomarkerů je validována pro využití v klinické praxi, avšak jejich význam v prevenci progresu a v managementu pacientů s nádorovými onemocněními je nezanedbatelný. Je proto potřeba věnovat pozornost všem fázím základního výzkumu, analytické a klinické validaci i dalším krokům, které jsou nezbytné pro uvedení nového biomarkeru do praxe (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.

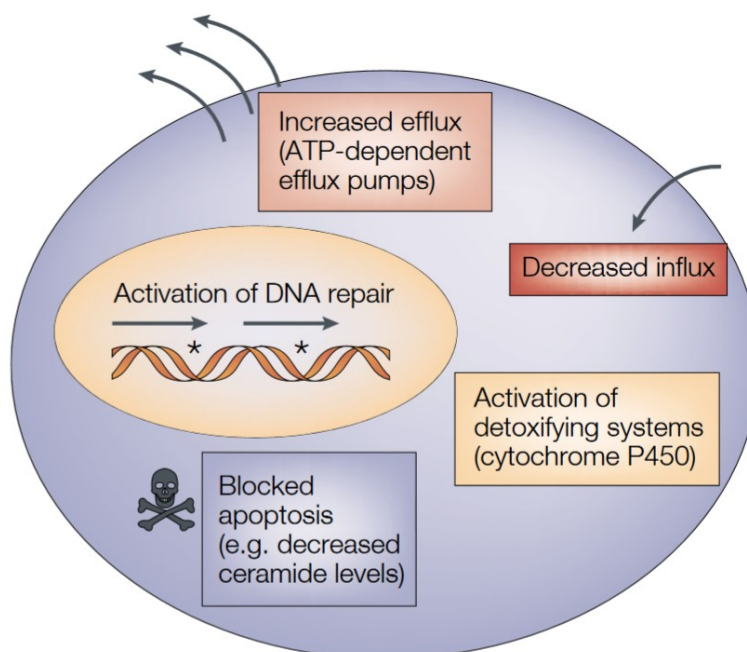
Výzkum nových potenciálních biomarkerů se zaměřuje na procesy, které jsou pro nádorové buňky klíčové, které jim umožňují přežít a šířit se. Jedná se především o procesy související s transportem endogenních látek a xenobiotik, s metabolismem protinádorových léčiv, s proliferací a regulací buněčného cyklu a s řadou dalších regulačních procesů. Jednotlivé procesy, resp. významné geny a proteiny, kterými se zabývala tato práce, jsou popsány v následujících kapitolách (kap. 1.3.1. – 1.3.4., s. 24 – 35).

1.3.1. Transport v nádorových buňkách

Buněčný transport je důležitý pro všechny živé buňky. 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 studovaný 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 (obr. 4, s. 25). V souvislosti se sníženým příjmem jsou studovány SLC (z angl. solute carrier) transportéry (Januchowski R. *et al.*, 2014; Kalayda G.V. *et al.*,

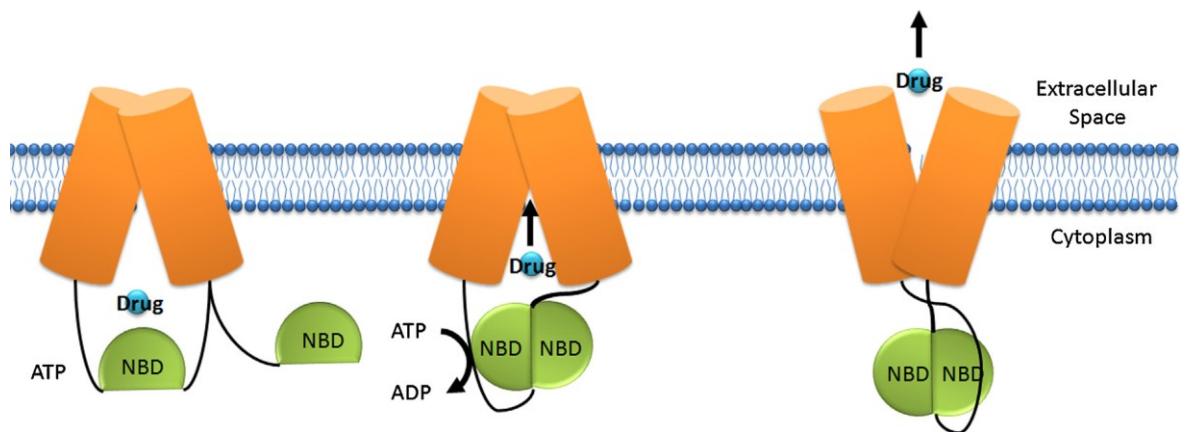
2012), zvýšený eflux může být zprostředkován ATP-dependentními transportéry z rodiny ABC (z angl. ATP-binding cassette; Auner V. *et al.*, 2010; Gottesman M.M. *et al.*, 2002) nebo ATPázami typu P (Moreno-Smith M. *et al.*, 2013; Samimi G. *et al.*, 2004). Existují však i jiné mechanismy lékové rezistence, než je změna v hladině exprese membránových transportérů. Jedná se především o aktivaci detoxikačních enzymů, aktivaci opravy DNA a inhibici apoptózy (obr. 4). Tyto mechanismy jsou popsány v kapitolách 1.3.2. – 1.3.3. (s. 31 – 33).



Obr. 4: Buněčné mechanismy, které přispívají ke vzniku lékové rezistence (převzato z Gottesman M.M. *et al.*, 2002).

1.3.1.1. ABC transportéry

ABC transportéry patří spolu s dalšími ATPázami mezi primární membránové transportéry. K přenosu látek přes membránu proti koncentračnímu gradientu využívají energii uvolněnou hydrolýzou ATP. V bakteriích existují ABC transportéry pro oba směry přenosu, v eukaryotních buňkách však fungují téměř výhradně jako exportéry. Jejich struktura je většinou tvořena dvěma doménami vázajícími nukleotidy (NBD, z angl. nucleotide-binding domain) a dvěma transmembránovými doménami (obr. 5, s. 26). Struktura místa pro vazbu ATP v NBD je silně konzervovaná (Wilkens S., 2015).



Obr. 5: Schématické znázornění mechanismu přenosu látek přes membránu zprostředkovaného ABC transportérem. Substrát, např. léčivo, je rozeznán transmembránovou doménou. Dochází k dimerizaci NBD, následné hydrolýze ATP a konformační změně proteinu, která umožňuje uvolnění substrátu do extracelulárního prostoru (převzato z Ween M.P. *et al.*, 2015).

V lidských buňkách existuje 49 různých ABC transportérů, které jsou na základě fylogenetických znaků rozděleny do sedmi rodin (A – G; Vasiliou V. *et al.*, 2009). ABC proteiny mohou transportovat širokou škálu látek; mezi jejich substráty patří ionty kovů, lipidy a steroidní látky, peptidy a další endogenní molekuly, ale také léčiva a jejich metabolity. Uplatňují se tak v řadě buněčných procesů, avšak mohou hrát roli také v různých onemocněních (Vasiliou V. *et al.*, 2009) včetně zhoubných nádorů. V případě nádorů je pak studován zejména vliv ABC transportérů na rezistenci buněk vůči chemoterapeutikům a na výsledek terapie (Ween M.P. *et al.*, 2015).

Proteiny z rodiny ABCA jsou významnými transportéry lipidů, cholesterolu a lipoproteinových částic (Vasiliou V. *et al.*, 2009; Ween M.P. *et al.*, 2015). Nedávné studie ukazují, že změny v metabolismu lipidů jsou klíčové pro progresi nádorů vaječníků (Nieman K.M. *et al.*, 2011; Beloribi-Djefaflija S. *et al.*, 2016) a zároveň že zvýšená exprese genů ABCA1, ABCA6, ABCA8 a ABCA9 koreluje s kratším přežíváním pacientek s tímto onemocněním (Hedditch E.L. *et al.*, 2014). Deregulace ABCA transportérů je tedy, spolu se změnami v metabolismu lipidů, potenciálním cílem v terapii ovariálních nádorů.

Nejvýznamnějšími členy rodin ABCB a ABCG jsou transportéry ABCB1, resp. ABCG2, které se podílejí na eliminaci celé škály protinádorových léčiv a tím přispívají k lékové rezistenci (Gottesman M.M. *et al.*, 2002). U pacientek s karcinomem prsu koreluje nízká hladina genu ABCB1 s dobrou odpovědí na chemoterapii, vysoká hladina souvisí s kratší

dobou do progrese onemocnění (PFS, z angl. progression-free survival). Rovněž hladina ABCG2 může korelovat s výsledkem terapie (Burger H. *et al.*, 2003). Také v buněčných liniích karcinomu vaječníků bylo ukázáno, že ABCB1 a ABCG2 souvisí s rezistencí vůči léčivům (Eyre R. *et al.*, 2014; Januchowski R. *et al.*, 2014), avšak studie provedené na vzorcích tkání vztah mezi expresí těchto genů a chemorezistencí (Auner V. *et al.*, 2010) či prognózou (Hedditch E.L. *et al.*, 2014; Nakayama K. *et al.*, 2002) pacientek s nádory vaječníků neprokázaly.

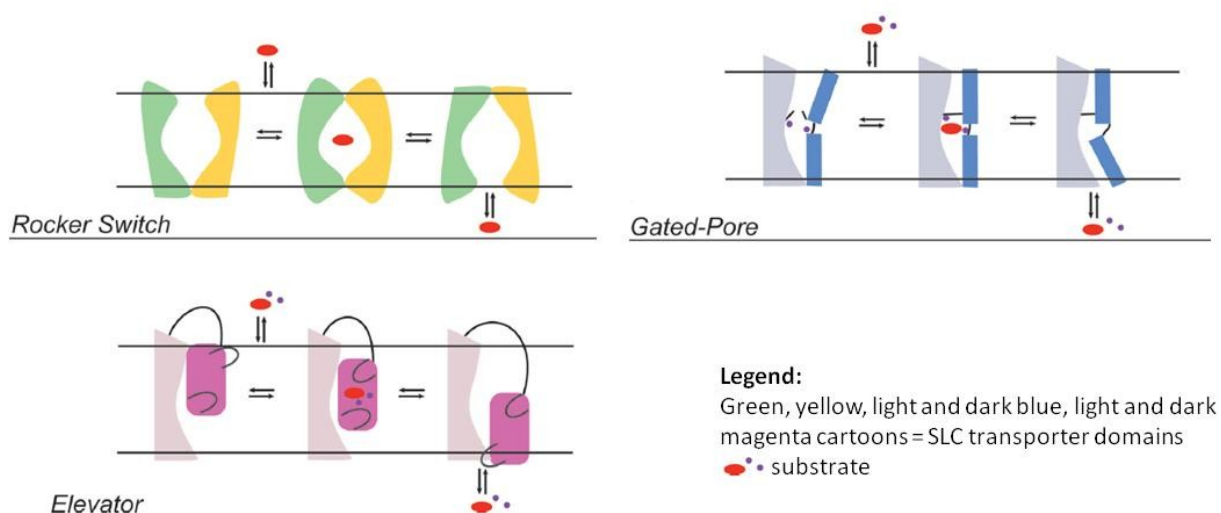
Rodina ABCC je také často spojována s výsledkem terapie nádorových onemocnění. Exprese transportéru ABCC1 je zvýšena u nádorů prsu (Hlaváč V. *et al.*, 2013) i vaječníků, oproti tomu hladina ABCC2 a ABCC3 se zvyšuje až při relapsu. Exprese těchto transportérů je tedy pravděpodobně indukována chemoterapií a může hrát roli v lékové rezistenci nádorů vaječníků (Auner V. *et al.*, 2010). Dále bylo zjištěno, že geny ABCC1 a ABCC3 jsou zvýšeně exprimovány u pacientek s primárními ovariálními nádory serózního typu s nepříznivou prognózou a že hladina ABCC1 negativně koreluje s PFS pacientek (Ohishi Y. *et al.*, 2002). Jiná studie však význam exprese genu ABCC1 pro prognózu karcinomu ovaria nepotvrdila (Nakayama K. *et al.*, 2002). U pacientek s nádory prsu exprese proteinu ABCC1 před neoadjuvantní chemoterapií (NACT) negativně ovlivňuje dobu do progrese onemocnění (Rudas M. *et al.*, 2003).

Rodiny ABCD – F jsou rovněž předmětem výzkumu, avšak v menší míře než transportéry z výše zmíněných rodin. U pacientek s karcinomem prsu léčených NACT je v nádorech oproti zdravé tkáni prsu zvýšena exprese genů ABCD1 a ABCD3 a naopak snížena exprese ABCD2 a ABCD4. Pacientky s vyšší hladinou ABCD2 navíc lépe odpovídají na NACT (Hlaváč V. *et al.*, 2013). Exprese ABCF2 je na genové i proteinové úrovni v porovnání se serózním typem zvýšena ve světlobuněčném typu ovariálních nádorů, koreluje také s horší odpovědí pacientek na terapii (Tsuda H. *et al.*, 2005).

Je zřejmé, že ABC transportéry hrají důležitou roli v karcinogenezi a mohou mít vliv na výsledek protinádorové terapie. Schopnost transportovat chemoterapeutika již byla zjištěna nejméně u 20 ABC proteinů, které se tak mohou podílet na lékové rezistenci nádorových buněk. ABC transportéry tedy představují atraktivní terapeutický cíl, avšak doposud nebyl do praxe uveden žádný nový lék, který by na některý z ABC transportérů cílil (Ween M.P. *et al.*, 2015). Výzkum mechanismu působení ABC transportérů v nádorových buňkách je proto stále potřebný.

1.3.1.2. SLC transportéry

Proteiny označované jako SLC transportéry představují velmi heterogenní skupinu. V současné době je známo 430 SLC transportérů, které jsou rozděleny do 52 rodin (Perland E. *et al.* Fredriksson R., 2017). Vzájemně se liší jak strukturou a substrátovou specifitou, tak mechanismem přenosu molekul přes membrány. Patří mezi ně aktivní transportéry i iontové kanály, mohou fungovat jako symportéry nebo jako antiportéry. Nejčastější typy mechanismu přenosu zprostředkovaného SLC transportéry jsou uvedeny na obr. 6. Společným rysem všech těchto typů je krajní konformace otevřená do vnějšího, resp. do vnitřního prostoru a uzavřený přechodný stav s navázaným substrátem (Colas C. *et al.*, 2016).



Obr. 6: Schématické znázornění nejčastějších typů mechanismu přenosu látek přes membránu zprostředkovaného SLC transportéry. *Rocker Switch*: substrát (červeně) je navázán do otevřené konformace transportéru a z obrácené konformace poté uvolněn do intracelulárního prostoru. *Gated-Pore*: jedna doména zůstává po vazbě substrátu nezměněna, zatímco druhá mění svou konformaci. *Elevator*: jedna doména opět zůstává nezměněna, zatímco transportní doména se s navázaným substrátem posunuje napříč membránou (převzato z Colas C. *et al.*, 2016).

SLC transportéry jsou lokalizovány v různých buněčných membránách včetně cytoplazmatické membrány. Mezi jejich substráty patří organické i anorganické molekuly (ionty, organické kyseliny, cukry, léčiva; Bhutia Y.D. *et al.*, 2016). Významně se tak podílejí na buněčných metabolických procesech (Colas C. *et al.*, 2016) a důležitou roli hrají také v nádorových buňkách (Bhutia Y.D. *et al.*, 2016). Vzhledem k pozměněnému

metabolismu nádorových buněk (Payen V.L. *et al.*, 2016; Porporato P.E. *et al.*, 2016) jsou studovány geny, resp. proteiny transportující glukózu a aminokyseliny a produkty jejich metabolismu (např. SLC2A1, SLC1A5, SLC16A1). Za tumor-supresor je však v současné době považován také SLC22A18, jehož fyziologická funkce není doposud známá (Bhutipia Y.D. *et al.*, 2016). Vyšší hladina proteinu SLC22A18 koreluje v tkáni nádorů prsu s lepší prognózou pacientek, exprese tohoto transportéru tak může sloužit jako prognostický marker karcinomu prsu (He H. *et al.*, 2011).

Více než funkce v metabolismu nádorových buněk je u SLC transportérů studována jejich úloha v rezistenci vůči chemoterapeutikům. V nedávné studii bylo ukázáno, že exprese genu SLC22A18 je v buněčné linii karcinomu vaječníků rezistentní vůči paklitaxelu, v porovnání se senzitivní linií, zvýšena. Z celkového počtu 350 studovaných SLC transportérů pak byla výraznější deregulace pozorována u devíti jiných genů (geny SLC2A9, SLC16A3, SLC16A14, SLC38A4 a SLC39A8 měly zvýšenou expresi, SLC2A14, SLC6A15, SLC8A1 a SLC27A2 měly sníženou expresi). Tyto geny tak mohou být důležité pro transport cytostatik do buněk, jejich význam v rezistenci však musí být teprve objasněn (Januchowski R. *et al.*, 2014). V jiné studii byla porovnáním nádorové tkáně vaječníků s kontrolami zjištěna vyšší exprese šesti a nižší exprese pěti genů SLC transportérů. Nižší expresi měly mj. i geny SLC16A14 a SLC39A8 (Nikolova D.N. *et al.*, 2009), které byly v pozdější studii (Januchowski R. *et al.*, 2014) spojovány s lékovou rezistencí.

Jedněmi z nejvíce studovaných SLC transportérů ve vztahu ke karcinogenezi a chemorezistenci jsou SLC31A1 a SLC31A2 (CTR1 a CTR2, z angl. copper transporter). Tyto proteiny se podílejí na udržení homeostázy mědi uvnitř buněk a v nádorových buňkách jsou spojovány především s transportem platinových léčiv (Liu J.J. *et al.*, 2012). V buněčné linii karcinomu ovarií bylo ukázáno, že transportér SLC31A1 je zodpovědný za příjem cisplatinu do buněk a že snížená exprese tohoto proteinu tedy vede k rezistenci nádorových buněk (Kalayda G.V. *et al.*, 2012). V jiné studii, provedené na buněčných liniích karcinomu ovaria a cervixu, byl rovněž ukázán vztah mezi expresí SLC31A1 a intracelulární koncentrací cisplatinu (Zisowsky J. *et al.*, 2007). V tkáni karcinomu ovaria byla v porovnání s normální ovariální tkání zjištěna snížená exprese obou genů SLC31A1 a SLC31A2. Nižší exprese SLC31A1 korelovala s kratším PFS, nejhorší prognózu pak měly pacientky s nízkou expresí SLC31A1 a vysokou expresí SLC31A2. Tyto pacientky

byly zároveň rezistentní vůči chemoterapii založené na platinových léčivech (Lee Y.Y. *et al.*, 2011).

Ačkoliv jsou SLC transportéry výrazně méně prozkoumány než ABC transportéry, řada z těchto proteinů patrně hraje důležitou roli v prognóze pacientů s nádorovými onemocněními. Jejich význam by proto měl být detailně studován.

1.3.1.3. ATPázy typu P

ATPázy typu P představují skupinu transmembránových proteinů, které využívají energii uvolněnou z ATP pro transport kationtů a lipidů. Uplatňují se v řadě fyziologických procesů; zajišťují buněčnou homeostázu kationtů a poskytují ionty kovů nezbytné pro funkci metaloproteinů, zprostředkovávají buněčnou signalizaci, udržují membránový elektrochemický gradient. Jejich struktura je tvořena třemi cytoplazmatickými a dvěma transmembránovými doménami, někdy může být přítomna i regulační doména (Kühlbrandt W., 2004; Palmgren M.G. *et Nissen P.*, 2011). Mechanismus přenosu látek přes membránu zprostředkovaný ATPázami typu P je uveden na obr. 7.



Obr. 7: Schématické znázornění mechanismu přenosu látek přes membránu zprostředkovaného ATPázami typu P. Substrát (světle modře) je navázán na enzym v základní konformaci (E_1). Po rozštěpení ATP dochází k fosforylaci jedné z cytoplazmatických jednotek proteinu a ke změně konformace (E_2). Defosforylace a návrat do základního stavu nastává po navázání druhého substrátu (oranžově; převzato z Palmgren M.G. *et Nissen P.*, 2011).

ATPázy typu P jsou rozděleny do pěti rodin (P1 – P5), které se liší fylogenetickými znaky a také substrátovou specifitou. Rodiny P2 a P4 transportují dva substráty, avšak u některých rodin je mechanismus modifikován; rodiny P1B a P3 přenášejí pouze jeden substrát. U zbývajících rodin nebyl substrát doposud identifikován (Palmgren M.G. *et Nissen P.*, 2011).

Významnými členy rodiny P1B jsou ATPázy ATP7A a ATP7B transportující měď. Mutace v genech kódujících tyto transportéry může vést k závažným vývojovým a metabolickým onemocněním (Lutsenko S. *et al.*, 2007), avšak řada prací ukazuje, že ATP7A a ATP7B mohou přenášet i platinová léčiva a tedy že jsou významné pro rozvoj lékové rezistence v nádorových buňkách. V buněčné linii ovariálního karcinomu rezistentní vůči cisplatině byla v porovnání se senzitivní linií pozorována zvýšená hladina ATP7A (Zisowsky J. *et al.*, 2007). Samimi G. *et al.* (2004) opačným přístupem ukázali, že indukce exprese genu ATP7A vede v ovariálních nádorových buňkách ke zvýšení rezistence vůči platinovým léčivům. U pacientek s karcinomem ovaria léčených cisplatinou byl zjištěn rozdíl v hladině exprese genu ATP7B v nádorech s nízkým a vysokým stupněm diferenciací. Vyšší míra exprese ATP7B navíc korelovala s horší prognózou (Nakayama K. *et al.*, 2002). Transportér ATP7B v cytoplazmě interaguje s proteinem ATOX1, u něhož byla prokázána schopnost vázat cisplatinu. Zvýšené vychytávání platinových léčiv proteinem ATOX1 tedy může blokovat vazbu léčiva na DNA a tím také přispívat k rezistenci nádorových buněk (Palm M.E. *et al.*, 2011).

Rodina P4 je fylogeneticky odlišná od ostatních rodin ATPáz typu P. Její členové přenášejí fosfolipidy a účastní se formování sekrečních váčků (Palmgren M.G. *et Nissen P.*, 2011). U genu ATP11B však byl také ukázán vztah s rezistencí ovariálních nádorových buněk. V nádorové ovariální tkáni navíc exprese ATP11B korelovala s vyšším stupněm diferenciací nádorových buněk (Moreno-Smith M. *et al.*, 2013).

1.3.2. Metabolismus léčiv v nádorových buňkách

Chemoterapeutika jsou součástí standardní léčby u většiny nádorových onemocnění. Po vstupu do nádorových buněk dochází k interakci léčiva a jeho metabolitů s řadou buněčných mechanismů. Paklitaxel, který je využíván v terapii nádorů vaječnicků i nádorů prsu (Dumontet C. *et Jordan M.A.*, 2010), je metabolizován enzymy z rodiny cytochromu P450, konkrétně CYP2C8 a CYP3A4. Sledováním metabolitů paklitaxelu v plazmě pacientek s nádory vaječnicků bylo zjištěno, že existují významné individuální rozdíly v rychlosti tvorby těchto metabolitů, které mohou souviset s hladinou exprese enzymů CYP2C8 a CYP3A4 nebo s polymorfismy v genech, které je kódují (Bergmann T.K. *et al.*, 2011; Nakajima M. *et al.*, 2005).

Častým jevem pozorovaným v nádorových buňkách je vyšší hladina reaktivních forem kyslíku a nižší míra apoptózy související s pozměněnou funkcí mitochondrií (Porporato P.E. *et al.*, 2016). K indukci oxidativního stresu však dochází také působením paklitaxelu (Ramanathan B. *et al.*, 2005). Řada prací se proto zaměřuje na úlohu superoxid dismutázy (SOD) a dalších enzymů, které se podílejí na detoxikaci reaktivních forem kyslíku v nádorových buňkách. V nádorech vaječníků byla v porovnání s benigní a normální ovariální tkání zjištěna vyšší exprese proteinu SOD2. Inhibice tohoto proteinu navíc vedla k agresivnějšímu růstu nádoru *in vivo* (Hu Y. *et al.*, 2005). Ve studii autorů Schwartz D.R. *et al.* (2002) bylo ukázáno, že v porovnání s ostatními subtypy je genová exprese SOD2 a dalších genů souvisejících s oxidativním stresem (např. glutaredoxin, GLRX, glutathion peroxidáza, GPX3) zvýšena ve světlobuněčném typu ovariálního karcinomu. Tyto geny tak mohou sloužit jako terapeutické cíle specifické pro určitý histologický typ.

1.3.3. Proliferace a regulace buněčného cyklu

Proliferace je, spolu s buněčnou smrtí a diferenciací, základním fyziologickým procesem, který udržuje homeostázu ve tkáních. Regulace růstu buněk zahrnuje jak řadu kontrolních bodů, tak také opravu DNA a programovanou buněčnou smrt. Deregulace těchto procesů, způsobená mutacemi nebo změnou v hladině exprese regulačních faktorů, může vést k nekontrolovanému buněčnému růstu a proliferaci a vyvolat tak nádorové bujení (Wiman K.G. *et Zhivotovsky B.*, 2017). Faktory, které hrají klíčovou roli v těchto procesech, tak mohou být použity jako terapeutické cíle (Diaz-Moralli S. *et al.*, 2013).

Jedním z důležitých proteinů regulujících buněčnou proliferaci je p53, který je zároveň i jedním z nejvýznamnějších tumor-supresorů. Jeho aktivace v podmínkách buněčného stresu vede k zastavení buněčného cyklu, k aktivaci mechanismů opravy DNA, případně k apoptóze. Ve více než 50 % všech typů nádorů je však gen TP53 kódující protein p53 mutován (Joerger A.C. *et Fersht A.R.*, 2016). V buněčné linii karcinomu ovarií vede inhibice p53 k zastavení proliferace a k indukci apoptózy, což je v souladu s výsledky zjištěnými na vzorcích nádorové tkáně pacientek. Zde je vyšší exprese p53 nalézána v nádorech pacientů s pokročilými stádii onemocnění a vyšším stupněm diferenciaci nádoru. Hladina p53 zároveň negativně koreluje s proteinem PLK1 (z angl. polo-like kinase 1), který se účastní regulace buněčného cyklu a je dalším potenciálním prognostickým faktorem ovariálního karcinomu (Zhang R. *et al.*, 2015). Oproti tomu byla

u ovariálních nádorů zjištěna pozitivní korelace p53 s markerem proliferace Ki67, přičemž oba tyto proteiny jsou prognostickými faktory agresivního typu nádorů (Kamal C.K. *et al.*, 2012). Pacientky s nádorem vaječníků s vyšším procentem buněk exprimujících Ki67 mají navíc kratší celkovou dobu přežití (Surowiak P. *et al.*, 2006).

Dalším proteinem, který se účastní regulace buněčné proliferace a který je studován ve vztahu k prognóze, je PRC1 (z angl. protein regulator of cytokinesis 1). V nádorové ovariální tkáni je exprese genu PRC1 oproti nenádorové tkáni zvýšena a koreluje s hladinou Ki67 (Ehrlichova M. *et al.*, 2013), tedy s vyšší mírou proliferace a agresivnějším fenotypem. V porovnání s kontrolní tkání byla zvýšená hladina transkriptu PRC1 detekována také ve tkáni nádorů prsu a stejně tak i v porovnání nádorů s vyšším a nižším stupněm diferenciací nádorových buněk. Vyšší exprese korelovala s horším bezpříznakovým přežíváním pacientek (Brynychova V. *et al.*, 2016).

1.3.3.1. Geny MMR dráhy

Replikace DNA je klíčová pro přenos genetické informace do další generace, a je proto striktně regulována a kontrolována. 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 MutS α a MutL α , heterodimery tvořené proteiny MSH2 a MSH6, resp. MLH1 a PMS2 (Kunkel T.A. *et al.*, 2015). V menší míře se uplatňují také komplexy MutS β (tvořený MSH2 a MSH3), MutL β (tvořený MLH1 a PMS1) a MutL γ (tvořený MLH1 a MLH3). Heterodimer MutS α rozpoznává jednonukleotidové záměny a krátké smyčky inzercí-delece (IDL), MutS β rozpoznává krátké i dlouhé IDL. Chyby jsou následně opraveny ve spolupráci s MutL a dalšími proteiny (Martin S.A., *et al.*, 2010).

Mutace v MMR genech jsou zásadní pro karcinogenezi hereditárního typu kolorektálního karcinomu, byly však popsány i u jiných typů nádorů (Martin S.A., *et al.*, 2010). V případě karcinomu vaječníků bylo pozorováno snížení exprese některých MMR proteinů (Xiao X. *et al.*, 2014) a v předchozích pracích byla ukázána souvislost mutace genu PMS2 s rizikem vzniku nádoru vaječníků (Song H. *et al.*, 2006) a s přežíváním pacientek (Mann A. *et al.*, 2008). Tyto výsledky je však ještě potřeba potvrdit na nezávislých studiích.

1.3.4. Regulační mechanismy

Genová, resp. proteinová exprese jednotlivých faktorů, které se uplatňují při různých buněčných procesech, je regulována řadou mechanismů. Mimo jiné mezi ně patří působení transkripčních faktorů nebo metylace specifických úseků DNA.

1.3.4.1. Receptory a transkripční faktory

Jak již bylo zmíněno, případy karcinomu prsu se liší expresí hormonálních receptorů (ER, PR) a receptoru HER2, přičemž jednotlivé typy vykazují různou prognózu. Na základě exprese receptorů je také pacientkám indikován nejvhodnější chemoterapeutický režim (viz tab. 2, s. 21). Nishumura R. *et al.* (2011) však ukázali, že při relapsu dochází v 25 % případů ke změně typu nádoru. Při relapsu by tedy mělo být zjištěno, jaké receptory jsou nádorem exprimovány, a následně by měl být upraven terapeutický režim. U karcinomu vaječníků je HER2 nezávislým markerem bezpříznakového i celkového přežití pacientek, ačkoliv je jeho exprese signifikantně zvýšena pouze v 16 % nádorů v pokročilém stádiu (Camilleri-Broët S. *et al.*, 2004).

Jaderné receptory, jako např. ER, ale také FXR (z angl. farnesoid X-activated receptor, kódován genem *NR1H4*) nebo VDR (z angl. vitamin D receptor, kódován genem *NR1I1*) představují atraktivní potenciální cíle protinádorové terapie. U nádorů prsu byl ER již úspěšně zaveden do klinické praxe (Lin C.Y. *et Gustafsson J.Å.*, 2015). V ovariální tkáni bylo zjištěno, že exprese genu *ESR2* je v nádorech oproti normálním vaječníkům snížena (Suzuki F. *et al.*, 2008), jeho hladina navíc koreluje s rizikem vzniku nádoru (Delfino K.R. *et Rodriguez-Zas S.L.*, 2013) a s OS pacientek (Fekete T. *et al.*, 2012).

FXR se podílí na regulaci metabolismu lipidů, cholesterolu, žlučových kyselin a glukózy (Cariou B. *et al.*, 2006; Forman B.M. *et al.*, 1995). V buňkách karcinomu tlustého střeva a prsu bylo ukázáno, že exprese *NR1H4* souvisí s expresí transportérů *ABCC2* a *ABCG2* a může tak přispívat k lékové rezistenci nádorových buněk (Herraez E. *et al.*, 2012; Swales K.E. *et al.*, 2006). VDR je důležitý pro funkci řady orgánů včetně reprodukčních (Keane K.N. *et al.*, 2017). Ve studii autorů Zhang X. *et al.* (2006) bylo zjištěno, že nedostatek vitamínu D může souviset se vznikem nádorů vaječníků. Analoga vitamínu D pak snižují proliferaci buněk karcinomu ovaria *in vitro* i *in vivo* (Shen Z. *et al.*, 2011; Zhang X. *et al.*, 2006). Tyto receptory a jejich geny proto představují kandidátní markery a mechanismus jejich působení v karcinogenezi by měl být detailně prostudován.

1.3.4.2. *Metylace DNA*

Jedním z klíčových epigenetických mechanismů řízení genové exprese je metylace CpG dinukleotidů v sekvenci DNA. U savců jsou nejčastěji metylovány repetitivní sekvence (Robertson K.D., 2005), pozornost se však soustředí především na metylaci promotorových oblastí, v nichž se CpG dinukleotidy hojně vyskytují (tzv. CpG ostrůvky; Jones P.A., 2012). Důsledkem metylace je inhibice transkripce, ke které dochází buď znemožněním vazby transkripčních faktorů, tedy přímo, nebo naopak vazbou proteinů specificky interagujících s metylovanými úseky, tedy nepřímo (Robertson K.D., 2005).

Metylace DNA je důležitá pro zachování stability genomu, uplatňuje se ve vývoji a udržení normální funkce buněk. 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). Předpokládá se, že významným jevem v karcinogenezi může být potlačení exprese tumor-supresorových genů. U ovariálního karcinomu je procento vzorků, v nichž je promotor genu *TP53* metylován, významně vyšší u nádorů než u kontrol. Metylace *TP53* tak potenciálně představuje diagnostický marker nádorů vaječníků (Chmelarova M. *et al.*, 2013). Vysoká frekvence metylace byla u vyšších stádií karcinomu ovarií pozorována i u genu *BRC1* (Teodoridis J.M. *et al.*, 2005).

U nádorů prsu bylo analýzou vybraných genů zjištěno, že míra metylace záleží na histologickém typu. Zvýšená metylace *ABC1* navíc souvisela s lepším přežíváním pacientek, hypometylace *ABC1* naopak asociovala s přítomností mutací v genu *TP53* a s horší odpovědí pacientek na léčbu doxorubicinem (Dejeux E. *et al.*, 2010). Vztah mezi metylací a citlivostí vůči chemoterapeutikům byl ukázán také *in vitro*. V důsledku aplikace epirubicinu a paklitaxelu došlo v buňkách karcinomu prsu k poklesu míry metylace a zároveň ke zvýšení transkripce genu *ABC1* (Reed K. *et al.*, 2010). Epigenetická regulace klíčových genů tedy může hrát roli nejen ve vzniku nádorových onemocnění ale také v prognóze pacientek.

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 ovariálního karcinomu je potřeba zaměřit se na diagnostiku časných stádií nemoci, tedy sekundární úroveň prevence. V případě obou studovaných typů nádorů je pak významná také terciární a kvartérní prevence, které mohou výrazně

ovlivnit přežívání a kvalitu života pacientek. Zde mohou hrát významnou roli molekulární biomarkery prognózy a účinnosti léčby, 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 nádorovou a nenádorovou tkání,
- ii) tyto rozdíly souvisí s klinickými charakteristikami nádoru a mohou tak sloužit jako biomarkery potenciálně využitelné v prevenci relapsu či progresi onemocnění, v prevenci nesprávného využívání léčiv nebo v prognóze.

První část práce byla zaměřena na biomarkery karcinomu vaječníků. Pro studii byl vybrán panel genů zahrnující 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 pacientek na léčbu.

Nádory vaječníků jsou většinou diagnostikovány ve stádiích, kdy jsou již přítomné metastázy, a tak je porozumění mechanismu jejich vzniku a šíření klíčové pro nastavení a 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.

Dílejší 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. Na Oddělení toxikogenomiky SZÚ bylo již dříve ukázáno, že exprese konkrétních genů *ABCC8* a *ABCD2* hraje u nádorů prsu významnou roli. Předkládaná studie vycházela z hypotézy, že tyto transportéry mohou obsahovat významné 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 jednotlivé varianty potenciální funkční význam.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. VZORKY TKÁNÍ PACIENTEK A BUNĚČNÉ LINIE

3.1.1. Vzorky od pacientek s karcinomem vaječníků nebo karcinomem prsu

Ve studii zabývající se karcinomem vaječníků byly použity vzorky krve pacientek s EOC, vzorky primárních nádorů, intraperitoneálních metastáz vycházejících z EOC a kontrolních ovariálních tkání. Vzorky krve a primárního karcinomu byly získány v letech 2009 – 2013 z Gynekologicko-porodnické kliniky Fakultní nemocnice Motol v Praze (FNM, prof. Lukáš Rob). Dále byly vzorky primárních EOC a také intraperitoneálních metastáz získány v letech 2011 – 2016 z Gynekologicko-porodnické kliniky Fakultní nemocnice v Plzni (FNP, doc. Jiří Bouda). Vzorky kontrolních ovariálních tkání byly získány v letech 2010 – 2011 od pacientek, které byly léčeny na Gynekologicko-porodnické klinice FNM z jiného důvodu, než je maligní onemocnění vejčníků. Vzorky krve pacientek s karcinomem prsu byly získány z Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze v letech 2006 – 2012 (MUDr. Václav Pecha).

Vzorky nádorové a kontrolní tkáně byly po odběru zamrazeny v tekutém dusíku a poté skladovány při -80 °C. Všechny vzorky byly histopatologicky vyšetřeny a byla ověřena přítomnost karcinomu. Jako kontroly byly naopak použity vzorky tkání bez maligních buněk. Vzorky krve byly po odběru ochlazeny na ledu a následně skladovány při -20 °C.

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

3.1.2. Buněčné linie karcinomu vaječníků

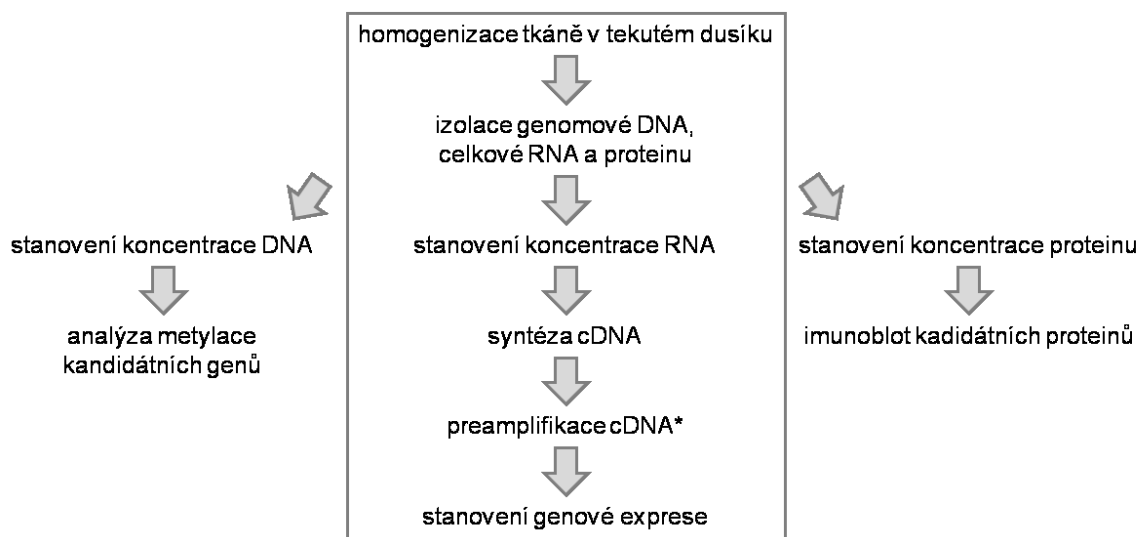
Cílem experimentů provedených na vzorcích tkání pacientek je najít kandidátní geny, resp. proteiny, které ovlivňují prognózu onemocnění. Důležitou součástí validace těchto potenciálních biomarkerů jsou *in vitro* experimenty na buněčných liniích, které umožňují stanovení mechanismu působení jednotlivých markerů v nádorových buňkách. V rámci předkládané práce byla proto 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).

Linie NCI/ADR-RES byla dlouhou dobu považována na linii karcinomu prsu, avšak později bylo prokázáno, že se jedná o karcinom vaječníků (Liscovitch M. *et* Ravid D., 2007). Linie byla odvozena od HGSC typu a je rezistentní vůči doxorubicinu (<http://web.expasy.org>). Od karcinomu ovarií byly odvozeny i další dvě linie, OVCAR-3 a SKOV-3. Linie OVCAR-3 pochází od pacientky s progresivním relabujícím nádorem HGSC typu, je citlivá vůči působení karboplatiny a středně citlivá vůči paklitaxelu. Buňky linie SKOV-3 pocházejí z endometroidního nebo světlobuněčného karcinomu a vůči karboplatině a paklitaxelu jsou středně citlivé (Beaufort C.M. *et al.*, 2014).

3.2. ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZA VZORKŮ TKÁNÍ

Vzorky ovariální tkáně (primární karcinom vaječníků a intraperitoneální EOC metastázy, kontrolní ovariální tkáň), které byly použity v jednotlivých studiích (viz Výsledky, kap. 4.1., s. 58 – 59), byly zpracovány postupem schematicky znázorněným na obr. 8.



Obr. 8: Schéma zpracování vzorků ovariální tkáně. Část postupu uvedená v rámečku je společná pro všechny typy tkání, ostatní metody byly použity pouze u vybraných primárních EOC a kontrolních ovarií.

*Preamplifikace byla aplikována u vzorků použitých v pilotní studii a ve studii zabývající se metastázami (viz kap. 4.1., s. 58 – 59).

3.2.1. Izolace RNA, DNA a proteinu z tkání

Vzorky tkání byly zpracovány s použitím AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitu (Qiagen, Hildesheim, Německo), který díky použití kolonek specificky vázajících DNA a RNA umožňuje paralelní izolaci genomové DNA, celkové RNA a celkového proteinu z jednoho vzorku. Kousek tkáně o velikosti přibližně 3 – 5 mm v průměru byl v misce s tekutým dusíkem podrcen na prášek, který byl přenesen do mikrozkuhavky obsahující lyzační pufr. Následně byl pro izolaci DNA, RNA a proteinu použit postup doporučený výrobcem (www.qiagen.com). Izolovaná RNA byla skladována při -80 °C, DNA a protein byly uloženy při -20 °C.

Pro izolaci DNA byla využita metoda fenol-chloroformové extrakce podle protokolu popsaného autorkami Topić E. *et* Gluhak J. (1991). Izolaci provedl pan S. Horský (SZÚ). Kousek tkáně byl v misce s tekutým dusíkem podrcen na prášek, který byl přenesen do mikrozkuhavky obsahující lyzační pufr. Lyzát byl poté ošetřen proteinázou K. DNA byla extrahována do směsi fenolu a chloroformu, srážena etanolem a nakonec rozpuštěna v NFW. Izolovaná DNA byla skladována při -20 °C

3.2.2. Práce s RNA a analýza genové exprese

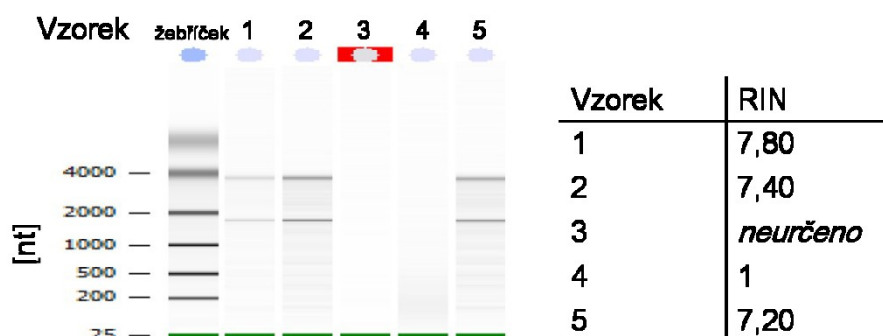
3.2.2.1. Stanovení koncentrace a kontrola kvality RNA

Koncentrace RNA izolované pomocí AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitu byla stanovena pomocí kitu Quant-iT RiboGreen RNA Reagent and Kit (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení intenzity fluorescence, která odpovídá koncentraci RNA (www.thermofisher.com).

Při stanovení bylo postupováno dle návodu výrobce. K roztokům standardní RNA (rozsah koncentrace 20 – 1000 ng/ml) i k roztokům vzorků bylo přidáno fluorescenční činidlo; RNA izolovaná ze vzorků byla v reakční směsi 4000x naředěna. Fluorescence byla změřena pomocí přístroje Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Koncentrace RNA ve vzorcích byla vypočtena z rovnice regrese kalibrační křivky.

U vybraných vzorků byla zhodnocena kvalita RNA; pomocí Agilent RNA 6000 Nano Kitu a přístroje 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) byl stanoven RIN (z angl. RNA integrity number). Stanovení je založeno na elektroforetické separaci fragmentů RNA v mikrokapilárách, které je automaticky vyhodnoceno podle velikosti fragmentů markeru (Mueller O. *et al.*, 2000; Schroeder A. *et al.*, 2006). Při stanovení bylo

postupováno dle doporučení výrobce. Vzorky, které měly $RIN > 4$, byly ponechány ve studii, degradované vzorky ($RIN \leq 1$) byly vyřazeny (obr. 9).



Obr. 9: Příklad výsledků měření RIN – elektroferogram převedený do formátu klasické gelové elektroforézy. Jako první je vždy analyzován tzv. žebříček obsahující směs fragmentů RNA o definované délce v nukleotidech (nt).

3.2.2.2. Syntéza a kontrola kvality cDNA

RNA byla přepsána do cDNA pomocí kitu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litva) s využitím náhodných hexamerů jako primerů. Současně se vzorky byla vždy připravena i pozitivní kontrola bez RNA a ke každému vzorku také negativní kontrola bez transkriptázy, s nimiž bylo nakládáno stejně jako se vzorky.

cDNA byla připravena podle doporučení výrobce. Pro syntézu bylo použito 0,5 μg RNA naředěné ve vodě bez nukleáz (NFW, z angl. nuclease-free water) do celkového objemu 13 μl . Připravená cDNA byla uložena při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Čistota připravené cDNA byla zhodnocena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR, z angl. polymerase chain reaction) fragmentu kontrolního genu pro ubiquitin C (UBC) na přístroji GeneAmp 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), jak bylo popsáno dříve (Souček P. *et al.*, 2005). Kvalita cDNA byla zkontrolována na přístroji Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie) pomocí real-time PCR kontrolního genu pro peptidyl-prolyl izomerázu A (PPIA; metodika bude podrobně popsána v kap. 3.2.2.4., s. 43 – 44), který je v ovariální tkáni stabilně exprimován.

3.2.2.3. Preamplifikace cDNA

Preamplifikací byly ve vzorcích obohaceny sekvence cDNA odpovídající vybraným cílovým genům (příloha 1). Reakční směs obsahovala 2,5 µl nepreamplifikované cDNA, 5x PerfeCTa PreAmp SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA) a směs prób TaqMan Gene Expression Assay (každá z nich 0,2x ředěná; Applied Biosystems) v celkovém objemu 25 µl. PCR reakce se skládala z denaturace (2 min při 95 °C) a 14 preamplifikačních cyklů (10 min při 95 °C, 3 min při 60 °C) podle doporučení výrobce.

3.2.2.4. Stanovení genové exprese pomocí real-time PCR s relativní kvantifikací

Pro stanovení relativní genové exprese byl použit přístroj ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) a chemikálie TaqMan Gene Expression Assays, které kromě neznačených primerů specifických pro daný gen obsahují také próby. Ty mají na jednom konci navázanou fluorescenční značku, na druhé straně pak tzv. zhášec fluorescencí. V průběhu syntézy nového vlákna je próba degradována, zhášec a fluorofor jsou odděleny, a tak je možné detekovat signál, který je úměrný množství cDNA ve vzorku (www.thermofisher.com).

Seznam genů stanovených v jednotlivých studiích je uveden v příloze 1. Studie splňovaly podmínky pro publikování výsledků kvantitativní real-time PCR (tzv. kritéria MIQE z angl. Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments; Bustin S.A. *et al.*, 2009). Vzorky byly analyzovány v duplikátech; jestliže byla směrodatná odchylka jednotlivých měření $> 0,5$ Ct, vzorky byly přeměřeny. Při analýze jednotlivých genů byla vždy zařazena i negativní kontrola bez cDNA.

Profil reakce optimalizované na nejvyšší možnou účinnost (90 – 100 %) byl nejprve 2 min při 50 °C, poté denaturace 10 min při 95 °C a následně 45 cyklů denaturace, nasedání primerů a syntézy vlákna 15 sec při 95 °C a 1 min při teplotě nasedání primerů (příloha 1).

V jednotlivých studiích byl použit 2x TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) nebo 5x Hot FirePol Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estonsko). Reakční směs dále obsahovala příslušnou 20x TaqMan Gene Expression Assay a 2 µl cDNA, která byla 32x ředěna v TE pufru v případě preamplifikovaných vzorků, resp. 8x v NFW v případě nepreamplifikovaných vzorků. Celkový objem reakční směsi byl 5 µl. Teplotní profil reakce při stanovení vzorků byl stejný jako při optimalizaci reakční

účinnosti; pro jednotlivé próby byly zohledněny změněné teploty nasedání primerů a syntézy.

Aby mohla být data získaná pomocí real-time PCR s relativní kvantifikací vzájemně porovnána, byla normalizována vůči expresi referenčních genů. Stabilita šesti genů byla zhodnocena pomocí programů NormFinder (Molecular Diagnostic Laboratory, Aarhus University Hospital, Aarhus, Dánsko) a geNorm (Vandesompele J. *et al.*, 2002). Jako referenční byly vybrány tři z testovaných genů, které měly v ovariální tkáni nejstabilnější expresi.

3.2.2.5. Statistické vyhodnocení dat získaných pomocí real-time PCR

Relativní genová exprese byla mezi jednotlivými typy vzorků (tj. kontrolami, primárními nádory, intraperitoneálními metastázami) porovnána pomocí programů REST 2009 (Qiagen; Pfaffl M.W. *et al.*, 2002) nebo SPSS v16.0 (Mann-Whitneyho a Kruskal-Wallisův test; 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. Relativní exprese cílových genů byla normalizována na průměrnou expresi referenčních genů a následně bylo Kolmogorov-Smirnovovým testem zhodnoceno rozložení dat. Vzhledem k tomu, že v každém ze studovaných souborů byly zjištěny geny s expresními hladinami odchylicími se od normálního rozdělení, pro další analýzy byly použity neparametrické testy. Pro hodnocení korelace exprese s kontinuálními veličinami (exprese proliferačního markeru Ki67, věk pacientky v době diagnózy) byl aplikován Spearmanův test, pro faktoriální veličiny (stage, grade, histologický typ, rezistence vůči chemoterapii) byl použit Mann-Whitneyho nebo Kruskal-Wallisův test.

Přežívání pacientek s nádory vaječníků bylo hodnoceno jako vztah genové exprese a délky přežití do progresu onemocnění (PFS), tedy doby od chirurgického odstranění nádoru do progresu či relapsu onemocnění nebo do úmrtí pacientky, případně do poslední kontroly, kdy byla pacientka bez známek recidivy. Exprese byla pro tyto účely rozdělena na hodnoty vyšší, resp. nižší než byl medián exprese daného genu. Pro analýzu přežívání byl využit log-rank test. Validita výsledků byla ověřena Coxovou regresí (podmínky Coxovy regrese jsou uvedeny ve výsledkové části u jednotlivých studií).

Jako signifikantní byly u všech testů považovány výsledky s hodnotou $p < 0,05$.

3.2.3. Práce s proteinem a analýza proteinové exprese

3.2.3.1. Stanovení koncentrace proteinu

Koncentrace celkového proteinu izolovaného ze tkání pomocí AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitu byla stanovena pomocí Pierce BCA Protein Assay Kitu (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Metoda je založena na redukci a následné chelataci iontů mědi, při nichž dochází ke změně zbarvení roztoku. Míra zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinů v roztoku (www.thermofisher.com).

Reakční roztok připravený podle návodu výrobce byl přidán ke kalibračním roztokům (rozsah 16 – 2000 $\mu\text{g/ml}$) a ke vzorkům proteinu. Absorbance při 562 nm byla změřena na přístroji Infinite M200 a koncentrace proteinu ve vzorcích byla vypočtena z rovnice regrese kalibrační křivky.

3.2.3.2. Imunoblot

Imunoblot je metoda založená na separaci proteinů podle molekulové hmotnosti a jejich následné detekci pomocí protilátky specificky interagující s určitým proteinem. V této práci byly analyzovány proteiny PRC1 a ABCA2 vybrané na základě výsledků studia genové exprese v tkáni karcinomu vaječníků. Protein ABCA2 však nebylo možné ve vzorcích stanovit, proto jsou uvedeny pouze informace týkající se proteinu PRC1.

Vzorky proteinu byly denaturovány 10 min při 95 °C a následně byly s využitím aparatury Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) rozděleny pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Současně se vzorky byl vždy analyzován i referenční vzorek proteinu z buněčné linie karcinomu prsu MDA-MB-231 a na gel byl aplikován marker pro odečet molekulových hmotností (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-Rad).

Po ukončení SDS-PAGE byly proteiny z gelu přeneseny pomocí příslušenství Criterion Blotter (Bio-Rad) na nitrocelulózovou membránu Amersham Protran 0.2 NC (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA, USA). Nespecifická vazebná místa byla blokována blokovacím činidlem Blocker BLOTTO in TBS (solný roztok pufrovaný pomocí tris(hydroxymethyl)aminomethanu; Thermo Scientific).

Po blokování byla membrána inkubována s roztokem primární protilátky. Pro detekci proteinu PRC1 byla použita monoklonální králičí IgG protilátka PRC1 Antibody (EP1513Y, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) ředěná 1 : 1000 v 5x ředěném blokovacím činidle. Jako referenční gen byl detekován také β -aktin; byla použita monoklonální králičí IgG protilátka β -Actin (13E5) Rabbit mAb #4970 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) ředěná 1 : 2000 v blokovacím činidle. Dále byla aplikována kozí sekundární protilátka proti králičímu IgG Anti-Rabbit IgG značená křenuvou peroxidázou (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ředěná 1 : 10 000 v TBST (TBS + Tween 20). Proteiny PRC1 a β -aktin byly vizualizovány pomocí chemiluminiscenční reakce s použitím chemikálií SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Obarvené membrány byly vyfotografovány přístrojem Odyssey Fc (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA). Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno v programu Image Studio v4.0.21 (LI-COR Biotechnology).

3.2.3.3. Statistické vyhodnocení údajů získaných z imunoblotů

Data získaná z denzitometrického vyhodnocení imunoblotů proteinu PRC1 byla normalizována vzhledem k expresi (denzitě) referenčního proteinu (β -aktinu). V dalším kroku pak byla normalizovaná exprese ve vzorcích vztažena k expresi v referenčním vzorku (MDA-MB-231).

Pro statistické vyhodnocení byl použit program SPSS v16.0. Spearmanovým testem byla zjištěna vzájemná korelace exprese na úrovni proteinu a mRNA, Kruskal-Wallisovým testem byla porovnána exprese PRC1 v nádorových vzorcích a kontrolách. Kruskal-Wallisův test a log-rank test byly použity pro zhodnocení vztahu mezi proteinovou expresí a klinickými daty pacientek, resp. délkou přežívání pacientek (postup analýz je podrobněji popsán v kap. 3.2.2.5., s. 44).

3.2.4. Práce s DNA a analýza metylace DNA

3.2.4.1. Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA izolované pomocí fenol-chloroformové extrakce byla stanovena pomocí Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kitu (Invitrogen). Princip metody je stejný jako v

případě stanovení koncentrace RNA, v tomto kitu však barvicí roztok specificky interaguje s dsDNA a umožňuje tak její kvantifikaci (www.thermofisher.com).

Nejprve byly připraveny roztoky standardní DNA o koncentraci 50 – 1000 ng/ml. Ke vzorkům i k roztokům standardní DNA byl přidán barvicí roztok; výsledné ředění stanovované DNA v reakční směsi bylo 200x. Hodnoty fluorescence byly změřeny na přístroji Infinite M200 za stejných podmínek a vyhodnoceny stejným způsobem jako v případě stanovení koncentrace RNA (kap. 3.2.2.1., s. 41).

3.2.4.2. Metylačně-specifická vysokorozlišovací analýza křivek tání

DNA izolovaná ze vzorků karcinomu vaječníků a z kontrolních ovariálních tkání byla analyzována metodou metylačně-specifické vysokorozlišovací analýzy křivek tání (HRM, z angl. high-resolution melting). Metoda je založena na aplikaci bisulfitové konverze a následné PCR amplifikaci. Cytosin obsažený v DNA je chemicky konvertován na uracil, zatímco 5-metylcytosin zůstává nezměněn (Frommer M. *et al.*, 1992). Záměnou cytosinu za uracil dochází ke změně teploty tání vlákna DNA, kterou je možné detekovat a kvantifikovat na základě analýzy křivek tání (Wojdacz T.K. *et al.*, 2007). Metoda byla aplikována pro analýzu metylace v promotorové oblasti genu *ABCB1*.

Pomocí programu MethPrimer software (Li L.C. *et Dahiya R.*, 2002) byly v genu *ABCB1* identifikovány tři CpG ostrůvky a následně byly navrženy primery (tab. 3, s. 45). Pro konverzi DNA byl využit EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) a bylo postupováno podle návodu výrobce (www.qiagen.com). Pro HRM analýzu bylo použito 10 ng konvertované DNA. Analýza probíhala na přístroji Rotor-Gene 6000 s použitím EpiTect HRM Kitu (Qiagen). Podmínky PCR byly následující: počáteční denaturace 10 min při 95 °C a poté 45 cyklů složených z denaturace 15 s při 94 °C, nasedání primerů za podmínek uvedených v tab. 3 (s. 45) a syntézy vlákna 30 s při 72 °C. Následovala finální syntéza 10 min při 72 °C a HRM analýza v rozpětí 65 – 95 °C s krokem po 0,1 °C/cyklus.

Aby bylo možné metylaci vzorků DNA kvantifikovat, současně se vzorky byly vždy analyzovány i kalibrační roztoky obsahující 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 % metylované DNA, které byly připraveny smísením plně metylované a nemetylované DNA (EpiTect Control DNA, methylated; EpiTect Control DNA, unmethylated, Qiagen) v příslušných poměrech. Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu Rotor-Gene Q v6.0 (Corbett Research).

Tab. 3: Sekvence primerů a podmínky nasedání optimalizované pro jednotlivé primery pro použití při PCR amplifikaci a následné HRM analýze genu *ABCBI*.

Oblast	Sekvence primerů 5' → 3'	Délka [bp]	Podmínky ^a
1	F: TTAGAGAGGTGTAATGGAAGTTAGAATATTTT R: CACTATTCCTACCCAACCAATCAA	140	30 s, 59 °C
2	F: GTTGATTGGTTGGGTAGGAAT R: CAAACAACAACCTCTACTTCTTTAAA	132	30 s, 55 °C
3	F: TTTTTTAGGTTTTTTTATTAAGT R: CTAAAAACTATCCCATAATAACTC	124	30 s, 50 °C
4	F: AGATTTAGGAGTTTTTGGAGTAG R: CTCAAAAACAAATCCCC	101	30 s, 50 °C
5	F: TTGTGGAGATGTTGGAGATT R: ACACAAAATCTCCAACATCTCCA	132	30 s, 61 °C
6	F: TTGTGGAGATGTTGGAGATT R: CCATCAAAACCAAAAAACAAT	116	60 s, 58 °C
7	F: TGATGGGGGATTAGAGGTTAGTT R: AAAATTCTTCTTCTTACTCCTCCATTA	136	30 s, 57 °C

^aPodmínky nasedání primerů optimalizované pro jednotlivé úseky.

F = forward, přímé vlákno; R = revers, zpoždující se vlákno.

3.2.4.3. Statistické vyhodnocení metylačně-specifických HRM analýz

Statistické vyhodnocení výsledků metylační analýzy bylo provedeno v programu SPSS v16.0. Úroveň metylace genu *ABCBI* ve vzorcích DNA byla pomocí Spearmanova testu porovnána s hladinou jeho genové exprese. Pomocí Mann-Whitneyho, Kruskal-Wallisova a Spearmanova testu byl dále zhodnocen vztah metylace *ABCBI* ke klinickým datům pacientek s ovariálním karcinomem. Vztah mezi úrovní metylace *ABCBI* a délkou PFS pacientek byl hodnocen pomocí log-rank testu. Postup analýz je podrobněji popsán v kapitole 3.2.2.5. (s. 44).

3.3. ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZA VZORKŮ KRVE

Ze vzorků krve od pacientek s karcinomem vaječníků nebo prsu byla izolována DNA. DNA pacientek s nádory vaječníků byla využita pro genotypizaci kandidátních genů vybraných na základě studia genové exprese, tj. metodami HRM a alelické diskriminace

byly analyzovány jednonukleotidové polymorfizmy genů *ABCA2* a *PRCI*. DNA pacientek s nádory prsu byla analyzována metodou sekvenování nové generace na přístroji GS Junior (Roche, Branford, CT, USA).

DNA byla izolována z plně periferní krve odebrané do vacutainerů s antikoagulačním činidlem K₃EDTA. Izolace byla provedena pomocí fenol-chlorformové extrakce panem S. Horským (SZÚ; kap. 3.2.1., s. 41). Koncentrace DNA izolované z krve byla stanovena s použitím Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kitu (kap. 3.2.4.1., s. 47).

3.3.1. Stanovení jednonukleotidových polymorfizmů vybraných genů

Na základě výsledků studia genové exprese v tkáni ovariálního karcinomu byly vybrány geny *PRCI* a *ABCA2*, u nichž byla studována genetická variabilita, konkrétně SNP. Jelikož je u genů *PRCI* a *ABCA2* známo velké množství SNP (www.ensembl.org; www.ncbi.nlm.nih.gov), pro genotypizační analýzy byly vybrány takové polymorfizmy, jejichž minoritní alela se v evropské populaci vyskytuje minimálně ve 3 % případů, nebo které mají klinický význam (tab. 4, s. 50).

3.3.1.1. Alelická diskriminace

Pro alelickou diskriminaci byl použit TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), který funguje na podobném principu jako TaqMan Gene Expression Master Mix (kap. 3.2.2.4., s. 43). Metoda využívá real-time PCR; rozlišení dvou variant SNP je umožněno přítomností dvou prób, které jsou značeny dvěma různými fluorescenčními barvami. Jsou-li ve vzorku detekovány obě barvy, je alela označena jako heterozygot, v opačném případě jako homozygot.

Reakční směs pro real-time PCR obsahovala 2x TaqMan Genotyping Master Mix, 40x TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems; seznam je uveden v tab. 5., s. 50) a vzorek DNA ředěný v NFW v celkovém objemu 5 μ l. Pro detekci *PRCI* byla použita koncentrace DNA 8 ng/ μ l, pro detekci *ABCA2* 4 ng/ μ l. Současně se vzorky byla vždy analyzována také negativní kontrola neobsahující DNA.

Pro analýzu alelické diskriminace byl využit přístroj ViiA7 Real-Time PCR System. Program reakce byl 30 s při 60 °C, denaturace 10 min při 95 °C a dále 45 cyklů:

denaturace 15 s při 95 °C a nasedání primerů a syntéza vlákna 1 minutu při 60 °C. Závěrečný krok byl 30 s při 60 °C.

Tab. 4: Polymorfizmy genů *PRCI* a *ABCA2* vybrané pro genotypizační analýzy.

Číslo SNP	Typ varianty	Maj./min. alela	Pozice na chromozomu ^c	Frekvence [%] ^d	Klinický význam
<i>PRCI</i>					
rs12910825 ^a	intron	A/G	15:90968030	38	dědičný nádor prsu
rs8042680 ^b	intron	C/A	15:90978107	33	diabetes typu 2
rs8028856 ^a	intron	A/G	15:90987590	26	dědičný nádor prsu
rs2290203 ^b	intron	G/A	15:90968837	21	nádor prsu
rs8031684 ^a	intron	T/A	15:90984221	19	dědičný nádor prsu
rs11852999 ^b	intron	C/T	15:90971530	7	nádor prsu
<i>ABCA2</i>					
rs2271862 ^b	synonymní	A/G	9:137011907	33	–
rs7048567 ^b	synonymní	G/A	9:137009585	27	–
rs908832 ^b	synonymní	A/G	9:137018032	3	Alzheimerova choroba

^aSNP analyzované metodou HRM.

^bSNP analyzované metodou alelické diskriminace.

^cČíslo chromozomu: pořadí nukleotidu směrem od p raménka ke q raménku chromozomu. Vztaheno k referenční sekvenci NC_000015.10 (*PRCI*), resp. NC_000009.12 (*ABCA2*).

^dDle 1000 Genomes Project (1000 Genomes Project Consortium, 2010).

Maj. = majoritní alela; min. = minoritní alela. Uvedená záměna je na + vlákně DNA.

Tab. 5: Seznam SNP a prób (TaqMan SNP Genotyping Assay) použitých pro alelickou diskriminaci genů *PRCI* a *ABCA2*.

<i>PRCI</i>		<i>ABCA2</i>	
Číslo SNP	Assay	Číslo SNP	Assay
rs2290203	C_2999698_1	rs908832	C_9456380_10
rs8042680	C_2999711_10	rs2271862	C_15961241_10
rs11852999	C_2999702_10	rs7048567	C_31786332_20

Frekvence alel (p , q) byla vypočtena podle následujících vzorců, kde N je celkový počet genotypů, (AA) je počet standardních homozygotů, (BB) je počet variantních homozygotů a (AB) je počet heterozygotů.

$$p = \left[(AA) + \frac{1}{2} \cdot (AB) \right] / N$$

$$q = \left[(BB) + \frac{1}{2} \cdot (AB) \right] / N$$

3.3.1.2. Vysokorozlišovací analýza křivek tání detekující SNP

Záměnou nukleotidů v sekvenci genů dochází ke změně teploty tání DNA, kterou je možné, podobně jako metylaci DNA (kap. 3.2.4.2., s. 47), detekovat pomocí HRM analýzy. Tato metoda byla použita pro tři SNP genu *PRCI*.

Reakční směs o celkovém objemu 10 µl obsahovala 2x Type-it HRM PCR MasterMix (Qiagen), 0,3µM primery pro přímé a zpoždující se vlákno a DNA o koncentraci 4 ng/µl. Sekvence primerů (tab. 6) byly navrženy v programu Primer3 v4.0.0 (<http://primer3.ut.ee>). HRM probíhalo na přístroji Rotor-Gene 6000 a součástí každé analýzy byla také negativní kontrola bez DNA.

Program PCR byl následující: počáteční denaturace 10 min při 95 °C a poté 40 cyklů složených z denaturace 30 s při 95 °C, nasedání primerů 30 s při 58 °C a syntézy vlákna 30 s při 72 °C. Následovala HRM analýza v rozpětí 65 – 95 °C s krokem po 0,1 °C/cyklus. Vyhodnocení výsledků HRM analýzy bylo provedeno v softwaru Rotor-Gene Q 2.0.2 (Qiagen). Frekvence variantních alel byla vypočtena podle vzorce uvedeného v kapitole 3.3.1.1. (s. 49 – 51).

Tab. 6: Sekvence primerů použité při HRM analýze tří SNP genu *PRCI*.

Číslo SNP	Sekvence primerů 5' → 3'	Délka ampliconu [bp]
rs12910825	F: CGTCTGGTTTGGGTTGCTAT R: CTGAGGCCTTGTAACCTGCT	171
rs8028856	F: TGCCAGGGAGTCTTAGTTG R: AAAATACAAATTTAACTGGCTTCTG	152
rs8031684	F: GAAAGCACGCCATTGCAC R: ACAAGAGGGAAAACAGTCCA	155

F = forward, přímé vlákno; R = revers, zpoždující se vlákno.

3.3.1.3. Statistické vyhodnocení stanovení SNP

Vztah jednotlivých genetických variant genů *PRCI* a *ABCA2* ke klinickým datům pacientek s karcinomem vaječníků byl vyhodnocen s použitím programu SPSS v16.0. Jako referenční byl použit standardní genotyp, v případě hodnocení výskytu majoritní alely byl jako referenční genotyp použit variantní homozygot.

Vztahy mezi výskytem SNP a stádiem, histologickým typem a stupněm diferenciací nádorových buněk byly hodnoceny pomocí kontingenčních tabulek a Mantel-Haenszelovým testem a korelace s expresí markeru Ki67 byla hodnocena Spearmanovým testem. V případě genu *PRCI* byl Kruskal-Wallisovým testem navíc hodnocen vztah mezi genotypem a mírou genové a proteinové exprese. Pro hodnocení přežívání pacientek byl využit log-rank test a Coxova regrese (multiparametrická analýza vztažená na stádium, grade, histologický typ a výskyt vzdálených metastáz).

V programu HaploView v4.2 (Barrett J.C. *et al.*, 2005) byl u vybraných polymorfizmů hodnocen také haplotyp, tedy síla vazby mezi jednotlivými SNP. U vybraných SNP byl dále s využitím programu RegulomeDB v1.1 (Boyle A.P. *et al.*, 2012) hodnocen jejich potenciální funkční význam.

3.3.2. Sekvenování nové generace

Vzorky DNA izolované z krve pacientek s karcinomem prsu byly analyzovány na sekvenátoru nové generace GS Junior. Pro sekvenování na přístroji GS Junior je využívána technologie tzv. pyrosekvenování. Při této metodě jsou vzorky DNA fragmentovány a amplifikovány emulzní PCR. Sekvenování probíhá syntézou; v každém cyklu je do reakční směsi přidán jeden typ deoxynukleotidů. Pokud je zabudován do nového vlákna DNA, uvolněný pyrofosfát je sulfurylázou inkorporován do molekuly ATP, která je využita pro oxidaci luciferinu. Emitované světlo je poté detekováno kamerou (Metzker M.L., 2010).

Součástí předkládané práce je pyrosekvenování exonů genů *ABCC8* a *ABCD2* ze vzorků krve pacientek s karcinomem prsu. Podle výsledků zjištěných na Oddělení toxikogenomiky SZÚ jsou tyto geny potenciálními prognostickými faktory karcinomu prsu související s progresí nádoru a odpovědí pacientek na terapii (Hlaváč V. *et al.*, 2013). V obou směrech byly sekvenovány všechny exony obou genů (39 exonů genu *ABCC8*, 10 exonů *ABCD2*) a také 30 bp z okolních intronů.

DNA byla nejprve fragmentována na přístroji Bioruptor Plus (Diagenode, Liege, Belgie). S použitím chemikálií SeqCap EZ Choice (Nimblegen, Roche) byly obohaceny sekvence studovaných genů a s použitím Rapid Library Preparation Kitu (Roche) byly podle návodu výrobce připraveny knihovny jednotlivých vzorků DNA. S pomocí emPCR Kitu (Roche) a GS Junior Titanium Sequencing Kitu (Roche) byly vzorky připraveny pro sekvenování na přístroji GS Junior. Základní nastavení sekvenace bylo „Full Processing for Shotgun or Paired End Sequencing, 200 cycles (500 bases).“

3.3.2.1. Hodnocení dat získaných pomocí NGS

Data získaná sekvenováním byla zpracována pomocí softwaru Sequence Pilot (JSI Medical Systems, Ettenheim, Německo) s následujícími parametry: minimální absolutní pokrytí: 15 (kombinované); minimální absolutní pokrytí v obou směrech: 5; minimální procento pokrytí: 10 % v každém směru; hranice skóre kvality: 10. Varianty byly filtrovány s pokrytím > 30 a s alternativní frekvencí alel > 0,2.

Vztahy detekovaných mutací s klinickými daty pacientek (grade, velikost nádoru, postižení lymfatických uzlin, exprese hormonálních receptorů, HER2 a Ki67, odpověď na neoadjuvantní chemoterapii) byly hodnoceny v programu SPSS v15.0 pomocí jednosměrného testu ANOVA, pomocí Pearsonova chi kvadrát testu a Spearmanova testu. Přežívání pacientek (PFS) bylo hodnoceno log-rank testem metodou Kaplan-Meiera.

Význam zjištěných SNP byl hodnocen *in silico* 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). Tyto linie byly charakterizovány z hlediska cytotoxicity paklitaxelu a karboplatiny, chemoterapeutik standardně využívaných při léčbě nádorů vaječníků, a dále byly provedeny pilotní experimenty pro zavedení inhibice exprese kandidátních genů a proteinů pomocí specifických siRNA (z angl. short interfering RNA).

3.4.1. Kultivace buněčných linií

Alikvoty jednotlivých buněčných linií v příslušném kultivačním médiu (viz dále) s přísadkou 10 % dimethylsulfoxidu (DMSO) byly uchovávány v kapalném dusíku. Po rozmrazení byly převedeny do kultivačního média a kultivovány v CO₂ inkubátoru (SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Ósaka, Japonsko) při 37 °C s 5% atmosférou oxidu uhličitého. Základním kultivačním médiem pro linie NCI/ADR-RES a OVCAR-3 bylo RPMI 1640, pro linii SKOV-3 médium McCoy's 5A. Obě tato média obsahovala přísadku L-glutaminu (300 µg/ml), pyruvátu sodného (110 µg/ml), penicilinu (100 U/ml), streptomycinu (100 µg/ml), hydrogenuhličitanu sodného (1,95 mg/ml), HEPES pufru (kyselina 2-[4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinyl] etansulfonová; 15 mmol/l) a fetálního bovinního séra (10 %; vše PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Německo).

Buněčné linie byly vždy kultivovány do cca 90 % konfluency, poté byly pasážovány, tj. byly trypsinovány (0,25% roztok trypsinu s 0,02% EDTA; PAN Biotech GmbH) a naředěny do čerstvého kultivačního média. Pro experimenty byly využity buňky, které byly pasážovány méně než čtyřicetkrát. Analýzou STR (z angl. short tandem repeat) bylo ověřeno, že u takto kultivovaných buněk nedochází ke změnám v DNA.

3.4.2. Stanovení cytotoxicity paklitaxelu a karboplatiny

Aby mohla být porovnána citlivost jednotlivých linií karcinomu vaječníků vůči paklitaxelu a karboplatině, byla stanovena cytotoxicita těchto látek. Nejprve byly pomocí kitu CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) stanoveny koncentrace, které mají na linie cytotoxický efekt, a následně byla pomocí přístroje xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) DP (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA) určena hodnota IC₅₀ (50% inhibiční koncentrace, z angl. inhibition concentration).

3.4.2.1. Stanovení cytotoxicity pomocí kitu *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*

CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay obsahuje tetrazoliovou sůl, která je v živých buňkách produkujících NADH a NADPH redukována za vzniku

barevného produktu. Jeho množství, které je úměrné množství živých buněk ve vzorku, je možné stanovit měřením absorbance při 490 nm (www.promega.com).

Buněčné linie NCI/ADR-RES a OVCAR-3 byly do jamek mikrotitrační destičky (96 jamek) pipetovány v koncentraci 5000 buněk na 100 μ l média, buňky SKOV-3 po 2500 buněk na 100 μ l. Po 18 hod kultivace bylo médium z jamek odebráno a byl přidán roztok studované látky v příslušném kultivačním médiu. Součástí experimentu byl i slepý vzorek neobsahující buňky, kontrolní vzorek obsahující buňky, avšak bez přídavku chemoterapeutika, a kontrolní vzorek obsahující buňky a kultivační médium s nejvyšší použitou koncentrací DMSO, resp. NFW (K-DMSO, K-NFW), v nichž byly paklitaxel a karboplatina rozpuštěny. Po 96 hod bylo k jednotlivým vzorkům přidáno 20 μ l reakčního činidla a po 1 hod byla pomocí přístroje Infinite M200 změřena absorbance.

3.4.2.2. Stanovení cytotoxicity pomocí přístroje xCELLigence RTCA DP

Přístroj xCELLigence RTCA DP umožňuje prostřednictvím měření elektrické impedance monitorování proliferace buněk v reálném čase a následné určení cytotoxicity stanovovaných látek (www.aceabio.com).

Při přípravě experimentů bylo postupováno podle doporučení výrobce. Buňky NCI/ADR-RES a OVCAR-3 byly do jamek destičky E-Plate 16 pipetovány v koncentraci 5000 buněk na 100 μ l média, buňky SKOV-3 po 2500 buněk na 100 μ l. Po 18 hod byl k buňkám přidán roztok studované látky; rozsah koncentrací byl určen na základě výsledků získaných pomocí kitu CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Součástí každého experimentu byla i kontrola bez přídavku chemoterapeutika a kontroly K-DMSO, resp. K-NFW.

Při vyhodnocení byly naměřené hodnoty tzv. buněčného indexu normalizovány vzhledem k času před přídavkem chemoterapeutika a vzhledem ke kontrole bez přídavku chemoterapeutika. IC₅₀ bylo stanoveno z křivky závislosti odpovědi na dávce po 24 a 72 hod od aplikace chemoterapeutik.

3.4.3. Inhibice exprese kandidátních genů a proteinů pomocí siRNA

siRNA, nekódující molekuly RNA dlouhé 21 – 23 nukleotidů, zprostředkovávají inhibici exprese genů, jejichž mRNA je komplementární k sekvenci dané siRNA. Tento proces se

podílí na regulaci genové, resp. proteinové exprese v buňkách, avšak je možné ho využít také pro studium funkce vybraných genů (Bernstein E. *et al.*, 2001; Hammond S.M. *et al.*, 2000).

V předkládané práci byla zavedena metodika inhibice exprese genu PRC1 pomocí specifické siRNA. Byly použity chemikálie Silencer Select Pre-Designed siRNA proti PRC1 (číslo siRNA: s17269), kontrolní siRNA Silencer Select GAPDH Positive Control a Silencer Select Negative Control No. 1 a transfekční činidlo Lipofectamine 3000 (vše Invitrogen). V rámci optimalizace bylo testováno množství siRNA proti PRC1, množství kontrolních siRNA i transfekčního činidla; bylo postupováno podle doporučení výrobce.

Pro experimenty byly buněčné linie kultivovány 18 hod v mikrotitrační destičce (24 jamek) v množství 50 000 buněk na 500 μ l příslušného kultivačního média bez antibiotik. Následně byly k buňkám přidány roztoky siRNA proti PRC1 a kontrolních siRNA. Součástí každého experimentu byla také kontrola bez transfekčního činidla a kontrola obsahující transfekční činidlo bez siRNA. Po 48 hod byly buňky trypsinovány, sklizeny do kultivačního média, centrifugovány a promyty ve studeném fosfátovém pufru. Buněčná peleta určená pro izolaci RNA byla rozsuspendována v roztoku TRI Reagent (Sigma-Aldrich) a následně zpracována podle doporučení výrobce. Izolovaná RNA byla rozpuštěna v NFW a skladována při -80 °C. Peleta určená pro izolaci celkového proteinu byla rozsuspendována v lyzačním pufru (3% Triton-X 100; 10mM HEPES, pH 7,4; 0,15M NaCl; 5mM EDTA) s tabletami PhosSTOP a cOmplete ULTRA Tablets (vše Roche) obsahujícími inhibitory fosfatáz, resp. proteáz. Lyzát byl centrifugován a supernatant s rozpuštěnými proteiny byl uložen při -20 °C.

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. Stanovení koncentrace RNA a proteinu i postup stanovení jsou popsány v předchozích kapitolách (kap. 3.2.2. – 3.2.3., s. 41 – 46).

3.4.3.1. Statistické vyhodnocení inhibice exprese PRC1 pomocí siRNA

Expresí genů PRC1 a GAPDH v jednotlivých vzorcích byla vztažena vzhledem k expresi referenčního genu PPIA a vzhledem ke kontrole bez transfekčního činidla (K). Změna exprese byla vypočtena podle následujících vzorců.

$$\Delta\Delta Ct_{PRC1} = 2^{-[(Ct_{PRC1,vzorek} - Ct_{PPIA,vzorek}) - (Ct_{PRC1,K} - Ct_{PPIA,K})]}$$

$$\Delta\Delta Ct_{GAPDH} = 2^{-[(Ct_{GAPDH,vzorek} - Ct_{PPIA,vzorek}) - (Ct_{GAPDH,K} - Ct_{PPIA,K})]}$$

Expres proteinů PRC1 a GAPDH ve vzorcích byla vyhodnocena denzitometricky pomocí programu Image Studio v4.0.21 a vztažena ke kontrole.

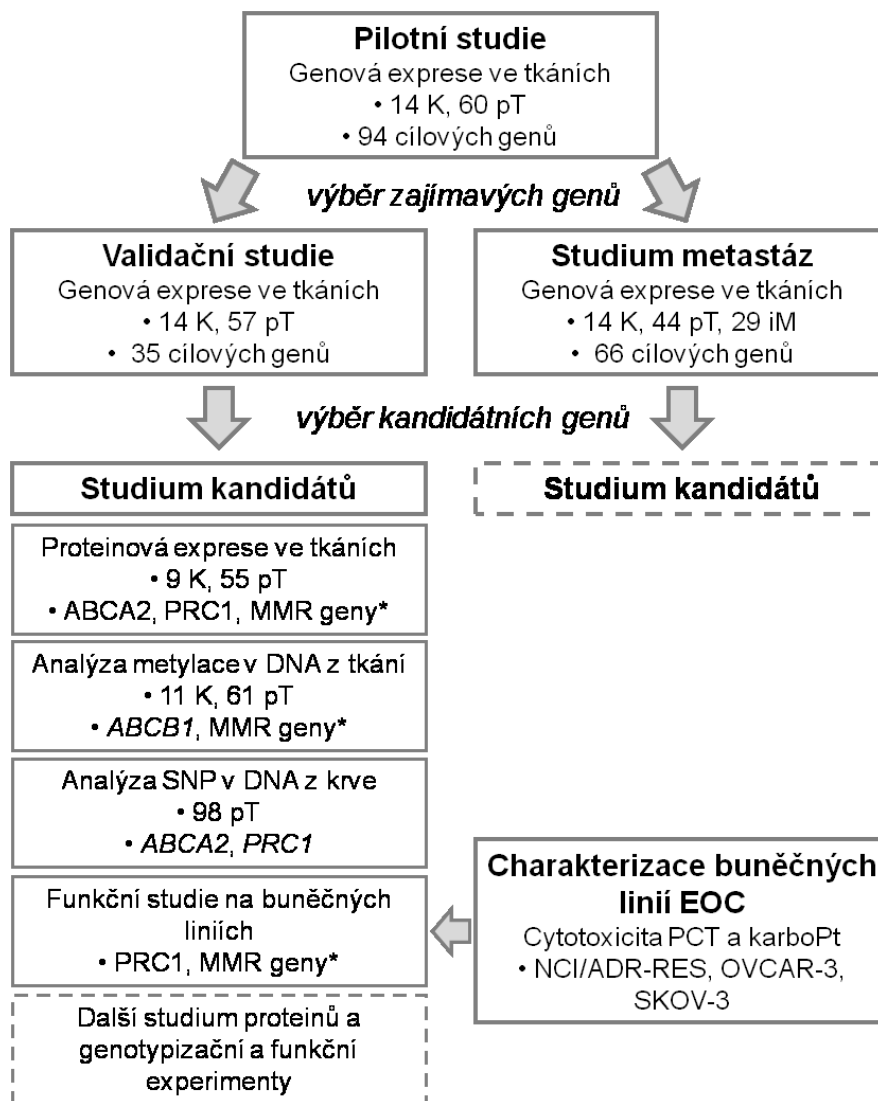
4. VÝSLEDKY

4.1. STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE OVARIÁLNÍM KARCINOMEM

Součástí předkládané práce je studie zabývající se prognostickými a prediktivními markery karcinomu vaječníků provedená na vzorcích tkání (primární karcinomy, intraperitoneální metastázy a kontrolní vzorky) a krve pacientek. Studie byla tvořena několika fázemi, které na sebe vzájemně navazovaly (obr. 10, s. 59). V pilotní fázi studie byly vybrány referenční geny a byla stanovena exprese 94 cílových genů. Na základě zjištěných vztahů mezi genovou expresí a klinickými daty pacientek a také na základě výsledků publikovaných dříve v naší laboratoři (Ehrlichova M. *et al.*, 2013) bylo vybráno 35 genů, jejichž vztah k prognóze pacientek byl ověřen ve validační studii. Význam vybraných kandidátních genů byl dále studován na úrovni proteinové exprese, byl zkoumán vliv metylace a jednonukleotidových polymorfizmů na prognózu pacientek a také byly zavedeny funkční experimenty na buněčných liniích. Validace 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 ovariálního karcinomu.

Vzhledem k tomu, že významnou roli v prognóze pacientek s EOC hrají metastázy, bylo na základě výsledků pilotní studie a dalších studií provedených v naší laboratoři vybráno 66 genů potenciálně významných pro rozvoj metastáz a progresi EOC. Z nich byly v následující fázi (studium metastáz) vybrány kandidátní geny, resp. proteiny, které budou dále zkoumány z hlediska funkce v nádorových buňkách ovariálního karcinomu. Rovněž bude pokračovat i výzkum kandidátů objevených ve validační studii.

Jako součást studie byla zavedena kultivace tří buněčných linií karcinomu ovarii a práce s nimi (stanovení cytotoxicity, inhibice genové exprese pomocí siRNA). Experimenty studující mechanismus působení jednotlivých kandidátů budou na Oddělení toxikogenomiky SZÚ následovat.



Obr. 10: Schéma studie zabývající se prognostickými a prediktivními markery karcinomu vaječníků.

K = kontroly; pT = primární nádor (v případě analýzy DNA z krve se jedná o pacientky, od nichž máme k dispozici primární nádorovou tkáň); iM = intraperitoneální metastáza; PCT = paklitaxel; karboPt = karboplatina.

— fáze, které jsou součástí předkládané práce; - - - fáze, které budou následovat.

*MMR geny byly studovány na Oddělení molekulární biologie nádorů (UEM, AV ČR).

4.1.1. Pilotní studie

V pilotní studii zabývající se ovariálním karcinmem byla v 60 vzorcích primární nádorové tkáně (48 pacientek z FNM, 12 pacientek z FNP) studována exprese 94 cílových genů souvisejících s buněčným transportem, metabolismem léčiv a regulací buněčného cyklu. Jako kontrolní soubor bylo použito 14 vzorků ovariální tkáně, ve kterých nebyly

přítomny maligní buňky. Věk žen v době diagnózy (medián \pm směrodatná odchylka) v souboru kontrol byl $53,5 \pm 13,3$ roku. Charakteristiky pacientek jsou uvedeny v tabulce 7.

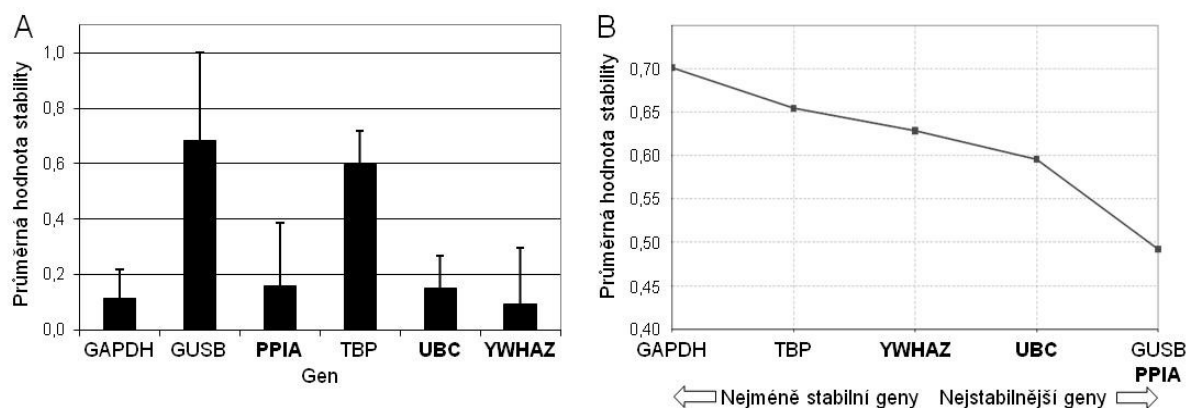
Tab. 7: Charakteristika pacientek, které poskytly vzorky pro pilotní a validační fázi studie zabývající se ovariálním karcinomem. V tabulce (A) jsou uvedeny hodnoty faktoriálních veličin, v tabulce (B) hodnoty veličin kontinuálních.

A	Charakteristika	Pilotní set		Validační set	
		N (%) ^a	N (%) ^a	N (%) ^a	N (%) ^a
<i>FIGO stage</i>					
	nižší (I+II)	10 (18,2)	5 (9,0)		
	vyšší (III+IV)	45 (81,8)	51 (91,0)		
	data nedostupná	5	1		
<i>Grade</i>					
	1+2	16 (27,1)	10 (17,6)		
	3	43 (72,9)	47 (82,5)		
	data nedostupná	1	0		
<i>Histologický typ</i>					
	HGSC	45 (81,8)	54 (94,7)		
	ostatní typy	10 (18,2)	3 (5,3)		
	data nedostupná	5	0		
<i>Vzdálené metastázy</i>					
	M1	4 (8,0)	4 (7,1)		
	M0	46 (92,0)	52 (92,9)		
	data nedostupná	10	1		
<i>Reziduum po operaci</i>					
	ano	35 (59,3)	33 (55,9)		
	ne	24 (40,7)	26 (44,1)		
	data nedostupná	1	1		
B					
		Pilotní set		Validační set	
		Medián \pm SD	N ^b	Medián \pm SD	N ^b
	Věk v době diagnózy	62,5 \pm 11,2	60	57,0 \pm 9,8	57
	Expresí Ki67 ^c	30,0 \pm 25,4	21	25,0 \pm 19,4	57
	PFS	12,5 \pm 8,7	24	13,0 \pm 10,7	29

^aPočet pacientek, v závorce jsou uvedena procenta; ^b počet hodnocených pacientek; ^c data byla dostupná pouze pro pacientky z FNM; PFS – doba přežití do progresu (z angl. progression-free survival); SD – směrodatná odchylka (z angl. standard deviation).

4.1.1.1. Výběr referenčních genů

V pilotní fázi studie byla testována stabilita šesti genů (GAPDH, GUSB, PPIA, TBP, UBC a YWHAZ). V programech NormFinder a geNorm byly jako nejstabilnější vyhodnoceny geny PPIA, UBC a YWHAZ (obr. 11), které byly následně použity jako referenční geny pro normalizaci exprese cílových genů stanovené metodou real-time PCR s relativní kvantifikací.



Obr. 11: Stabilita genové exprese v ovariální tkáni byla testována pomocí programů (A) NormFinder a (B) geNorm. Jako nejstabilnější byly vybrány geny PPIA, UBC a YWHAZ (vyznačeny tučně).

4.1.1.2. Porovnání genové exprese v primárních EOC a kontrolách v pilotní studii

Z 94 genů studovaných v pilotní fázi (viz příloha 1) byla u 12 genů (ABCB5, ABCC7/8/11/12, ABCG5, SLC22A2, SLC22A11, SLC47A2, CYP2C8, CYP3A4, NR1I3) zjištěna velmi nízká exprese pod mezí detekce. Tyto geny proto nebyly dále analyzovány.

U ostatních genů byla pomocí softwaru REST 2009 porovnána hladina jejich exprese v primárních EOC a v kontrolních ovariálních tkáních. U 32 genů (ABCA1/2/3, ABCB11, ABCC1/2/4/5/6/10, ABCD1/2, ABCF2, ABCG1/8, ATP7B, ESR1, GLRX, GPX3, HER2, MSH2, NR0B2, NR1H3, NR1I2, PLK2, PRKCH, SLC22A4, SLC31A1, SLC31A2, SOD2/3, TP53) nebyl zjištěn významný rozdíl, avšak 37 genů mělo v nádorové tkáni signifikantně sníženou a 13 genů naopak zvýšenou expresi. Kromě genů ABCA12 a ATOX1 zůstala tato změna významná i po FDR korekci (tab. 8, s. 62).

Tab. 8: Signifikantní změny v genové expresi v primárních nádorech vaječníků oproti kontrolám zjištěné v pilotní studii.

Gen	<i>p</i> -hodnota	<i>p</i> -hodnota (FDR)	Směr	Gen	<i>p</i> -hodnota	<i>p</i> -hodnota (FDR)	Směr
ABCA7	<0,001	<0,001	K<pT	KIF11	<0,001	<0,001	K<pT
ABCA8	<0,001	<0,001	K>pT	MKI67	<0,001	<0,001	K<pT
ABCA9	<0,001	<0,001	K>pT	MLH1	<0,001	<0,001	K>pT
ABCA10	<0,001	<0,001	K>pT	MLH3	<0,001	<0,001	K>pT
ABCA12	0,038	0,053	K<pT	MSH3	<0,001	<0,001	K>pT
ABCA13	<0,001	<0,001	K<pT	MSH4	<0,001	<0,001	K>pT
ABCB1	<0,001	<0,001	K>pT	MSH6	<0,001	<0,001	K>pT
ABCB2	0,001	0,002	K<pT	NR1H2	<0,001	<0,001	K>pT
ABCB3	0,013	0,019	K<pT	NR1H4	<0,001	<0,001	K>pT
ABCB4	0,003	0,005	K>pT	NR1H1	<0,001	<0,001	K<pT
ABCC3	<0,001	<0,001	K<pT	PLK1	<0,001	<0,001	K<pT
ABCC9	<0,001	<0,001	K>pT	PMS1	0,010	0,015	K>pT
ABCD3	<0,001	<0,001	K>pT	PMS2	0,014	0,020	K>pT
ABCD4	0,024	0,034	K>pT	RXRA	<0,001	<0,001	K>pT
ABCE1	<0,001	<0,001	K>pT	RXRB	<0,001	<0,001	K>pT
ABCF1	0,001	0,002	K>pT	RXRG	0,003	0,005	K>pT
ABCF3	<0,001	<0,001	K>pT	SLC16A14	<0,001	<0,001	K>pT
ABCG2	<0,001	<0,001	K>pT	SLC22A1	0,007	0,011	K>pT
ATOX1	0,046	0,063	K<pT	SLC22A3	<0,001	<0,001	K>pT
ATP7A	<0,001	<0,001	K>pT	SLC22A5	<0,001	<0,001	K>pT
ATP11B	<0,001	<0,001	K>pT	SLC22A18	0,002	0,003	K<pT
EGFR	<0,001	<0,001	K>pT	SLC47A1	<0,001	<0,001	K>pT
ESR2	<0,001	<0,001	K>pT	SOD1	<0,001	<0,001	K>pT
HSP70	0,014	0,020	K>pT	TRAP1	0,006	0,009	K>pT
HSP90AA1	0,001	0,002	K>pT	VEGFA	<0,001	<0,001	K<pT

p-hodnota – hodnota významnosti zjištěná programem REST 2009; *p*-hodnota (FDR) – hodnota významnosti adjustovaná pomocí FDR korekce; směr – směr deregulace exprese; žlutá – snížení exprese v nádorové tkáni; červená – zvýšení exprese v nádorové tkáni v porovnání s kontrolami.

4.1.1.3. Vztah genové exprese ke klinickým datům pacientek v pilotní studii

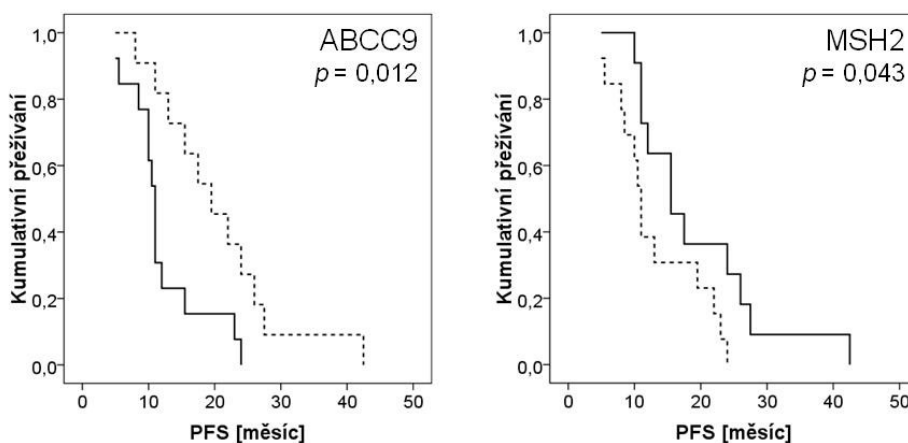
V programu SPSS v16.0 byly sledovány vztahy mezi hladinou genové exprese v nádorech vaječníků a klinickými daty pacientek. Byl hodnocen stage (nižší vs. vyšší, tj. I+II vs. III+IV), grade (1+2 vs. 3), histologický typ (HGSC vs. ostatní typy), exprese proliferačního

markeru Ki67 (podíl buněk exprimujících Ki67 menší vs. větší než 15 %), exprese Ki67 v procentech a přežívání pacientek (PFS).

Výsledky analýz jsou uvedeny v tabulce 9 (s. 64). Řada významných vztahů byla zjištěna zejména pro histologický typ a expresi Ki67. Je zajímavé, že geny ABCC3, ABCG1 a NR1H4 měly vyšší expresi v HGSC a jejich exprese negativně korelovala s hladinou Ki67, zatímco u PLK1 byl zjištěn opačný směr vztahu s oběma charakteristikami. V případě genů ABCB1, ABCC3, ABCD2 a ABCG1 byl navíc zjištěn signifikantní vztah mezi hladinou mRNA a expresí markeru Ki67 při hodnocení pomocí hodnoty cut off 15 % i při hodnocení Ki67 v procentech. Rovněž vyšší exprese ABCA12 asociovala s HGSC typem, zároveň však také s nižším stádiem onemocnění.

Analýzou přežívání bylo zjištěno, že exprese genu ABCC9 negativně koreluje s délkou PFS, zatímco exprese genu MSH2 koreluje pozitivně (obr. 12). Po aplikaci multiparametrické Coxovy regrese adjustované na grade, typ nádoru (HGSC vs. ostatní typy) a přítomnost reziduálního nádoru po operaci zůstal u ABCC9 vztah s PFS pacientek signifikantní, avšak u MSH2 již nikoliv (tab. 9B, s. 64).

Celkem bylo v pilotní studii nalezeno 34 genů, jejichž hladina exprese signifikantně souvisela se stagem, stupněm diferenciací nádorových buněk, histologickým typem, expresí markeru Ki67 nebo délkou přežívání pacientek. Význam těchto genů pro nádory vaječníků byl následně ověřen ve validační studii a spolu s dalšími geny byl studován také ve vztahu k intraperitoneálním metastázám EOC.



Obr. 12: Signifikantní vztah mezi hladinou genové exprese a PFS byl v pilotní studii zjištěn u ABCC9 a MSH2.

— vyšší exprese; - - - nižší exprese.

Tab. 9: Signifikantní vztahy mezi genovou expresí a (A) klinickými daty, (B) PFS pacientek s EOC zjištěné v pilotní studii.

A	Charakteristika/Gen	<i>p</i> -hodnota	Směr	Charakteristika/Gen	<i>p</i> -hodnota	Směr
	<i>Vyšší stage</i>			<i>HGSC typ</i>		
	ABCA3	0,018	↑	ABCA12	0,008	↑
	ABCA12	0,045	↓	ABCC3	0,015	↑
	ATP7A	0,047	↑	ABCC6	0,015	↑
	ATP7B	0,034	↑	ABCD3	0,007	↑
	<i>Grade 3</i>			ABCG1	0,038	↑
	ABCA2	0,038	↓	ESR2	0,021	↑
	MSH2	0,033	↓	HER2	0,050	↑
	NR1I2	0,014	↓	MLH3	0,044	↑
	SOD2	0,009	↑	NR0B2	0,001	↑
	TP53	0,011	↓	NR1H4	0,004	↑
	<i>Vyšší exprese Ki67</i>			PLK1	0,036	↓
	ABCA8	0,007	↓	SLC22A5	0,004	↑
	ABCA9	0,044	↓	SOD1	0,037	↑
	ABCB1	0,005	↓	SOD3	0,007	↑
	ABCC3	0,009	↓	<i>Exprese Ki67 > 15 %</i>		
	ABCD2	0,010	↓	ABCA10	0,049	↓
	ABCG1	0,047	↓	ABCB1	0,049	↓
	EGFR	0,021	↓	ABCC3	0,025	↓
	GLRX	0,018	↓	ABCD2	0,028	↓
	MKI67	0,002	↑	ABCG1	0,039	↓
	MLH1	0,033	↓	ABCG2	0,049	↓
	NR1H4	0,032	↓	SLC16A14	0,044	↓
	PLK1	0,000	↑			

p-hodnota - hodnota významnosti zjištěná Mann-Whitneyho nebo Spearmanovým testem; směr – směr vztahu mezi genovou expresí a charakteristikou pacientek; ↑ - vyšší genová exprese; ↓ - nižší genová exprese ve srovnání se skupinou s nižším stádiem, grade 1+2, jiným histologickým typem než HGSC, se vzorky s vyšší expresí Ki67 a Ki67 ≤ 15 %, respektive.

B	Gen	<i>p</i> -hodnota	<i>p</i> -hodnota (Cox)	HR	95% CI
	ABCC9	0,012	0,049	2,86	1,01 – 8,06
	MSH2	0,043	NS	—	—

p-hodnota – hodnota významnosti zjištěná log-rank testem; *p*-hodnota (Cox) – hodnota významnosti adjustovaná pomocí Coxovy regrese; HR – poměr rizik (z angl. hazard ratio); 95% CI – 95% interval spolehlivosti (z angl. confidence interval); NS – nevýznamný (z angl. nonsignificant).

4.1.2. Validací studie

Na základě výsledků pilotní studie a dalších výsledků získaných v naší laboratoři bylo vybráno 35 genů (viz příloha 1), jejichž exprese byla stanovena ve validačním setu pacientek s primárním EOC s cílem ověřit vztahy zjištěné v pilotní fázi. Validací set byl tvořen 57 pacientkami léčenými ve FNP; jejich charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 7 (s. 60). Jako kontrolní soubor bylo použito stejných 14 vzorků jako v pilotní fázi.

4.1.2.1. Porovnání genové exprese v primárních EOC a kontrolách ve validační studii

V programu REST 2009 byly zhodnoceny rozdíly v hladině genové exprese mezi vzorky EOC a kontrolními ovarii. Expres 12 genů (ABCA2/3, ABCC6, ABCD2/3, ABCG1, ATP7B, GLRX, HER2, NR1I2, SOD2, TP53) nebyla v nádorech změněna. Sedmnáct genů mělo v nádorech nižší, šest genů naopak vyšší expresi ve srovnání s kontrolami. Změna v expresi všech těchto genů zůstala významná i po FDR korekci (tab. 10).

Tab. 10: Signifikantní změny v expresi genů v primárních nádorech vaječnicků oproti kontrolám zjištěné ve validační studii.

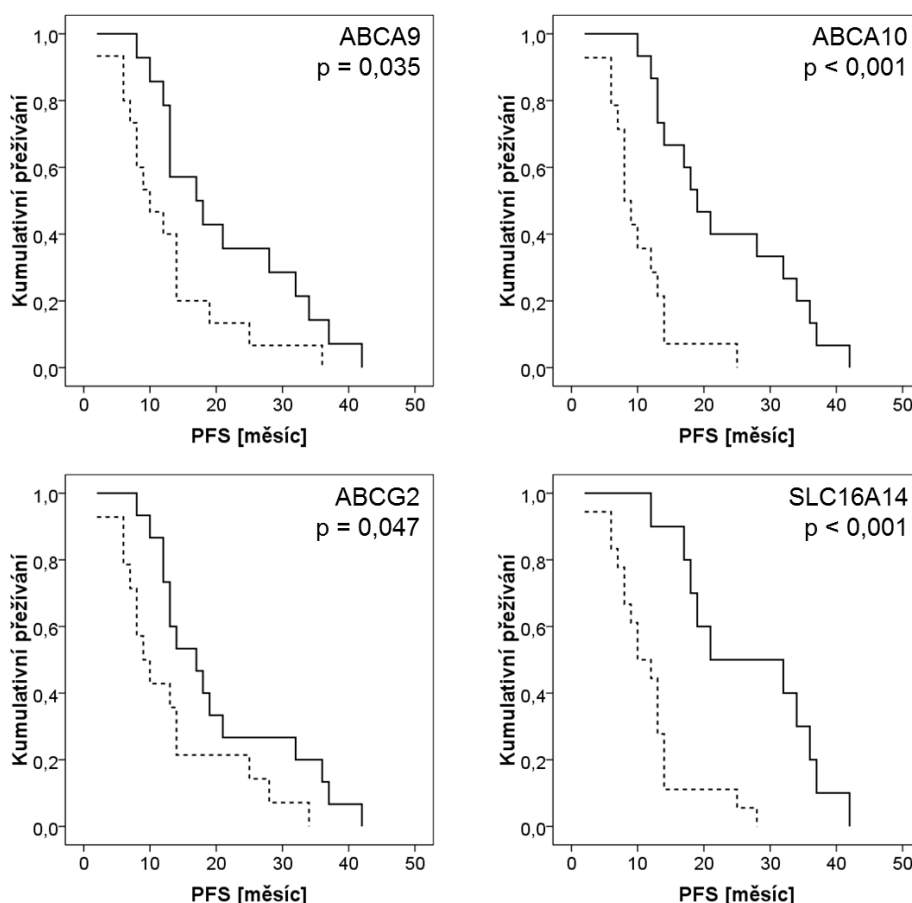
Gen	<i>p</i> -hodnota	<i>p</i> -hodnota (FDR)	Směr	Gen	<i>p</i> -hodnota	<i>p</i> -hodnota (FDR)	Směr
ABCA8	<0,001	<0,001	K>pT	MLH1	0,003	0,004	K>pT
ABCA9	<0,001	<0,001	K>pT	MLH3	<0,001	<0,001	K>pT
ABCA10	<0,001	<0,001	K>pT	MSH2	0,004	0,006	K<pT
ABCA12	0,028	0,038	K<pT	NR0B2	0,029	0,039	K>pT
ABCB1	<0,001	<0,001	K>pT	NR1H4	<0,001	<0,001	K>pT
ABCC3	<0,001	<0,001	K<pT	PLK1	<0,001	<0,001	K<pT
ABCC9	<0,001	<0,001	K>pT	PRC1*	<0,001	<0,001	K<pT
ABCG2	<0,001	<0,001	K>pT	SLC16A14	<0,001	<0,001	K>pT
ATP7A	<0,001	<0,001	K>pT	SLC22A5	<0,001	<0,001	K>pT
EGFR	<0,001	<0,001	K>pT	SOD1	<0,001	<0,001	K>pT
ESR2	<0,001	<0,001	K>pT	SOD3	0,027	0,038	K>pT
MKI67	<0,001	<0,001	K<pT				

p-hodnota – hodnota významnosti zjištěná programem REST 2009; *p*-hodnota (FDR) – hodnota významnosti adjustovaná pomocí FDR korekce; směr – směr deregulace exprese; žlutá – snížení exprese v nádorové tkáni; červená – zvýšení exprese v nádorové tkáni v porovnání s kontrolami; tučně – geny, jejichž exprese byla shodně deregulována v pilotní i validační fázi studie; *gen PRC1 nebyl v pilotní fázi hodnocen.

4.1.2.2. Vztah genové exprese ke klinickým datům pacientek ve validační studii

Vztahy genové exprese a klinických dat pacientek s EOC byly analyzovány v programu SPSS v16.0 stejným způsobem jako v pilotní fázi studie. Vzhledem k tomu, že > 90 % pacientek mělo nádor v pokročilém stádiu (stage III+IV) nebo HGSC typ (viz tab. 7, s. 60), tyto charakteristiky nebylo možné hodnotit.

Ve validační studii bylo nalezeno devět genů, jejichž hladina exprese signifikantně souvisela se stupněm diferenciací nádoru, expresí Ki67 nebo s PFS (tab. 11, s. 67). Se stupněm diferenciací asociovala exprese genů ABCA2 a ESR2. Exprese ABCA2, ABCA10, MKI67, PLK1 a PRC1 korelovala s hladinou markeru Ki67. Dále byla zjištěna vyšší exprese genů ABCA9, ABCA10, ABCG2 a SLC16A14 u pacientek s delším PFS; kromě genu ABCA9 zůstal tento vztah významný i po aplikaci Coxovy regrese adjustované na stage, grade a přítomnost vzdálených metastáz (tab. 11B, s. 67; obr. 13)



Obr. 13: Signifikantní vztah mezi hladinou genové exprese a PFS byl ve validační studii zjištěn u ABCA9, ABCA10, ABCG2 a SLC16A14.

— vyšší exprese; - - - nižší exprese.

Tab. 11: Signifikantní vztahy mezi genovou expresí a (A) klinickými daty, (B) PFS pacientek s EOC zjištěné ve validační studii.

A	Charakteristika/Gen	<i>p</i> -hodnota	Směr
	<i>Grade 3</i>		
	ABCA2	0,012	↓
	ESR2	0,010	↓
	<i>Vyšší exprese Ki67</i>		
	ABCA2	0,017	↓
	ABCA10	0,025	↓
	MKI67	0,015	↑
	PLK1	0,013	↑
	PRC1*	0,036	↑

p-hodnota - hodnota významnosti zjištěná Mann-Whitneyho nebo Spearmanovým testem; směr – směr vztahu mezi genovou expresí a charakteristikou pacientek; ↑ - vyšší genová exprese; ↓ - nižší genová exprese ve srovnání se skupinou s grade 1+2 a se vzorky s vyšší expresí Ki67, respektive; tučně – vztahy signifikantní v pilotní i validační fázi studie; *gen PRC1 nebyl v pilotní fázi hodnocen.

B	Gen	<i>p</i> -hodnota	<i>p</i> -hodnota (Cox)	HR	95% CI
	ABCA9	0,035	0,060	0,46	0,20 – 1,04
	ABCA10	<0,001	0,001	0,17	0,06 – 0,49
	ABCG2	0,047	0,038	0,41	0,18 – 0,95
	SLC16A14	<0,001	0,003	0,24	0,09 – 0,61

p-hodnota – hodnota významnosti zjištěná log-rank testem; *p*-hodnota (Cox) – hodnota významnosti adjustovaná pomocí Coxovy regrese; HR – poměr rizik; 95% CI – 95% interval spolehlivosti.

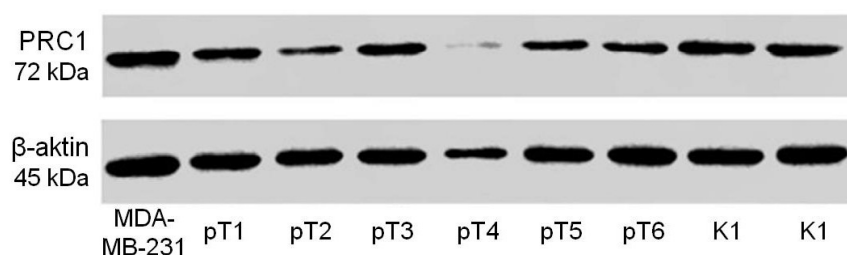
4.1.3. Studium kandidátních genů a proteinů

Na základě výsledků získaných v pilotní a validační fázi studie zabývající se ovariálním karcinomem a také na základě výsledků projektů, které dlouhodobě probíhají v naší laboratoři, byly vybrány kandidátní geny. Jejich úloha v EOC byla dále studována na úrovni proteinové exprese (ABCA2, PRC1), byl zkoumán výskyt a vliv SNP na prognózu pacientek (*ABCA2*, *PRC1*) a také byla stanovena úroveň metylace promotoru genu *ABCB1* ve vztahu ke klinickým datům pacientek. Kromě toho byla zavedena metodika inhibice transkripce genu PRC1 v buněčných liniích karcinomu ovarií, která bude využita v následujících funkčních studiích.

4.1.3.1. Expres proteinů ABCA2 a PRC1 v EOC

Pro analýzu exprese ve vzorcích primárních tkání EOC byly vybrány proteiny ABCA2 a PRC1, avšak metodiku detekce ABCA2 pomocí imunoblotu se nepodařilo zavést. Analyzována a hodnocena proto byla pouze exprese proteinu PRC1, a to v 55 vzorcích primárních nádorů vaječníků a v devíti kontrolách (byly použity vzorky z validačního souboru).

Příklad výsledků imunodetekce PRC1 a kontrolního proteinu β -aktinu je uveden na obrázku 14. Expres PRC1 byla normalizována vzhledem k expresi β -aktinu a referenčního vzorku buněčné linie MDA-MB-231 a následné analýzy byly provedeny v programu SPSS v16.0. Porovnáním hodnot exprese v kontrolách a nádorech bylo zjištěno, že ačkoliv je exprese proteinu PRC1 v nádorech vyšší než v kontrolách, rozdíl není signifikantní ($p = 0,220$). Porovnáním hladiny proteinové a genové exprese PRC1 rovněž nebyla zjištěna významná korelace. Dále byly analyzovány vztahy mezi hladinou proteinové exprese a klinickými daty pacientek (byla hodnocena stejná klinická data jako ve validační studii, viz kap. 4.1.2.2., s. 66). Expres PRC1 neasociovala s žádnou z charakteristik.



Obr. 14: Příklad imunoblotu proteinu PRC1 a kontrolního proteinu β -aktinu. MDA-MB-231 – referenční vzorek; pT – vzorky primárního EOC; K – kontrolní vzorky.

4.1.3.2. Metylace promotorové oblasti genu ABCB1

Úroveň metylace promotorové oblasti genu *ABCB1* byla stanovena v 61 vzorcích tkáně získaných od pacientek s karcinomem ovarií léčených ve FNM a v 11 kontrolách. Pacientky byly rozděleny podle toho, zda jim před operací byla indikována neoadjuvantní chemoterapie ($n = 11$), nebo se jednalo o pacientky před chemoterapeutickou léčbou ($n = 50$; tab. 12, s. 69).

Tab. 12: Charakteristika pacientek s EOC, které poskytly vzorky pro analýzu metylace genu *ABCB1*. V tabulce (A) jsou uvedeny hodnoty faktoriálních veličin, v tabulce (B) hodnoty veličin kontinuálních.

A	Charakteristika	Set po NACT N (%)^a	Set před chemoterapií N (%)^a
	<i>FIGO stage</i>		
	nižší (I+II)	0 (0,0)	4 (8,9)
	vyšší (III+IV)	11 (100,0)	41 (91,1)
	data nedostupná	0	5
	<i>Grade</i>		
	1+2	0 (0,0)	10 (22,2)
	3	11 (100,0)	35 (77,8)
	data nedostupná	0	5
	<i>Histologický typ</i>		
	HGSC	11 (100,0)	40 (88,9)
	ostatní typy	0 (0,0)	5 (11,1)
	data nedostupná	0	5

B	Set po NACT		Set před chemoterapií	
	Medián ± SD	N^b	Medián ± SD	N^b
Exprese Ki67	31,8 ± 17,4	11	39,0 ± 24,0	35

^aPočet pacientek, v závorce jsou uvedena procenta; ^bpočet hodnocených pacientek; NACT – neoadjuvantní chemoterapie; SD – směrodatná odchylka (z angl. standard deviation).

Statistickým vyhodnocením v softwaru SPSS v16.0 bylo ukázáno, že oproti kontrolám jsou nádorové vzorky v 85 % případů hypermetylovány. Míra metylace promotoru *ABCB1* byla následně porovnána s expresí genu *ABCB1*. V souboru vzorků před léčbou korelovala vyšší hladina metylace s nižší genovou expresí ($p = 0,001$), po NACT už signifikantní korelace pozorována nebyla.

V souboru tkání bez předchozí chemoterapie byla rovněž zjištěna asociace mezi vyšší úrovní metylace a časnými stádii onemocnění (stage I+II; $p = 0,028$). Jiné vztahy nebyly pozorovány ani v jednom ze studovaných souborů.

4.1.3.3. SNP genů ABCA2 a PRC1

Metodami alelické diskriminace a HRM analýzy byly ve vzorcích krve 98 pacientek s karcinomem ovaria léčených ve FNM (tab. 13) stanoveny vybrané polymorfismy genů *ABCA2* (n = 3) a *PRC1* (n = 6). Zjištěné distribuce fenotypů a frekvence jednotlivých alel jsou uvedeny v tabulce 14 (s. 71).

Tab. 13: Charakteristika pacientek, které poskytly vzorky pro analýzu vybraných SNP v genech *ABCA2* a *PRC1*. V tabulce (A) jsou uvedeny hodnoty faktoriálních veličin, v tabulce (B) hodnoty veličin kontinuálních.

A	Charakteristika	N [%]^a
	<i>FIGO stage</i>	
	nižší (I+II)	9 (9,8)
	vyšší (III+IV)	83 (92,2)
	data nedostupná	6
	<i>Grade</i>	
	1+2	19 (19,6)
	3	78 (80,4)
	data nedostupná	1
	<i>Histologický typ</i>	
	HGSC	81 (85,3)
	ostatní typy	14 (14,7)
	data nedostupná	3
	<i>Vzdálené metastázy</i>	
	M1	8 (9,0)
	M0	81 (91,0)
	data nedostupná	9
B	Medián ± SD	N^b
	Věk v době diagnózy	59,5 ± 10,8 98
	Expresse Ki67 [%]	36,9 ± 21,8 71
	PFS [měsíc]	27,9 ± 17,4 45

^aPočet pacientek, v závorce jsou uvedena procenta; ^bpočet hodnocených pacientek; PFS – doba přežití do progresu (z angl. progression-free survival); SD – směrodatná odchylka (z angl. standard deviation).

Tab. 14: Distribuce genotypů a frekvence alel genů *ABCA2* a *PRCI* ve vzorcích karcinomu vaječníků stanovené metodou (A) alelické diskriminace, (B) HRM.

A SNP <i>ABCA2</i> N (%) ^a Frekvence alel (%)			SNP <i>PRCI</i> N (%) ^a Frekvence alel (%)		
rs2271862			rs2290203		
A/A	49 (50,0)	A = 69,9 G = 30,1	A/A	3 (3,1)	A = 21,0 G = 79,0
A/G	39 (39,8)		G/A	31 (31,6)	
G/G	10 (10,2)		G/G	64 (65,3)	
rs7048567			rs8042680		
G/G	47 (48,0)	G = 68,9 A = 31,1	C/C	44 (44,9)	C = 67,0 A = 33,0
G/A	41 (41,8)		C/A	41 (41,8)	
A/A	10 (10,2)		A/A	13 (13,3)	
rs908832			rs11852999		
G/G	93 (94,9)	G = 97,4 A = 2,6	C/C	76 (79,2)	C = 93,0 T = 7,0
G/A	5 (5,1)		C/T	20 (20,8)	
A/A	0 (0,0)		T/T	0 (0,0)	

B SNP <i>PRCI</i> N (%) ^a Frekvence alel (%)		
rs12910825		
A/A	38 (38,8)	A = 62,2 G = 37,8
G/A	46 (46,9)	
G/G	14 (14,3)	
rs8028856		
A/A	50 (52,6)	A = 73,7 G = 26,3
A/G	40 (42,1)	
G/G	5 (5,3)	
rs8031684		
T/T	64 (57,1)	T = 81,6 A = 18,4
T/A	27 (27,6)	
A/A	4 (15,3)	

^aPočet pacientek s danou alelou, v závorce jsou uvedena procenta.

Frekvence jednotlivých genotypů, resp. alel byly v programu SPSS v16.0 porovnány s klinickými daty pacientek; signifikantní výsledky jsou uvedeny v tabulce 15 (s. 72). Se stádiem EOC signifikantně asocioval výskyt dvou SNP v genu *PRCI*. Zatímco variantní genotyp A/A a alela A SNP rs2290203 a genotyp G/G rs8028856 se významně častěji vyskytovaly u pacientek se stádiem I nebo II (protektivní charakter), alela G SNP rs2290203 a alela A SNP rs8028856 v genu *PRCI* asociovaly s horší prognózou. Podobně, alela T SNP rs8031684 v genu *PRCI* byla častější u pacientek s HGSC typem EOC

a alela A SNP rs908832 v genu *ABCA2* u pacientek s vyšším stupněm diferenciacie nádorových buněk (grade 3). Mezi expresí proliferáčního markeru Ki67 a studovanými genotypy, resp. alelami nebyl zjištěn žádný signifikantní vztah.

Tab. 15: Signifikantní vztahy mezi studovanými polymorfismy genů *ABCA2* a *PRCI* a (A) klinickými daty, (B) PFS pacientek s EOC.

A	Charakteristika/SNP	<i>p</i> -hodnota	OR	95% CI
Nižší vs. vyšší stage				
rs2290203 (SNP <i>PRCI</i>)				
	A/A	0,005	0,02	0 – 0,29
	Alela A	0,017	0,14	0,03 – 0,71
	Alela G	0,014	23,43	1,88 – 291,63
rs8028856 (SNP <i>PRCI</i>)				
	G/G	0,003	0,03	0 – 0,3
	Alela A	0,003	19,5	2,71 – 140,18
Grade 1+2 vs. 3				
rs908832 (SNP <i>ABCA2</i>)				
	G/A	0,023	0,07	0,01 – 0,69
	Alela A	0,023	0,07	0,01 – 0,69
HGSC vs. ostatní typy				
rs8031684 (SNP <i>PRCI</i>)				
	A/A	0,045	0,09	0,01 – 0,95
	Alela T	0,039	11,37	1,12 – 115,56
B				
SNP	<i>p</i> -hodnota	<i>p</i> -hodnota (Cox)	HR	95% CI
rs2271862 (SNP <i>ABCA2</i>)				
G/G	0,021	0,029	0,29	0,1 – 0,89
Alela A	0,042	NS		
rs7048567 (SNP <i>ABCA2</i>)				
A/A	0,032	NS		
Alela G	0,042	NS		

p-hodnota – hodnota významnosti zjištěná (A) pomocí kontingenčních tabulek a Mantel-Haenszelovým testem, (B) log-rank testem; OR – poměr šancí (z angl. odds ratio); *p*-hodnota (Cox) – hodnota významnosti adjustovaná pomocí Coxovy regrese; HR – poměr rizik (z angl. hazard ratio); 95% CI – 95% interval spolehlivosti (z angl. confidence interval); NS – nevýznamný (z angl. nonsignificant).

S délkou PFS pacientek koreloval zejména výskyt polymorfismu rs2271862 genu *ABCA2* (variantní genotyp G/G), který byl signifikantní i po aplikování Coxovy regrese a jehož výskyt má vzhledem k přežívání pacientek protektivní charakter. Vzhledem k výsledkům log-rank testu byla v programu HaploView v4.2 zhodnocena síla vazby mezi studovanými polymorfismy genu *ABCA2*. Bylo zjištěno, že síla vazebné nerovnováhy mezi SNP rs2271862 a rs7048567 dle D' skóre je 0,97.

Výskyt genotypů jednotlivých SNP byl také posouzen vzhledem k hladině genové a proteinové exprese (exprese proteinu pouze v případě PRC1); nebyl zjištěn žádný signifikantní výsledek. Potenciální funkční význam studovaných polymorfismů byl však zkoumán také pomocí programu RegulomeDB. Tři SNP genu *PRC1* (rs12910825, rs8042680, rs2290203) podle výsledků této analýzy pravděpodobně ovlivňují vazbu transkripčních faktorů a tedy i genovou expresi PRC1.

4.1.4. Studium intraperitoneálních metastáz EOC

Z výsledků pilotní studie zabývající se karcinomem ovaria a z výsledků dalších projektů probíhajících v naší laboratoři bylo vybráno 66 genů (viz příloha 1, s. X) potenciálně významných pro progresi EOC a rozvoj metastáz. Exprese těchto genů byla stanovena v souboru 44 primárních nádorů vaječnicků a 29 intraperitoneálních EOC metastáz, poskytnutých pacientkami léčenými ve FNP, a ve 14 kontrolních ovariálních tkáních. Klinické charakteristiky pacientek jsou uvedeny v tab. 16 (s. 74).

Tab. 16: Charakteristika pacientek, které poskytly vzorky pro studium intraperitoneálních metastáz ovariálního karcinomu. V tabulce (A) jsou uvedeny hodnoty faktoriálních veličin, v tabulce (B) hodnoty veličin kontinuálních.

A	Charakteristika	Primární EOC		EOC metastázy	
		N (%) ^a		N (%) ^a	
<i>FIGO stage</i>					
	nižší (I+II)	13 (30,2)		0 (0,0)	
	vyšší (III+IV)	30 (69,8)		28 (100,0)	
	data nedostupná	1		1	
<i>Grade</i>					
	1+2	9 (21,4)		1 (3,8)	
	3	33 (78,6)		25 (96,2)	
	data nedostupná	2		3	
<i>Histologický typ</i>					
	HGSC	30 (68,2)		22 (84,6)	
	ostatní typy	14 (31,8)		4 (15,4)	
	data nedostupná	0		3	
<i>Citlivost vůči chemoterapii</i>					
	rezistentní	5 (19,2)		7 (38,9)	
	střední	5 (19,2)		5 (27,8)	
	senzitivní	16 (61,5)		6 (33,3)	
	data nedostupná	18		11	
<hr/>					
B		Primární EOC		EOC metastázy	
		Medián ± SD	N ^b	Medián ± SD	N ^b
	Věk v době diagnózy	62,5 ± 9,9	44	62,0 ± 12,7	29
	PFS	15,0 ± 10,3	41	12,0 ± 8,9	21

^aPočet pacientek, v závorce jsou uvedena procenta; ^bpočet hodnocených pacientek; PFS – doba přežití do progresu (z angl. progression-free survival); SD – směrodatná odchylka (z angl. standard deviation).

4.1.4.1. Porovnání genové exprese v kontrolách, primárních EOC a intraperitoneálních metastázách

Rozdíly v expresi cílových genů mezi jednotlivými typy tkání byly posouzeny pomocí programu SPSS v16.0. Pomocí Mann-Whitneyho testu byly hodnoceny rozdíly mezi expresí v primárních nádorech a intraperitoneálních metastázách. Pro posouzení signifikantních změn v řadě kontroly – primární EOC – metastázy byl aplikován Kruskal-Wallisův test. Výsledky jednotlivých analýz jsou uvedeny v tabulce 17 (s. 75).

Tab. 17: Signifikantní změny v genové expresi v (A) primárních nádorech a intraperitoneálních metastázách vaječníků, (B) v kontrolách, primárních nádorech a metastázách.

Gen	<i>p</i> -hodnota	<i>p</i> -hodnota (FDR)	Směr	Gen	<i>p</i> -hodnota	<i>p</i> -hodnota (FDR)	Směr
A) Primární EOC vs. metastázy							
ABCA1	0,010	0,074	pT<iM	ESR2	0,001	0,018	pT>iM
ABCA7	0,001	0,018	pT<iM	GLRX	0,001	0,018	pT<iM
ABCB2	0,021	0,104	pT<iM	MSH2	0,016	0,086	pT>iM
ABCC2	0,001	0,018	pT<iM	NR1H4	0,005	0,054	pT>iM
ABCC3	0,045	0,197	pT<iM	NR1I1	0,007	0,067	pT<iM
ABCC9	0,014	0,083	pT<iM	SLC31A2	<0,001	0,009	pT<iM
ABCD1	0,022	0,104	pT<iM	SOD2	0,010	0,074	pT<iM
ABCD2	0,011	0,074	pT<iM				
B) Kontroly vs. primární EOC vs. metastázy							
ABCA7	<0,001	<0,001	K<pT<iM	ABCG2	<0,001	<0,001	K>pT>iM
ABCA10	<0,001	<0,001	K>pT>iM	ESR2	<0,001	<0,001	K>pT>iM
ABCA12	0,037	0,057	K<pT<iM	MLH3	<0,001	<0,001	K>pT>iM
ABCA13	<0,001	0,001	K<pT<iM	NR1H4	<0,001	<0,001	K>pT>iM
ABCB2	0,002	0,003	K<pT<iM	NR1I1	<0,001	<0,001	K<pT<iM
ABCB3	<0,001	0,001	K<pT<iM	PMS1	0,001	0,003	K>pT>iM
ABCB11	0,027	0,042	K<pT<iM	SLC16A14	<0,001	<0,001	K>pT>iM
ABCC3	<0,001	<0,001	K<pT<iM	SLC22A5	0,002	0,004	K>pT>iM
ABCD3	<0,001	<0,001	K>pT>iM	SLC22A18	0,013	0,024	K<pT<iM
ABCE1	<0,001	<0,001	K>pT>iM	SLC31A1	0,009	0,018	K<pT<iM
ABCF3	<0,001	<0,001	K>pT>iM	TRAP1	<0,001	<0,001	K>pT>iM

p-hodnota – hodnota významnosti zjištěná programem SPSS v16.0; *p*-hodnota (FDR) – hodnota významnosti adjustovaná pomocí FDR korekce; směr – směr deregulace exprese; žlutá – snížení exprese v iM v porovnání s pT, respektive v řadě K – pT – M; červená – zvýšení exprese v iM v porovnání s pT, respektive v řadě K – pT – M. Tučně jsou zvýrazněny geny, které byly konzistentně deregulovány v porovnání (A) pT vs. iM, (B) K vs. pT vs. iM.

V primárních nádorech a metastázách nebyl zjištěn rozdíl v expresi u 51 genů (ABCA2/3/8/9/10/12/13, ABCB1/3/4/11, ABCC1/4/5/6/10, ABCD3/4, ABCE1, ABCF1/2/3, ABCG1/2/8, ATOX1, ATP7A/B, ATP11B, EGFR, HER2, MKI67, MLH1, MLH3, NR0B2, NR1I2, PLK1/2, PMS1, PRC1, SLC16A14, SLC22A1/3/4/5/18, SLC31A1, SLC47A1, SOD3, TP53, TRAP1). Tři geny měly sníženou a 12 genů mělo

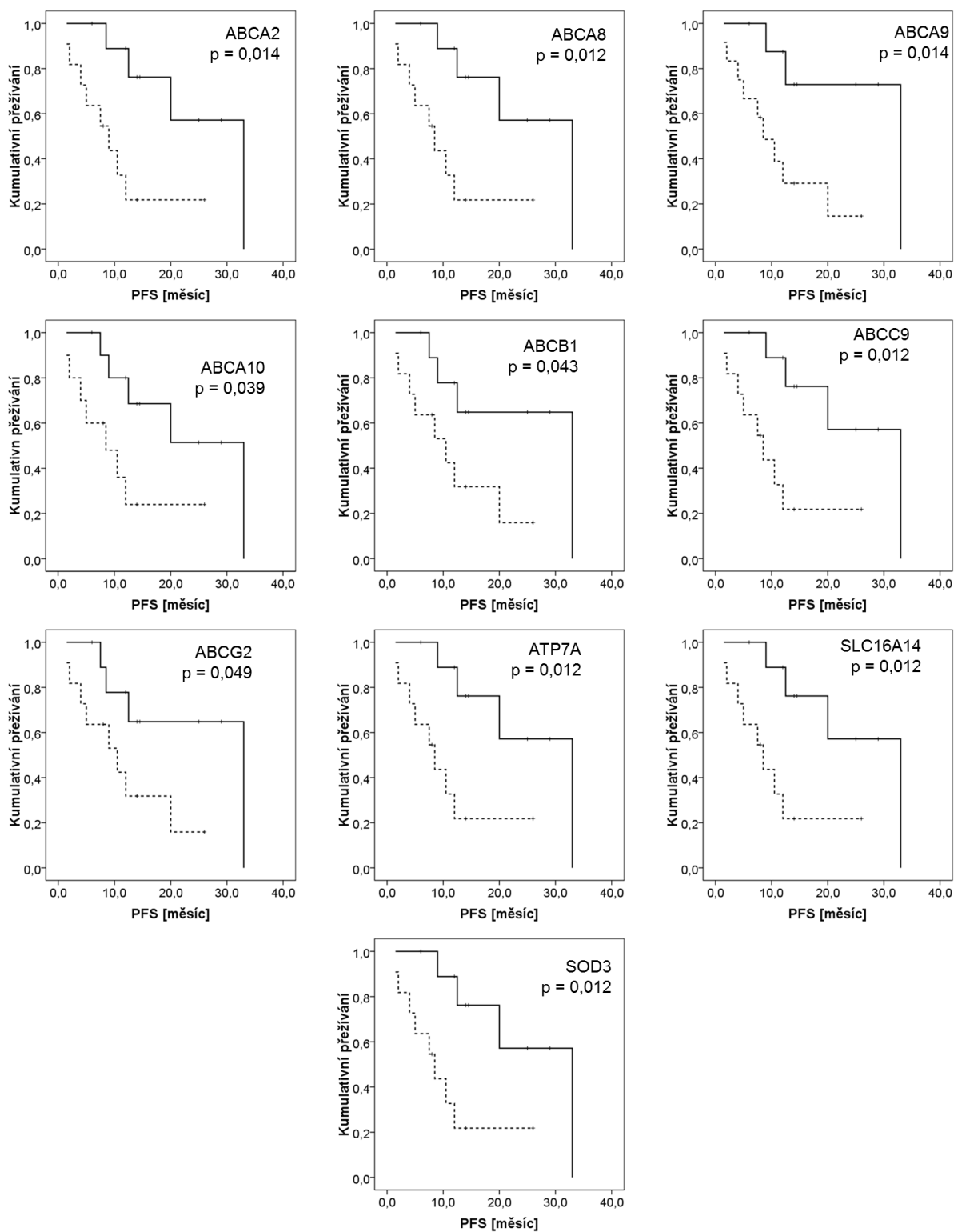
zvýšenou expresi v metastázách oproti primárním nádorům. Pouze pět z těchto změn zůstalo významných po aplikování FDR korekce (tab. 17A, s. 75).

V řadě kontroly – primární nádory – metastázy (K – pT – iM) nebyla významně změněna exprese 44 (ABCA1/2/3/8/9, ABCB1/4, ABCC1/2/4/5/6/9/10, ABCD1/2/4, ABCF1/2, ABCG1/8, ATOX1, ATP7A/B, ATP11B, EGFR, GLRX, HER2, MKI67, MLH1, MSH2, NR0B2, NR1I2, PLK1/2, PRC1, SLC22A1/3/4, SLC31A2, SLC47A1, SOD2/3, TP53) ze studovaných genů. Dvanáct genů mělo sníženou expresi v řadě K > pT > iM, 10 genů mělo naopak zvýšenou expresi v tomto pořadí (K < pT < iM). Kromě deregulace exprese genu ABCA12 zůstaly všechny tyto změny signifikantní i po FDR korekci (tab. 17B, s. 75).

4.1.4.2. Vztah genové exprese ke klinickým datům pacientek s intraperitoneálními EOC metastázami

Vztahy genové exprese a klinických dat pacientek s EOC metastázami byly analyzovány v programu SPSS v16.0. Vzhledem k tomu, že téměř všechny pacientky měly vyšší stage a grade 3, tyto charakteristiky nebylo možné hodnotit. Hodnocen byl histologický typ (HGSC vs. ostatní typy), dále přežívání pacientek (PFS) a citlivost pacientek vůči chemoterapii. Pro hodnocení rezistence byly pacientky rozděleny na ty, u nichž se relaps, progresse nebo úmrtí objevily za méně než šest měsíců (rezistentní), za více než šest měsíců a zároveň méně než 12 měsíců (střední) nebo za více než 12 měsíců (senzitivní) od ukončení adjuvantní chemoterapie (Cassidy J. *et al.*, 2010). Zjištěné vztahy jsou uvedeny v tab. 18A (s. 78).

Žádný z genů neasocioval s rezistentním fenotypem, zato čtyři geny (ABCA2, ABCF3, ABCG8, PMS1) měly signifikantně vyšší expresi v HGSC typu v porovnání s ostatními typy EOC. Dále byla zjištěna pozitivní korelace mezi hladinou exprese a PFS pacientek u genů ABCA2/8/9/10, ABCB1, ABCC9, ABCG2, ATP7A, SLC16A14 a SOD3. Osm z těchto vztahů zůstalo významných i po aplikování Coxovy regrese adjustované na stage, grade, histologický typ a residuum (tab. 18B, s. 78; obr. 15, s. 77).



Obr. 15: Signifikantní vztah mezi hladinou genové exprese a PFS pacientek s intraperitoneálními metastázami byl zjištěn u ABCA2/8/9/10, ABCB1, ABCC9, ABCG2, ATP7A, SLC16A14 a SOD3.
 — vyšší exprese; - - - nižší exprese.

Tab. 18: Signifikantní vztahy mezi genovou expresí a (A) klinickými daty, (B) PFS pacientek s intraperitoneálními metastázami EOC.

A	Charakteristika/Gen	<i>p</i> -hodnota	Směr
	<i>HGSC typ</i>		
	ABCA2	0,028	↑
	ABCF3	0,028	↑
	ABCG8	0,006	↑
	PMS1	0,047	↑

p-hodnota - hodnota významnosti zjištěná Mann-Whitneyho testem; směr – směr vztahu mezi genovou expresí a charakteristikou pacientek; ↑ - vyšší genová exprese.

B	Gen	<i>p</i> -hodnota	<i>p</i> -hodnota (Cox)	HR	95% CI
	ABCA2	0,014	0,024	4,77	1,23 – 18,57
	ABCA8	0,012	0,021	4,93	1,27 – 19,19
	ABCA9	0,014	0,021	4,93	1,27 – 19,19
	ABCA10	0,039	0,021	4,93	1,27 – 19,19
	ABCB1	0,043	0,059	3,62	0,95 – 13,74
	ABCC9	0,012	0,021	4,93	1,27 – 19,19
	ABCG2	0,049	0,065	3,52	0,93 – 13,34
	ATP7A	0,012	0,012	4,93	1,27 – 19,19
	SLC16A14	0,012	0,021	4,93	1,27 – 19,19
	SOD3	0,012	0,021	4,93	1,27 – 19,19

p-hodnota – hodnota významnosti zjištěná log-rank testem; *p*-hodnota (Cox) – hodnota významnosti adjustovaná pomocí Coxovy regrese; HR – poměr rizik (z angl. hazard ratio); 95% CI – 95% interval spolehlivosti (z angl. confidence interval).

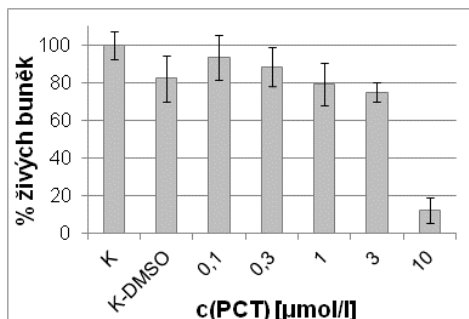
4.1.5. Charakterizace buněčných linií

4.1.5.1. Cytotoxicita PCT a karboPt stanovená pomocí kitu CellTiter 96R AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay

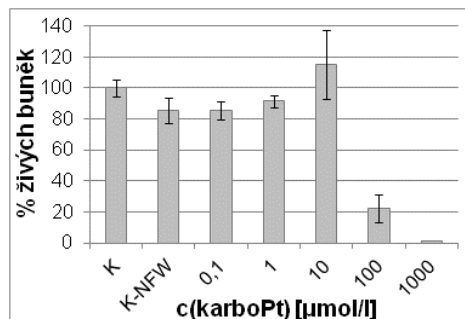
Rozsah koncentrací, ve kterých paklitaxel a karboplatina působí na buněčné linie karcinomu vaječníků cytotoxicky, byly zjištěny pomocí kitu CellTiter 96R AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay. Z výsledků uvedených na obrázku 16 (s. 79) vyplývá, že na linii NCI/ADR-RES má výrazný cytotoxický efekt koncentrace paklitaxelu 10 μmol/l, zatímco u linií OVCAR-3 a SKOV-3 jsou účinné již koncentrace 10 – 100 nmol/l. U karboplatiny nebyly mezi jednotlivými liniemi zjištěny výrazné rozdíly; cytotoxické působení bylo pozorováno u koncentrací 100 – 1000 μmol/l.

Na základě uvedených výsledků byly vybrány koncentrace paklitaxelu a karboplatiny, které byly dále studovány pomocí přístroje xCELLigence RTCA DP.

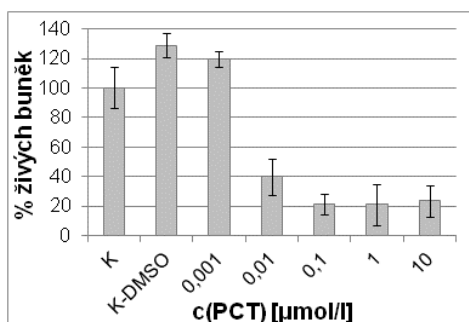
NCI/ADR-RES – PCT



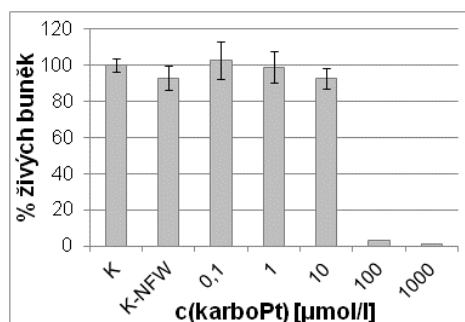
NCI/ADR-RES – karboPt



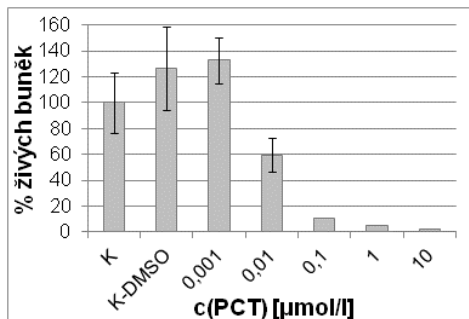
OVCAR-3 – PCT



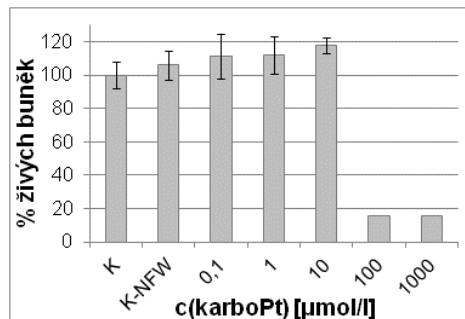
OVCAR-3 – karboPt



SKOV-3 – PCT



SKOV-3 – karboPt



Obr. 16: Graf cytotoxicity paklitaxelu (PCT) a karboplatiny (karboPt) vůči buněčným liniím karcinomu vaječníků stanovené pomocí kitu CellTiter 96R AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay. Průměr a směrodatná odchylka jsou vypočteny z biologických replikátů, podíl živých buněk je vztažen ke kontrole.

K – kontrolní vzorek; K-DMSO – kontrolní vzorek obsahující nejvyšší použitou koncentrací DMSO, v němž byl PCT rozpuštěn; K-NFW – kontrolní vzorek obsahující nejvyšší použitou koncentrací NFW, v níž byla karboPt rozpuštěna.

4.1.5.2. Cytotoxicita PCT a karboPt stanovená pomocí přístroje xCELLigence RTCA DP

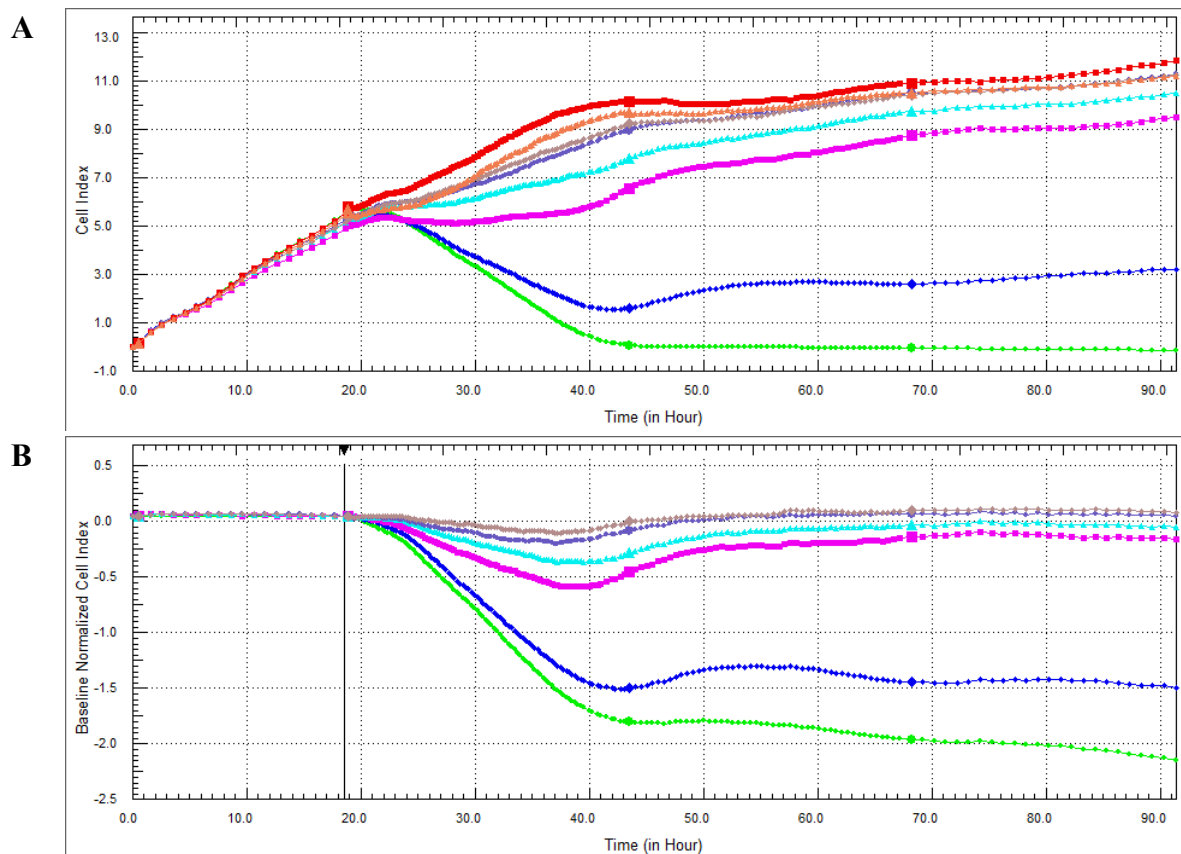
Pomocí přístroje xCELLigence RTCA DP bylo studováno cytotoxické působení paklitaxelu a karboplatiny vůči buněčným liniím karcinomu vaječníků. Rozsah studovaných koncentrací je uveden v tabulce 18. V programu RTCA Software 2.0 (ACEA Biosciences Inc.) byly růstové křivky buněk, k nimž bylo přidáno chemoterapeutikum, normalizovány vzhledem ke kontrole a vzhledem k času před přidáním studované látky (obr. 17, s. 81). Pomocí křivky závislosti na dávce pak byla určena hodnota IC_{50} pro jednotlivé linie a léčiva; vzhledem k nízkému počtu opakování experimentu (dvě opakování pro každou buněčnou linii a chemoterapeutikum) však měly stanovené hodnoty IC_{50} příliš velkou směrodatnou odchylku (13 % - 106 %; tab. 19). Hodnoty IC_{50} je proto potřeba upřesnit dalšími experimenty.

Tab. 18: Rozsah koncentrací paklitaxelu a karboplatiny vybraných pro stanovení IC_{50} těchto látek pomocí přístroje xCELLigence RTCA DP.

Buněčná linie	Rozsah testovaných koncentrací	
	Paklitaxel	Karboplatina
NCI/ADR-RES	0,1 – 30 $\mu\text{mol/l}$	10 – 3000 $\mu\text{mol/l}$
OVCAR-3	1 – 300 nmol/l	10 – 3000 $\mu\text{mol/l}$
SKOV-3	1 – 300 nmol/l	10 – 3000 $\mu\text{mol/l}$

Tab. 19: Hodnoty IC_{50} paklitaxelu a karboplatiny určené pro jednotlivé linie pomocí přístroje xCELLigence RTCA DP. Uvedeny jsou hodnoty $IC_{50} \pm$ směrodatná odchylka (vypočteno ze dvou opakování experimentu).

Buněčná linie	Paklitaxel		Karboplatina	
	IC_{50} (24 hod)	IC_{50} (72 hod)	IC_{50} (24 hod)	IC_{50} (72 hod)
NCI/ADR-RES	$4,9 \pm 3,4 \mu\text{M}$	$10,4 \pm 5,3 \mu\text{M}$	$838,0 \pm 131,5 \mu\text{M}$	$134,0 \pm 37,2 \mu\text{M}$
OVCAR-3	$10,2 \pm 4,0 \text{nM}$	$11,3 \pm 11,1 \text{nM}$	$160,9 \pm 52,7 \mu\text{M}$	$18,7 \pm 19,8 \mu\text{M}$
SKOV-3	$11,1 \pm 3,2 \text{nM}$	$59,9 \pm 10,6 \text{nM}$	$615,0 \pm 225,6 \mu\text{M}$	$43,7 \pm 5,6 \mu\text{M}$



Obr. 17: (A) Příklad záznamu růstových křivek z programu RTCA Software 2.0 pro linii NCI/ADR-RES a paklitaxel. PCT byl k buňkám přidán po 18 hod preinkubace. (B) Růstové křivky buněk, k nimž byl přidán PCT, byly normalizovány vzhledem ke kontrole a vzhledem k času před přidavkem PCT.

Kontrola; kontrolní vzorek obsahující nejvyšší použitou koncentrací DMSO; 100nM PCT; 300nM PCT; 1 μ M PCT; 3 μ M PCT; 10 μ M PCT; 30 μ M PCT.

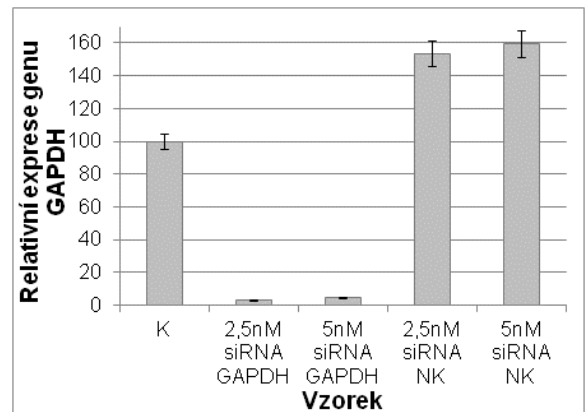
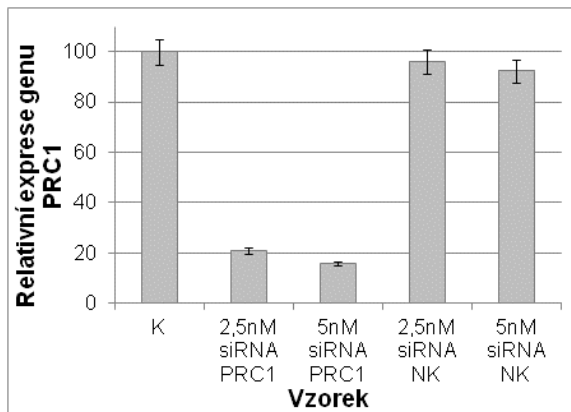
4.1.5.3. Inhibice exprese PRC1 pomocí siRNA

Jako součást předkládané práce byla v buněčných liniích karcinomu vaječníků zavedena metodika inhibice exprese kandidátního genu PRC1 pomocí siRNA. Účinnost inhibice byla ověřena jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu. Příklad inhibice exprese PRC1 v linii SKOV-3 je uveden na obrázcích 18 (s. 82) a 19 (s. 83).

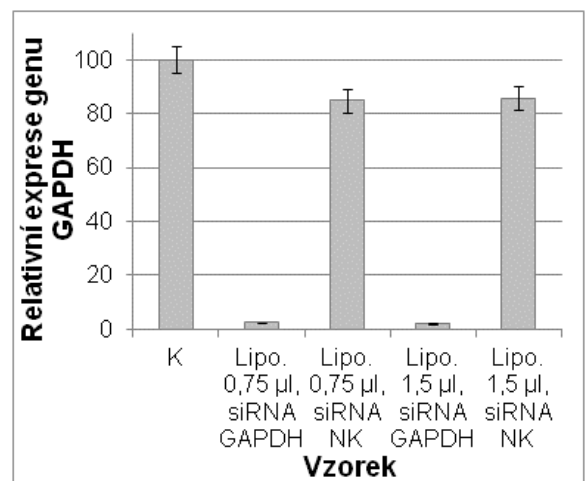
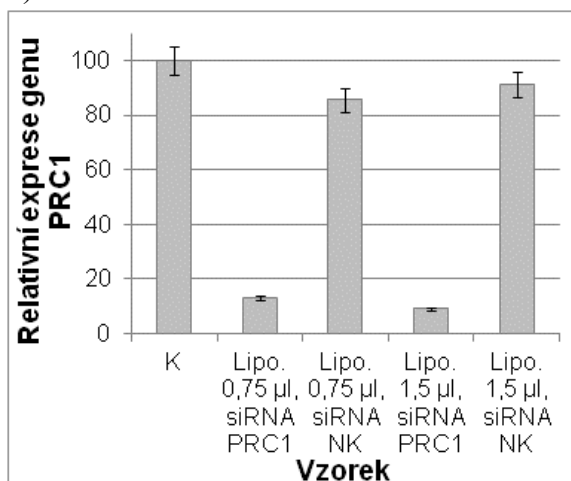
Na úrovni transkriptu bylo v porovnání dvou testovaných koncentrací siRNA (2,5 a 5 nmol/l) a dvou množství přidávaného transfekčního činidla (0,75 a 1,5 μ l) dosaženo vyšší účinnosti s použitím více siRNA, resp. Lipofectaminu; nejvyšší dosažená účinnost inhibice transkripce genu PRC1 byla 90,8 %. U kontrolního genu GAPDH bylo při stejných podmínkách dosaženo snížení exprese o 98,0 % oproti kontrole (obr. 18, s. 82). Na úrovni proteinu však snížení exprese PRC1 oproti kontrole nebylo pozorováno ani při

použití 10nM siRNA, ačkoliv transkripce kontrolního genu GAPDH byla při použití 2,5 nebo 10nM siRNA snížena o více než 74 % (obr. 19, s. 83). Inhibici exprese PRC1 na proteinové úrovni se tedy nepodařilo zavést.

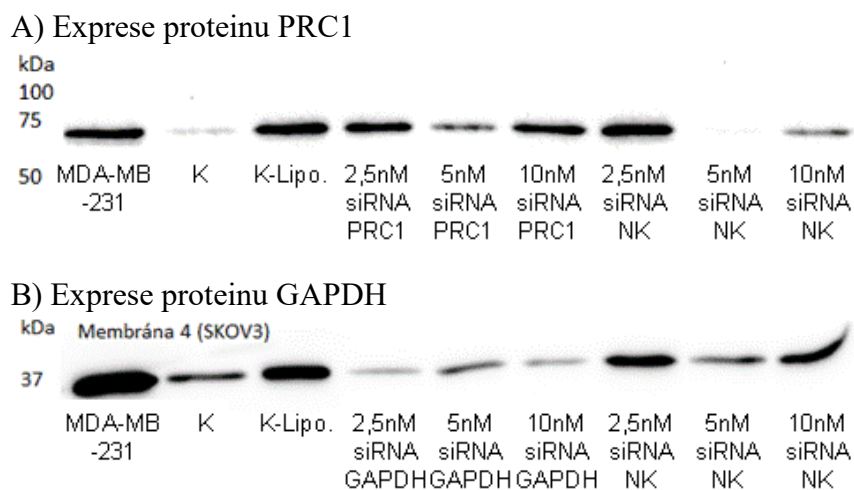
A) Lipofectamine 0,75 μ l



B) siRNA 5 nmol/l



Obr. 18: Příklad inhibice exprese genu PRC1 pomocí specifických siRNA v buněčné linii SKOV-3. Jako pozitivní kontrola byl současně inhibován také gen GAPDH a byla použita negativní kontrola (NK). Testovány byly (A) různé koncentrace siRNA při konstantním množství Lipofectaminu (Lipo.); (B) různé množství Lipofectaminu při konstantní koncentraci siRNA. Genová exprese v jednotlivých vzorcích byla vztažena ke kontrolnímu vzorku (K).



Obr. 19: (A) Příklad inhibice exprese proteinu PRC1 pomocí specifických siRNA v buněčné linii SKOV-3. (B) Současně byl jako pozitivní kontrola inhibován také protein GAPDH.

MDA-MB-231 – referenční vzorek proteinu z linie MDA-MB-231; K – kontrola (neovlivněné buňky SKOV-3); K-Lipo. – kontrola s Lipofectaminem; NK – negativní kontrola.

4.2. STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE KARCINOMEM PRSU

Část studie týkající se molekulárních markerů karcinomu prsu, která je prezentována v předkládané práci, navazuje na výsledky získané v naší laboratoři v předcházejících letech. Pomocí NGS byl na přístroji GS Junior studován vliv zárodečné genetické variability genů *ABCC8* a *ABCD2* ve vzorcích DNA z krve pacientek s nádory prsu. Klinická data pacientek ($n = 24$) jsou uvedena v tabulce 20 (s. 84 – 85). Tato část práce byla provedena ve spolupráci s kolegou V. Hlaváčem, Ph.D. (SZÚ).

Tab. 20: Charakteristika pacientek s karcinomem prsu. V tabulce (A) jsou uvedeny hodnoty faktoriálních veličin, v tabulce (B) hodnoty veličin kontinuálních.

A	Charakteristika	N (%) ^a
	<i>AJCC stage</i>	
	I	9 (40,9)
	II	11 (50,0)
	III	2 (9,1)
	IV	0
	neurčeno	2
	<i>Grade</i>	
	1	3 (13,0)
	2	9 (39,1)
	3	11 (47,8)
	neurčeno	1
	<i>Histologický typ</i>	
	invazivní duktální karcinom	19 (79,2)
	ostatní typy	5 (20,8)
	<i>Menopauza</i>	
	pre	13 (54,2)
	post	11 (45,8)
	<i>Zasažené lymfatické uzliny</i>	
	ano	8 (33,3)
	ne	16 (66,7)
	<i>Expres ER</i>	
	ano	18 (75,0)
	ne	6 (25,0)
	<i>Expres PR</i>	
	ano	18 (75,0)
	ne	6 (25,0)
	<i>Expres HER2</i>	
	ano	8 (24,8)
	ne	15 (65,2)
	neurčeno	1
	<i>Odpověď na NACT</i>	
	kompletní nebo částečná	11 (47,8)
	stabilní onemocnění nebo progresse	12 (52,2)
	neurčeno	1

B	Průměr ± SD
Věk v době diagnózy [rok]	48,9 ± 10,8
Velikost nádoru [mm]	22,8 ± 13,4
Exprese Ki67 [%]	37,2 ± 24,5

^aPočet pacientek, v závorce jsou uvedena procenta; AJCC – American Joint Committee on Cancer; NACT – neoadjuvantní chemoterapie; ER – estrogenový receptor; PR – progesteronový receptor; SD – směrodatná odchylka (z angl. standard deviation).

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

Sekvenováním genu *ABCC8* bylo u pacientek s karcinomem prsu zjištěno 41 variant, v genu *ABCD2* 72 variant. Dvacet, respektive 10 z nich bylo umístěno v kódujících oblastech. Přehled jednotlivých typů záměn je uveden v tabulce 21. Z celkového počtu nalezených variant bylo 72 % nových (n = 81).

Tab. 21: Zárodečné varianty zjištěné v genech *ABCC8* a *ABCD2* u pacientek s nádory prsu. Uvedeny jsou počty variant, v závorce je uveden počet patogenních záměn zjištěných programy Regulome DB, SIFT, PolyPhen-2 nebo HaploReg.

Typ varianty	<i>ABCC8</i>	<i>ABCD2</i>	Celkem
Nekódující	21 (1)	62 (2)	83 (3)
Posun čtecího rámce (frameshift)	6	4	10
Záměny aminokyselin (missense)	5 (2)	2 (1)	7 (3)
Synonymní (synonymous)	10	3	13
Celkem	41 (3)	72 (3)	113 (6)

4.2.1.1. Význam genetické variability genů *ABCC8* a *ABCD2*

Zárodečné varianty zjištěné v genech *ABCC8* a *ABCD2* u pacientek s nádory prsu pomocí NGS byly podrobeny *in silico* analýze za účelem zjistit jejich funkční význam. Tři SNP v genu *ABCC8* a tři v genu *ABCD2* byly programy Regulome DB, SIFT a PolyPhen-2 označeny jako škodlivé (tab. 22A, s. 86). Program HaploReg navíc ukázal, že polymorfismy rs757110 v genu *ABCC8* a rs117275340 v genu *ABCD2* mohou potenciálně měnit vazebné místo pro řadu transkripčních faktorů (tab. 22B, s. 86).

S výjimkou SNP rs757110 byly všechny varianty zjištěné v genech *ABCC8* a *ABCD2* detekovány pouze u jedné ze studovaných žen. Vztahy mezi zjištěnými genetickými variantami a klinickými daty pacientek proto mohly být zkoumány pouze v případě SNP

rs757110 genu *ABCC8* (distribuce fenotypů rs757110 je uvedena v tabulce 23, s. 87). Se žádnou ze studovaných charakteristik však nebyl zjištěn signifikantní vztah.

Tab. 22: Výsledky analýzy funkčního významu SNP genů *ABCC8* a *ABCD2* v programech (A) Regulome DB, SIFT a PolyPhen, (B) HaploReg.

A	Umístění na chormozomu	Identifikace SNP	Záměna amino-kyselin	Program použitý pro analýzu Regulome DB	SIFT^a	PolyPhen^b
<i>ABCC8</i>						
	chr11:174982 25InsC	nový	—	Pravděpodobně ovlivňuje vazbu	N/A	N/A
	chr11:174982 75C>T	nový	V17M	N/A	0,02	0,98
	chr11:174184 77C>A	rs757110	A197S	Pravděpodobně ovlivňuje vazbu, vztah k expresi cílového genu	N/A	0,68
<i>ABCD2</i>						
	chr12:399475 45Delins3	nový	—	Pravděpodobně ovlivňuje vazbu	N/A	N/A
	chr12:399475 47DelA	nový	—	Pravděpodobně ovlivňuje vazbu	N/A	N/A
	chr12:400133 92G>C	rs117275340	A9G	N/A	0,02	0,84
B	Umístění na chormozomu	Změněný vazebný motiv (HaploReg)				
<i>ABCC8</i>						
	chr11:174982 25InsC	N/A				
	chr11:174982 75C>T	N/A				
	chr11:174184 77C>A	CCNT2 SZF1-1				
<i>ABCD2</i>						
	chr12:399475 45Delins3	N/A				
	chr12:399475 47DelA	N/A				
	chr12:400133 92G>C	AP-4_1	GATA_disc4	Myf_2		
		AP-4_3	HEN1_1	Myf_3		
		Ascl2	HEN1_2	SREBP_known4		
		CTCF_disc10	LBP-1_2	TCF12_known1		
		E2A_3				

^aCut off < 0,05; ^bCut off > 0,2; N/A – není k dispozici (z angl. not available).

Tab. 23: Distribuce frekvence alel rs757110 *ABCC8* zjištěná ve studovaném souboru žen s karcinomem prsu.

Distribuce frekvence alel rs757110 <i>ABCC8</i>	N (%) ^a
CC	4 (16,7)
CA	9 (37,5)
AA	11 (45,8)

^aPočet pacientek, v závorce jsou uvedena procenta.

Výsledky sekvenování DNA z krve pacientek s karcinomem prsu na přístroji GS Junior byly spolu s dalšími výsledky získanými v naší laboratoři využity při přípravě panelu 509 genů, jejichž genetická variabilita byla dále studována sekvenováním na přístroji MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA; není součástí předkládané práce).

5. DISKUZE

Tématem této práce bylo studium prognostického a prediktivního významu molekulárních biomarkerů nádorů vaječnicků a prsu, které mají potenciální uplatnění v terciární a kvartérní prevenci. Vzhledem k tomu, že oba tyto karcinomy patří mezi celosvětově nejrozšířenější nádorová onemocnění žen a že stále mají vysokou úmrtnost (Ferlay J. *et al.*, 2015), je potřeba zlepšit diagnostiku a také zvýšit účinnost protinádorové terapie, na čemž se právě prognostické a prediktivní biomarkery mohou významně podílet (Duffy M.J. *et al.*, 2015). V následujících kapitolách budou diskutovány nejvýznamnější výsledky objevené v jednotlivých částech práce.

5.1. Analýza genové exprese v nádorech vaječnicků, analýza metylace a výskytu SNP v kandidátních genech

Základní otázkou první části práce bylo, zda existují rozdíly v expresi vybraných genů mezi nádorovou a nenádorovou tkání (kontrolami) a jak tyto změny souvisí s klinickými daty pacientek, tedy jaký mají potenciální prognostický význam. Práce byla rozdělena na pilotní a validační část; v pilotní části byla z 94 studovaných genů exprese 37 genů významně snížena, naopak 13 genů mělo v nádorech oproti kontrolní tkáni zvýšenou expresi. S výjimkou šesti genů byly trendy nalezené v pilotní části studie potvrzeny ve validační části. Kromě toho byla v obou částech studie zjištěna řada významných vztahů mezi hladinou genové exprese a klinickými daty pacientek (zejména se stupněm diferenciací nádoru, expresí Ki67 a PFS; vztah genové exprese a přežívání pacientek bude diskutován dále, s. 91 – 92). 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.

Gen ABCB1 je jedním z nejvíce studovaných ABC transportérů. Jeho transkripce byla v nádorech v porovnání s kontrolami snížena, jak již bylo dříve pozorováno u EOC (Ehrlichová M. *et al.*, 2013) i u jiných typů nádorů (Hlaváč V. *et al.*, 2013; Hlavata I. *et al.*, 2012). V souladu s tím byl promotor genu *ABCB1* v tkáni EOC výrazně hypermetylován. Soubor vzorků, u něhož byla studována metylace *ABCB1*, byl rozdělen na pacientky před chemoterapií a po aplikaci NACT. U pacientek před chemoterapií vyšší hladina metylace korelovala s nižší genovou expresí, po aplikaci NACT nikoliv. Tyto

výsledky souhlasí s dříve publikovanou studií provedenou na buněčné linii karcinomu prsu, v níž aplikace chemoterapeutik vedla k poklesu metylace a ke snížení transkripce genu ABCB1 (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. Gen ABCB1 je tedy významným potenciálním biomarkerem nejen u nádorů prsu (Dejeux E. *et al.*, 2010), ale také u nádorů vaječníků.

Expresí genu ABCA2 nebyla v nádorech deregulována, nižší transkripce v nádorech však souvisela s vyšším stupněm diferenciací nádoru a s vyšší expresí proliferativního markeru Ki67. Dále byl v DNA z krve pacientek s EOC studován výskyt tří SNP v genu *ABCA2*. Objevený vztah mezi SPN rs908832 a stupněm diferenciací nádoru potvrdil výsledky pilotní a validační části studie EOC. Významný je také vztah mezi variantním genotypem G/G SNP rs2271862 a PFS; jeho výskyt asocioval s delším přežíváním pacientek a tedy s lepší prognózou. Protein ABCA2 se podílí na transportu steroidních látek a pravděpodobně souvisí se vznikem nádorů a s chemorezistencí nádorových buněk (Mack J.T. *et al.*, 2006; Ween M.P. *et al.*, 2015). Podle výsledků této práce je nízká exprese genu ABCA2 významným potenciálním biomarkerem agresivního typu EOC a, stejně jako SNP rs908832 a rs2271862 v genu *ABCA2*, je kandidátem pro další studium

Expresí genu PRC1 byla v nádorové tkáni zvýšena a pozitivně korelovala s hladinou Ki67, jak již bylo popsáno (Ehrlichova M. *et al.*, 2013). Byla zavedena také imunodetekce proteinu PRC1 v ovariální tkáni, exprese 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 programem RegulomeDB *in silico* predikován vliv na vazbu transkripčních faktorů, a tedy 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; Chen Y. *et al.*, 2016; Zhao Z. *et al.*, 2016). Gen PRC1 a SNP v genu *PRC1* jsou proto potenciálními prognostickými faktory také u EOC.

5.2. Analýza genové exprese v intraperitoneálních metastázách vycházejících z EOC

Výchozí hypotéza této části práce předpokládala, že mezi primárními nádory vaječníků a intraperitoneálními metastázami vycházejícími z EOC existují rozdíly nejen v expresi genů

souvisejících s EMT, jak již bylo dříve popsáno (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 bylo v intraperitoneálních metastázách v porovnání s primárními EOC zjištěno signifikantní snížení exprese u 15 genů. Porovnáním exprese v řadě kontroly – primární nádory – metastázy pak bylo deregulováno 22 genů. Významným zjištěním je, že geny ABCA7, ABCB2, ABCC3 a NR1H1 měly zvýšenou expresi a geny ESR2 a NR1H4 sníženou expresi v obou těchto porovnáních. V případě genů ABCA7 a ESR2 tyto změny zůstaly signifikantní i po FDR korekci. Tyto vztahy proto mohou představovat významné potenciální biomarkery vzniku a progresu EOC.

Zvýšená genová exprese transportéru ABCA7 byla zjištěna také v pilotní fázi studia EOC a již dříve byla pozorována u nádorů prsu (Hlaváč V. *et al.*, 2013). Zvýšení exprese v nádorové oproti nenádorové tkáni ABCA7 bylo nedávno ukázáno také u EOC, a to jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu. Vyšší exprese ABCA7 zde zároveň souvisela s horším přežíváním pacientek (Liu X. *et al.*, 2018), ačkoliv předkládaná studie vztah mezi mírou transkripce ABCA7 a PFS neukázala. Na základě experimentů s buněčnými liniemi EOC bylo zjištěno, že potlačení exprese ABCA7 vede ke snížení migrace buněk, a tedy že ABCA7 urychluje EMT (Liu X. *et al.*, 2018), což je v souladu s naší hypotézou. Transportér ABCA7 se v buňkách podílí na eliminaci fosfolipidů a cholesterolu (Abe-Dohmae S. *et al.*, 2004). Mechanismus působení ABCA7 v karcinogenezi a metastatickém bujení tak pravděpodobně souvisí s metabolismem lipidů, který v EOC hraje klíčovou roli (Beloribi-Djefaflija S. *et al.*, 2016). Je tedy zřejmé, že transportér ABCA7 je pro rozvoj EOC významný, a je proto kandidátem pro další studium.

Další z kandidátních genů ESR2 kóduje expresi estrogeního receptoru, který se významně uplatňuje v karcinogenezi nádorů prsu, kde již byl také zaveden jako cíl protinádorové terapie (Lin C.Y. *et Gustafsson J.Å.*, 2015). Předkládaná práce však ukázala, že hladina exprese genu ESR2 je významná také pro EOC. V souladu s našimi výsledky byla i v dalších pracích zjištěna snížená exprese ESR2 v nádorové oproti nenádorové ovariální tkáni (Feng Y. *et al.*, 2019; Suzuki F. *et al.*, 2008), nízká exprese ESR2 také asociovala s kratším přežíváním pacientek (Fekete T. *et al.*, 2012; Feng Y. *et al.*, 2019). Nedávná studie ukázala, že aktivace ER v metastazujících buňkách karcinomu prsu vede k buněčné smrti a potlačuje metastatické bujení v plicích. Tyto výsledky naznačují potenciální význam estrogenového receptoru pro léčbu metastatického nádorového onemocnění

u karcinomu prsu (Zhao L. *et al.*, 2018), avšak význam mohou mít i pro léčbu metastáz ovariálního karcinomu.

Hodnocen byl samozřejmě i vztah mezi genovou expresí a přežíváním pacientek do progresse onemocnění. V intraperitoneálních metastázách s délkou PFS pozitivně korelovala hladina transkripce 10 genů (ABCA2/8/9/10, ABCB1, ABCC9, ABCG2, ATP7A, SLC16A14, SOD3). U genů ABCA9/10, ABCC9, ABCG2 a SLC16A14 byl tento vztah zjištěn již v pilotní nebo validační části studia, tedy ve tkáni primárních EOC.

V případě genů ABCA9 a ABCA10 byla v pilotní a validační fázi zjištěna také snížená exprese v primárních nádorech oproti kontrolám, gen ABCA10 měl sníženou expresi také v porovnání K – pT – iM. Dále hladina transkriptu obou těchto genů v primárních nádorech korelovala s hladinou proliferačního markeru Ki67. V práci autorů Hedditch E.L. *et al.* (2014) byl mezi transportéry z rodiny ABCA a délkou přežívání pacientek s EOC zjištěn vztah u genů ABCA6/8/9, u genu ABCA10 nikoliv. Rozdílný výsledek může souviset s odlišným histologickým typem studovaných vzorků v jednotlivých pracích. Fyziologická funkce transportérů ABCA9/10, stejně jako jejich úloha v karcinogenezi, je zatím málo prozkoumána. Pravděpodobně se, stejně jako další členové ABCA rodiny, účastní metabolismu lipidů (Ween M.P. *et al.*, 2015). Naše výsledky ukazují, že nízká hladina mRNA genů ABCA9/10 je negativním prognostickým markerem, a potvrzují, že změny v metabolismu lipidů souvisí s karcinogenezí a progresí EOC.

Transkripce genu ABCC9 byla v primárních nádorech oproti kontrolám snížena, v intraperitoneálních metastázách však byla jeho exprese oproti primárním nádorům zvýšena. Stejně tak je v rozporu směr vztahu mezi hladinou exprese ABCC9 a délkou bezpříznakového přežívání pacientek. Zda jsou rozdílné výsledky důsledkem progresse EOC, nebo zda jsou nesprávné, je potřeba ověřit na větším souboru vzorků. V literatuře není úloha genu ABCC9 v EOC doposud popsána; pro potvrzení či vyvrácení jeho významu proto budou potřeba další studie.

Expresí genu ABCG2 byla ve směru K – pT – iM snížena, dále byl, shodně s validační fází studia EOC, zjištěn vztah mezi mírou exprese a PFS pacientek. V pilotní fázi bylo také ukázáno, že v buňkách s vyšší expresí proteinu Ki67, tedy s vyšší mírou proliferace, je transkripce ABCG2 snížena. Všechny tyto výsledky jsou v souladu a ukazují, že nižší exprese genu ABCG2 je potenciálním negativním prognostickým markerem EOC. Signifikantní vztah mezi expresí ABCG2 a rezistencí nádorových buněk vůči chemoterapii však detekován nebyl, ačkoliv v literatuře je zvýšená exprese genu, resp. proteinu ABCG2

v nádorových buňkách označována jako příčina vzniku lékové rezistence (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 však doposud vztah mezi expresí ABCG2 a chemorezistencí prokázán nebyl (Auner V. *et al.*, 2010). V článku Hedditch E.L. *et al.* (2014) nebyla souvislost s přežíváním pacientek zjištěna, avšak v práci autorů Tian C. *et al.* (2012) bylo ukázáno, že výskyt variantního genotypu genu *ABCG2* souvisí s delším PFS a nižším rizikem progresu u pokročilých stádií EOC. Vztah mezi expresí ABCG2 a přežíváním pacientek tak může záviset na funkční variantě genu a je potřeba ho detailně prozkoumat.

Je zajímavé, že výsledky stanovené pro gen ABCG2 jsou prakticky totožné s výsledky genu SLC16A14. Stejně jako ABCG2, i transportér SLC16A14 je v literatuře spojován s lékovou rezistencí buněčných linií ovariálního karcinomu (Januchowski R. *et al.*, 2013; Januchowski R. *et al.*, 2014), avšak *in vivo* jeho funkce v EOC doposud zkoumána nebyla. Ani v předkládané práci nebyl zjištěn vztah mezi rezistentním fenotypem pacientek a expresí genu SLC16A14. Vztah s PFS a deregulace transkripce v primárních nádorech a intraperitoneálních metastázách však ukazují, že by se mohlo jednat o potenciální biomarker prognózy EOC.

5.3. Stanovení cytotoxicity a inhibice genové exprese pomocí siRNA v buněčných liniích karcinomu ovarií

Jako součást předkládané práce 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 působení 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 μ mol/l). V případě karboplatiny však u všech tří linií působily cytotoxicky stejné koncentrace (100 – 1000 μ mol/l).

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

5.4. Analýza zárodečné genetické variability genů *ABCC8* a *ABCD2* v krvi pacientek s nádory prsu stanovená metodou NGS

Na vzorcích DNA izolované z periferní krve pacientek s nádory prsu byla zavedena metodika sekvenování nové generace na přístroji GS Junior. Metoda byla následně využita pro analýzu výskytu zárodečných genetických variant v genech *ABCC8* a *ABCD2*. *In silico* analýzou byl dále studován potenciální význam jednotlivých zárodečných variant. Zkoumáno bylo 39 exonů v genu *ABCC8* a 10 exonů v genu *ABCD2*, v nichž bylo celkem nalezeno 41, respektive 72 variant. 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 zkoumán pouze u rs757110 v genu *ABCC8*. Žádný vztah však nalezen nebyl, ačkoliv v práci autorů Lehman T. *et al.* (2008) bylo zjištěno vyšší riziko vzniku karcinomu prsu u žen s variantním genotypem rs757110. V dřívější práci také genová exprese *ABCC8* asociovala se stupněm diferenciací nádorových buněk, expresí hormonálních receptorů a markeru Ki67 (Hlaváč V. *et al.*, 2013). Tyto rozdíly mohou souviset s velikostí studovaného souboru; v předkládané práci byly použity vzorky pouze od 24 pacientek. Tento počet byl dostačující pro zavedení metodiky, pro potvrzení významu rs757110 *ABCC8* pro vznik nádorů prsu a prognózu onemocnění však bude potřeba větší soubor pacientek.

Kvůli nízké frekvenci zastoupení ve studovaném souboru pacientek nemohly být z hlediska vztahů s klinickými daty analyzovány ani varianty detekované v genu *ABCD2*. Bohužel tak nemohla být potvrzena hypotéza, že exprese genu *ABCD2*, respektive jeho varianty, souvisí s odpovědí pacientek s nádory prsu na NACT, který vycházel z předchozí práce (Hlaváč V. *et al.*, 2013). Ačkoliv SNP rs117275340 v genu *ABCD2* je již znám, jeho význam doposud zkoumán nebyl, a tak zůstává kandidátem pro další výzkum.

Mezi největší limitace předkládané práce patří relativně malé soubory použitých vzorků. Cílem práce však bylo najít geny, které se pravděpodobně podílejí na vzniku nebo progresi onemocnění, mají vliv na přežívání pacientek nebo na rozvoj metastáz. Pro identifikaci

kandidátních genů jsou soubory použité v této práci dostačující, pro potvrzení jejich funkce bude potřeba analyzovat větší počty vzorků v jednotlivých souborech.

Jedním z přínosů této práce je zavedení některých nových metod na Oddělení toxikogenomiky SZÚ v Praze. Jednalo se o technologie, které umožňují detailní studium funkce kandidátních biomarkerů v zavedených *in vitro* systémech, dále pak byla pro detailní výzkum genetického profilu pacientů se solidními nádory úspěšně zavedena metodika sekvenování nové generace včetně jejího hodnocení a analýzy dat. Tato technologie získává v současné době stále větší význam pro studium genotypu a fenotypu onkologických pacientů a hraje významnou roli v oblasti terciární a kvartérní prevence nádorových onemocnění v rámci individualizované terapie. Zavedená metoda NGS byla na Oddělení toxikogenomiky také již úspěšně využita pro další studium nádorů prsu (Hlavac V. *et al.*, 2018).

Dalším významným přínosem této práce je analýza genové exprese celé rodiny ABC transportérů, která u ovariálního karcinomu doposud nebyla studována. Unikátní je rovněž 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, čímž byla potvrzena základní hypotéza této části práce. 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 (methylace, SNP).

V případě genu ABCB1 nebyl zjištěn předpokládaný vztah mezi mírou transkripce a prognózou pacientek nebo citlivostí nádorových buněk vůči chemoterapii. Bylo však ukázáno, že promotor genu *ABCB1* je v nádorové tkáni hypermetylován a že stupeň methylace, tedy hladina genové exprese, je ovlivňována aplikací NACT.

Snížená exprese genu ABCA2 v nádorech významně asociovala s vyšším stupněm diferenciaci a s vyšším stupněm proliferace nádorových buněk. Se stupněm diferenciaci nádorových buněk navíc souvisel také výskyt SNP rs908832 v genu *ABCA2*, výskyt SNP rs2271862 zase asocioval s PFS pacientek.

Expresa genu PRC1 byla v nádorech zvýšena a korelovala s mírou proliferace nádorových buněk. 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 (*in silico* analýza).

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 souvisí s prognózou pacientek. Porovnána byla exprese genů v primárních nádorech a metastázách a také v řadě kontroly – primární nádory – metastázy. Expresse genů ABCA7, ABCB2, ABCC3, ESR2, NH1H4 a NR111 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 v naší laboratoři zavedena kultivace tří buněčných linií EOC. Cílem bylo zavést metodiku pro stanovení cytotoxicity chemoterapeutik a metodiku inhibice genové exprese.

Stanovením cytotoxicity bylo potvrzeno, že linie OVCAR-3 a SKOV-3 jsou vůči paklitaxelu stokrát až tisíckrát citlivější než linie NCI/ADR-RES (10 – 100 nmol/l, respektive 10 μ mol/l). V případě karboplatiny jsou všechny tři linie srovnatelně citlivé (100 – 1000 μ mol/l). S použitím siRNA byla v buněčných liniích zavedena inhibice exprese PRC1 na úrovni genu.

Zavedené buněčné modely jsou v současné době na Oddělení toxikogenomiky SZÚ využívány pro *in vitro* i *in vivo* studie účinků experimentálních taxanových derivátů.

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 a že tyto změny 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 % námi nově popsanych. *In silico* analýzou byly predikovány potenciálně škodlivé varianty, v případě SNP rs757110 v genu *ABCC8* a rs117275340 v genu *ABCD2* byl navíc predikován vliv na vazbu řady transkripčních faktorů.

SOUHRN

Zhoubné nádory vaječnicků a prsu patří mezi nejrozšířenější nádorová onemocnění v ženské populaci. I přes pokroky v diagnostice a terapii je úmrtnost stále vysoká; významný nástroj nejen pro časnou detekci nádorového onemocnění, 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, primárními nádory a intraperitoneálními metastázami existují rozdíly v genové expresi; (ii) zda genová exprese, respektive výskyt genetických variant (jednonukleotidové polymorfismy, metylace DNA, zárodečná variabilita) asociují s klinickými daty pacientek a mají tak potenciální prognostický význam.

V případě ovariálního karcinomu (EOC, z angl. epithelial ovarian cancer) bylo ukázáno, že 50 z 94 studovaných genů je v nádorech oproti kontrolám (K) deregulováno, stejně jako 15 z 66 genů v intraperitoneálních metastázách (iM) v porovnání s primárními nádory (pT). Expresí genů *ABCA7*, *ABCB2*, *ABCC3*, *ESR2*, *NH1H4* a *NR1H1* byla deregulována jak v porovnání primárních nádorů a metastáz, tak v porovnání K – pT - iM. Mezi nejdůležitější zjištění patří vztahy mezi geny *ABCA2/12*, *ABCB1*, *PLK1* a *PRC1* a stádiem, stupněm diferenciací nebo proliferací nádorových buněk. Významná je také asociace genů *ABCA9/10*, *ABCC9*, *ABCG2* a *SLC16A14* s délkou přežívání pacientek, která byla zjištěna jak v primárních nádorech, tak v intraperitoneálních metastázách EOC. Zajímavé vztahy byly nalezeny také u polymorfismů rs908832 a rs2271862 v genu *ABCA2* a rs2290203, rs8028856 a rs8031684 v genu *PRC1*. Promotor genu *ABCB1* byl v nádorech hypermetylován a stupeň metylace byl ovlivněn aplikací neoadjuvantní chemoterapie.

V případě nádorů 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 *in silico* predikován potenciální škodlivý vliv nebo vliv na vazbu transkripčních faktorů.

Mezi nejdůležitější přínosy práce patří analýza celé rodiny ABC transportérů v tkáni ovariálního karcinomu a porovnání genové exprese v kontrolách, primárních nádorech a intraperitoneálních metastázách EOC. Výsledky ukazují geny významné pro prognózu pacientek s nádory vaječnicků 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. Despite improvements in diagnostics and in therapy, mortality is still very high. 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 (single nucleotide polymorphisms, DNA methylation, germline mutations) associate with clinical data of patients, thus being potentially relevant for prognosis.

In epithelial ovarian cancer (EOC), 50 of 94 genes were deregulated in controls compared to tumors. Fifteen of 66 genes were deregulated in intraperitoneal metastases compared to primary tumors. Gene expression of ABCA7, ABCB2, ABCC3, ESR2, NH1H4 and NR1H1 was deregulated either in comparison of primary tumors and metastases, or in comparison of C – pT – iM. The most interesting findings are relationships between ABCA2/12, ABCB1, PLK1 and PRC1 gene expression, and tumor grade, stage or tumor cells proliferation. Associations between ABCA9/10, ABCC9, ABCG2 and SLC16A14 gene expression, and progression-free survival of EOC patients, which was found out either in primary tumors or in metastases, are also very important. Other interesting associations were found for polymorphisms rs908832 and rs2271862 in *ABCA2* gene, and rs2290203, rs8028856 and rs8031684 in *PRC1* gene. *ABCB1* promotor was hypermethylated in tumors compared to controls. The methylation status was influenced by neoadjuvant chemotherapy application.

In breast cancer, germline mutations in *ABCC8* and *ABCD2* genes were analyzed by methods of next generation sequencing. Forty-one and 72 variants were discovered, respectively; 72 % were new. Six variants were *in silico* predicted to be potentially harmful or to influence binding of transcriptional 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 controls, primary tumors and intraperitoneal EOC metastases. 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.

POUŽITÁ LITERATURA

1. *Knihy*

CASSIDY, Jim, BISSETT, Donald., SPENCE, Roy A.J., *et al.* *Oxford Handbook of Oncology*. Third edition. Oxford: Oxford University Press, 2010. ISBN 978-0-19-956313-5.

CIBULA, David, PETRUŽELKA, Luboš. *Onkogynekologie*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2665-6.

FAIT, Tomáš, VRABLÍK, Michal, ČEŠKA, Richard, *et al.* *Preventivní medicína*. 2. rozšířené vydání. Praha: Maxdorf, 2011. ISBN 978-80-7345-237-7.

STRNAD, Pavel, DANEŠ, Jan. *Nemoci prsu pro gynekology*. Praha: Grada Publishing, 2001. ISBN 80-7169-714-1.

2. *Vědecké publikace*

1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010; **467**(7319), 1061-1073.

ABE-DOHMAE, Sumiko, IKEDA, Yuika, MATSUO, Michinori *et al.* Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**(1), 604-611.

ADZHUBEI, Ivan A., SCHMIDT, Steffen, PESHKIN, Leonid, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*. 2010; **7**(4), 248-249.

AGARWAL, Shailesh, PAPPAS, Lisa, NEUMAYER, Leigh, *et al.* Effect of Breast Conservation Therapy vs Mastectomy on Disease-Specific Survival for Early-Stage Breast Cancer. *JAMA Surg.* 2014; **149**(3), 267-274.

AGHAJANIAN, Carol, BLANK, Stephanie V., GOFF, Barbara A., *et al.* OCEANS: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab in Patients With Platinum-Sensitive Recurrent Epithelial Ovarian, Primary Peritoneal, or Fallopian Tube Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2012; **30**(17), 2039-2045.

ALLRED, Clinton D., ALLRED, Kimberly F., JU, Young H., *et al.* Soy Diets Containing Varying Amounts of Genistein Stimulate Growth of Estrogen-dependent (MCF-7) Tumors in a Dose-dependent Manner. *Cancer Res.* 2001; **61**(13), 5045-5050.

AUNER, Veronika, SEHOULI, Jalid, OSKAY-OEZCELIK, Gülten, *et al.* ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecol. Oncol.* 2010; **117**(2), 198-201.

AZZAM, Amal Z., HASHAD, Doaa I., KAMEL, Nahla A.F. Evaluation of HE4 as an extrabiomarker to CA125 to improve detection of ovarian carcinoma: is it time for a step forward? *Arch. Gynecol. Obstet.* 2013; **288**(1), 167-172.

BABIC, Ana, CRAMER, Daniel W., KELEMEN, Linda E., *et al.* Predictors of pretreatment CA125 at ovarian cancer diagnosis: a pooled analysis in the Ovarian Cancer Association Consortium. *Cancer Causes & Control*. 2017; **28**(5), 459-468.

- BACCELLI, Irène, SCHNEEWEISS, Andreas, RIETHDORF, Sabine, *et al.* Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat. Biotechnol.* 2013; **31**(6), 539-545.
- BARRETT, Jeffrey C., FRY, Ben, MALLER, Julian, *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005; **21**(2), 263-265.
- BARTOŇKOVÁ, Helena, FORETOVÁ, Lenka, HELMICHOVÁ, E., *et al.* Doporučené zásady péče o nemocné s nádory prsu a vaječníků a zdravé osoby se zárodečnými mutacemi genů BRCA1 nebo BRCA2. *Klin. Onkol.* 2003; **16**(1), 28-34.
- BEAUFORT, Corine M., HELMIJR, Jean C.A., PISKORZ, Anna M., *et al.* Ovarian Cancer Cell Line Panel (OCCP): Clinical Importance of *In Vitro* Morphological Subtypes. *PLoS ONE.* 2014; **9**(9): e103988.
- BELORIBI-DJEFAFLIA, Sadia, VASSEUR, Sophie, GUILLAUMOND, Fabienne. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis.* 2016; **5**(1), e189.
- BENJAMINI, Yoav, HOCHBERG, Yosef. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Statist. Soc. B.* 1995; **57**(1), 289-300.
- BERGFELDT, Kjell, RYDH, Bosse, GRANATH, Fredrik, *et al.* Risk of ovarian cancer in breast-cancer patients with a family history of breast or ovarian cancer: a population-based cohort study. *Lancet.* 2002; **360**(9337), 891-894.
- BERGMANN, Troels K., BRASCH-ANDERSEN, Charlotte, GREEN, Henrik, *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.
- BERNSTEIN, Emily, CAUDY, Amy A., HAMMOND, Scott M., *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001; **409**(6818), 363-366
- BHUTIA, Yangzom D., BABU, Ellappan, RAMACHANDRAN, Sabarish, *et al.* SLC transporters as a novel class of tumour suppressors: identity, function and molecular mechanisms. *Biochem. J.* 2016; **473**(9), 1113-1124.
- BOOKMAN, Michael A., BRADY, Mark F., MCGUIRE, William P., *et al.* Evaluation of New Platinum-Based Treatment Regimens in Advanced-Stage Ovarian Cancer: A Phase III Trial of the Gynecologic Cancer InterGroup. *J. Clin. Oncol.* 2009; **27**(9), 1419-1425.
- BOYLE, Alan P., HONG, Eurie L., HARIHARAN, Manoj, *et al.* Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 2012; **22**(9), 1790-1797.
- BRAY, Freddie, JEMAL, Ahmedin, GREY, Nathan, *et al.* Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 2012; **13**(8), 790-801.
- BRYNYCHOVA, Veronika, EHRLICHOVA, Marie, HLAVAC, Viktor, *et al.* Genetic and functional analyses do not explain the association of high PRC1 expression with poor survival of breast carcinoma patients. *Biomed. Pharmacother.* 2016; **83**, 857-864.
- BURGER, Herman, FOEKENS, John A., LOOK, Maxime P., *et al.* RNA Expression of Breast Cancer Resistance Protein, Lung Resistance-related Protein, Multidrug Resistance-

- associated Proteins 1 and 2, and Multidrug Resistance Gene 1 in Breast Cancer: Correlation with Chemotherapeutic Response. *Clin. Cancer Res.* 2003; **9**(2), 827-836.
- BURGER, Robert A., BRADY, Mark F., BOOKMAN, Michael A., *et al.* Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2011; **365**(26), 2473-2483.
- BUSTIN, Stephen A., BENES, Vladimir, GARSON, Jeremy A., *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 2009; **55**(4), 611-622.
- CAI, Qiuyin, ZHANG, Ben, SUNG, Hyuna, *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, Sophie, HARDY-BESSARD, Anne C., LE TOURNEAU, Agnes, *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.
- CARIOU, Bertrand, VAN HARMELEN, Kirsten, DURAN-SANDOVAL, Daniel, *et al.* The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J. Biol. Chem.* 2006; **281**(16), 11039-11049.
- COATES, Alan S., WINER, Eric P., GOLDHIRSCH, Aron, *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.
- COFFMAN, Lan G., BURGOS-OJEDA, Daniela, WU, Rong, *et al.* New models of hematogenous ovarian cancer metastasis demonstrate preferential spread to the ovary and a requirement for the ovary for abdominal dissemination. *Transl. Res.* 2016, **175**, 92-102.
- COLAS, Claire, UNG, Peter M.-U., SCHLESSINGER, Avner. SLC transporters: structure, function, and drug discovery. *Med. Chem. Commun.* 2016; **7**(6), 1069-1081.
- COLOMBO, Nicoletta, PEIRETTI, Michele, GARBI, Annalisa, *et al.* Non-epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2012; **23**(Suppl.7), vii20-vii26.
- DARTOIS, Laureen, FAGHERAZZI, Guy, BAGLIETTO, Laura, *et al.* Proportion of premenopausal and postmenopausal breast cancers attributable to known risk factors: Estimates from the E3N-EPIC cohort. *Int. J. Cancer.* 2016; **138**(10), 2415-2427.
- DASARI, Shaloam, TCHOUNWOU, Paul B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 2014; **740**, 364-378.
- DEJEUX, Emelyne, RØNNEBERG, Jo A., SOLVANG, Hiroko, *et al.* DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response. *Mol. Cancer.* 2010; **9**(1), 68.
- DELFINO, Kristin R., RODRIGUEZ-ZAS, Sandra L. Transcription Factor-MicroRNA-Target Gene Networks Associated with Ovarian Cancer Survival and Recurrence. *PLoS One.* 2013; **8**(3), e58608.

- DIAZ-MORALLI, Santiago, TARRADO-CASTELLARNAU, Miriam, MIRANDA, Anibal, *et al.* Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 2013; **138**(2), 255-271.
- DU BOIS, Andreas, LÜCK, Hans J., MEIER, Werner, *et al.* A Randomized Clinical Trial of Cisplatin/Paclitaxel Versus Carboplatin/Paclitaxel as First-Line Treatment of Ovarian Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003; **95**(17), 1320-1330.
- DUFFY, Michael J., STURGEON, Catharine M., SÖLÉTORMOS, György, *et al.* Validation of New Cancer Biomarkers: A Position Statement from the European Group on Tumor Markers. *Clin. Chem.* 2015; **61**(6), 809-820.
- DUMONTET, Charles, JORDAN, Marry A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2010; **9**(10), 790-803.
- DUŠKOVÁ, Jaroslava, BEKOVÁ, Alena, DVOŘÁK, Vladimír, *et al.* Výsledky Národního programu screeningu karcinomu děložního hrdla v České republice. *Klin. Onkol.* 2014; **27**(Suppl 2), 2S69-2S78.
- EHRlichOVÁ, Marie, KOC, Michal, TRUKSA, Jaroslav, *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, Marie, MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Beatrice, HRDY, Jiri, *et al.* The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma. *Genomics.* 2013; **102**(2), 96-101.
- ENDOGENOUS HORMONES AND BREAST CANCER COLLABORATIVE GROUP. Body Mass Index, Serum Sex Hormones, and Breast Cancer Risk in Postmenopausal Women. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003; **95**(16), 1218-1226.
- EYRE, Rachel, HARVEY, Ian, STEMKE-HALE, Katherine, *et al.* Reversing paclitaxel resistance in ovarian cancer cells via inhibition of the ABCB1 expressing side population. *Tumor Biol.* 2014; **35**(10), 9879-9892.
- FABER, Mette T., JENSEN, Alexander, FREDERIKSEN, Kirsten, *et al.* Oral contraceptive use and impact of cumulative intake of estrogen and progestin on risk of ovarian cancer. *Cancer Causes & Control.* 2013; **24**(12), 2197-2206.
- FEKETE, Tibor, RÁSÓ, Erzsébet, PETE, Imre, *et al.* Meta-analysis of Gene Expression Profiles Associated with Histological Classification and Survival in 829 Ovarian Cancer Samples. *Int. J. Cancer.* 2012; **131**(1), 95-105.
- FENG, Yajing, PENG, Zhen, LIU, Weigang, *et al.* Evaluation of the epidemiological and prognosis significance of ESR2 rs3020450 polymorphism in ovarian cancer. *Gene.* 2019; **710**, 316-323.
- FERLAY, Jacques, SHIN, Hai R., BRAY, Freddie, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* 2010; **127**(12), 2893-2917.
- FERLAY, Jacques, SOERJOMATARAM, Isabelle, DIKSHIT, Rajesh, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015; **136**(5), E359-E386.
- FERRARO, Simona, BRAGA, Federica, LANZONI, Monica, *et al.* Serum human epididymis protein 4 vs carbohydrate antigen 125 for ovarian cancer diagnosis: a systematic review. *J. Clin. Pathol.* 2013; **66**(4), 273-281.

- FORD, Deborah, EASTON, Douglas F., BISHOP, D. Timothy, *et al.* Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet*. 1994; **343**(8899), 692-695.
- FORMAN, Barry M., GOODE, Elizabeth, CHEN, Jasmine, *et al.* Identification of a Nuclear Receptor That Is Activated by Farnesol Metabolites. *Cell*. 1995; **81**(5), 687-693.
- FROMMER, Marianne, McDONALD, Louise E., MILLAR, Douglas S., *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *PNAS*. 1992; **89**(5), 1827-1831.
- GAGO-DOMINGUEZ, Manuela, CASTELAO, J. Esteban, GUDE, Francisco, *et al.* Alcohol and breast cancer tumor subtypes in a Spanish Cohort. *SpringerPlus*. 2016; **5**(1), 39.
- GAUDET, Mia M., GAPSTUR, Susan M., SUN, Juzhong, *et al.* Active Smoking and Breast Cancer Risk: Original Cohort Data and Meta-Analysis. *JNCI*. 2013; **105**(8), 515-525.
- GOLDHIRSCH, Aron, INGLE, James N., GELBER, Richard D., *et al.* Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Ann. Oncol.* 2009; **20**(8), 1319-1329.
- GOTTESMAN, Michael M., FOJO, Tito, BATES, Susan E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*. 2002; **2**(1), 48-58.
- GUADAGNI, Fiorella, FERRONI, Patrizia, CARLINI, Sandro, *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.
- HAMMOND, Scott M., BERNSTEIN, Emily, BEACH, David, *et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000; **404**(6775), 293-296.
- HANNIBAL, Charlotte G., VANG, Russell, JUNGE, Jette, *et al.* A nationwide study of serous “borderline” ovarian tumors in Denmark 1978–2002: Centralized pathology review and overall survival compared with the general population. *Gynecol. Oncol.* 2014; **134**(2), 267-273.
- HE, Hongyu, XU, Cheng, ZHAO, Ziqin, *et al.* Low expression of SLC22A18 predicts poor survival outcome in patients with breast cancer after surgery. *Cancer Epidemiol.* 2011; **35**(3), 279-285.
- HEDDITCH, Ellen L., GAO, Bo, RUSSELL, Amanda J., *et al.* ABCA Transporter Gene Expression and Poor Outcome in Epithelial Ovarian Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014; **106**(7), dju149.
- HELLSTRÖM, Ingegerd, RAYCRAFT, John, HAYDEN-LEDBETTER, Martha, *et al.* The HE4 (WFDC2) Protein Is a Biomarker for Ovarian Carcinoma. *Cancer Res*. 2003; **63**(13), 3695-3700.
- HELPMAN, Limor, BEINER, Mario E., AVIEL-RONEN, Sarit, *et al.* Safety of ovarian conservation and fertility preservation in advanced borderline ovarian tumors. *Fertil. Steril.* 2015; **104**(1), 138-144.
- HERRAEZ, Elisa, GONZALEZ-SANCHEZ, Ester, VAQUERO, Javier, *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.

- HLAVÁČ, Viktor, BRYNYCHOVÁ, Veronika, VÁCLAVÍKOVÁ, Radka, *et al.* The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics*. 2013; **14**(5), 515-529.
- HLAVAC, Viktor, KOVACOVA, Maria, ELSNEROVA, Katerina, *et al.* Use of Germline Genetic Variability for Prediction of Chemoresistance and Prognosis of Breast Cancer Patients. *Cancers*. 2018; **10**(12), 511.
- HLAVATA, Ivona, MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Beatrice, VACLAVIKOVA, Radka, *et al.* The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis*. 2012; **27**(2), 187-196.
- HOU, Ningqi, HONG, Susan, WANG, Wenli, *et al.* Hormone Replacement Therapy and Breast Cancer: Heterogeneous Risks by Race, Weight, and Breast Density. *JNCI*. 2013; **105**(18), 1366-1372.
- HU, Yumin, ROSEN, Daniel G., ZHOU, Yan, *et al.* Mitochondrial Manganese-Superoxide Dismutase Expression in Ovarian Cancer. *J. Biol. Chem.* 2005; **280**(47), 39485-39492.
- HUDIS, Clifford A. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N. Engl. J. Med.* 2007; **357**(1), 39-51.
- HUHTINEN, Kaisa, SUVITIE, Pia, HISSA, Jukka, *et al.* Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts. *Br. J. Cancer*. 2009; **100**(8), 1315-1319.
- HUNTER, David J., COLDITZ, Graham A., HANKINSON, Susan E., *et al.* Oral Contraceptive Use and Breast Cancer: A Prospective Study of Young Women. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 2010; **19**(10), 2496-2502.
- HÜSEMANN, Yves, GEIGL, Jochen B., SCHUBERT, Falk, *et al.* Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2008; **13**(1), 58-68.
- CHAFFER, Christine L., WEINBERG, Robert A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*. 2011; **331**(6024), 1559-1564.
- CHEN, Yazhen, FU, Fangmeng, LIN, Yuxiang, *et al.* The precision relationships between eight GWAS-identified genetic variants and breast cancer in a Chinese population. *Oncotarget*. 2016; **7**(46), 75457-75467.
- CHMELAROVA, Marcela, KREPINSKA, Eva, SPACEK, Jiri, *et al.* Methylation in the p53 promoter in epithelial ovarian cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 2013; **15**(2), 160-163.
- ICON and AGO Collaborators. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet*. 2003; **361**(9375), 2099-2106.
- JANČÁRKOVÁ, Natalia, KRKAVCOVÁ, Miroslava, JANASHIA, Mimoza, *et al.* Prognostické faktory ovariálního karcinomu. *Čes. Gynek.* 2006; **71**(3), 252-259.
- JANUCHOWSKI, Radosław, ZAWIERUCHA, Piotr, ANDRZEJEWSKA, Małgorzata, *et al.* Microarray-based detection and expression analysis of ABC and SLC transporters in drug-resistant ovarian cancer cell lines. *Biomed. Pharmacother.* 2013; **67**(3), 240-245.
- JANUCHOWSKI, Radosław, ZAWIERUCHA, Piotr, RUCIŃSKI, Marcin, *et al.* Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. *Biomed. Pharmacother.* 2014; **68**(4), 447-453.

- JAYSON, Gordon C., KOHN, Elise C., KITCHENER, Henry C., *et al.* Ovarian cancer. *Lancet*. 2014, **384**(9951), 1376-1388.
- JOERGER, Andreas C., FERSHT, Alan R. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 2016; **85**, 375-404.
- JONES, Peter A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genetics*. 2012; **13**(7), 484-492.
- KAHLENBORN, Chris, MODUGNO, Francesmary, POTTER, Douglas M, *et al.* Oral Contraceptive Use as a Risk Factor for Premenopausal Breast Cancer: A Meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* 2006; **81**(10), 1290-1302.
- KALAYDA, Ganna V., WAGNER, Christina H., JAEHDE, Ulrich. Relevance of copper transporter 1 for cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *J. Inorg. Biochem.* 2012; **116**, 1-10.
- KALLIONIEMI, Olli P., OKSA, Heikki, AARAN, R.-K., *et al.* Serum CA 15-3 assay in the diagnosis and follow-up of breast cancer. *Br. J. Cancer*. 1988; **58**(2), 213-215.
- KAMAL, Chennappan K., SIMIONESCU, Cristiana E, MARGARITESCU, Claudiu, *et al.* P53 and Ki67 immunoexpression in mucinous malignant ovarian tumors. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2012; **53**(3 Suppl), 799-803.
- KEANE, Kevin N., CRUZAT, Vinicius F., CALTON, Emily K., *et al.* Molecular actions of vitamin D in reproductive cell biology. *Reproduction*. 2017; **153**(1), R29-R42.
- KELLAND, Lloyd. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2007; **7**(8), 573-584.
- KOBAYASHI, Eiji, UEDA, Yutaka, MATSUZAKI, Shinya, *et al.* Biomarkers for Screening, Diagnosis, and Monitoring of Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2012; **21**(11), 1902-1912.
- KOBAYASHI, Miharuru, SALOMON, Carlos, TAPIA, Jorge, *et al.* Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200. *J. Transl. Med.* 2014; **12**(1), 4.
- KOLOSSOVA, Katarina, SPICKA, Jan, MATKOWSKI, Rafal, *et al.* Isolation, primary culture, morphological and molecular characterization of circulating tumor cells in gynecological cancers. *Am. J. Transl. Res.* 2015; **7**(7), 1203-1213.
- KUBOKI, Yasutoshi, MATSUSAKA, Satoshi, MINOWA, Sayuri, *et al.* Circulating Tumor Cell (CTC) Count and Epithelial Growth Factor Receptor Expression on CTCs as Biomarkers for Cetuximab Efficacy in Advanced Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2013; **33**(9), 3905-3910.
- KÜHLBRANDT, Werner. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; **5**(4), 282-295.
- KUMMEROW, Kristy L., DU, Liping, PENSON, David F., *et al.* Nationwide Trends in Mastectomy for Early-Stage Breast Cancer. *JAMA Surg.* 2015; **150**(1), 9-16.
- KUNKEL, Thomas A., ERIE, Dorothy A. Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu. Rev. Genet.* 2015; **49**, 291-313.
- LACEY, James V., MINK, Pamela J., LUBIN, Jay H., *et al.* Menopausal Hormone Replacement Therapy and Risk of Ovarian Cancer. *JAMA*. 2002; **288**(3), 334-341.

- LEE, Yoo-Young, CHOI, Chel Hun, DO, In-Gu, *et al.* Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. *Gynecol. Oncol.* 2011; **122**(2), 361-365.
- LEHMAN, Teresa, MALLIREDDY, Vineela, SEDDON, Michael, *et al.* Association between an ABCC8/SUR1 polymorphism and breast cancer risk. Proceedings: AACR 99th Annual Meeting 2008, San Diego, CA, USA. Abstrakt v *Cancer Res. Supplement* 2008; **68**(9), 1934.
- LI, Long C., DAHIYA, Rajvir. *MethPrimer*: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002; **18**(11), 1427-1431.
- LIN, Chin Y., GUSTAFSSON, Jan Å. Targeting liver X receptors in cancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer.* 2015; **15**(4), 216-224.
- LISCOVITCH, Mordechai, RAVID, Dana. A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2007; **245**(1-2), 350-352.
- LIU, Johnson J., LU, Jun, MCKEAGE, Mark J. Membrane Transporters as Determinants of the Pharmacology of Platinum Anticancer Drugs. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2012; **12**(8), 962-986.
- LIU, Xia, LI, Qing, ZHOU, Jing, ZHANG, Su. 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.
- LIZ, Julia, ESTELLER, Manel. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; **1859**(1), 169-176.
- LOWE, Kimberly A., CHIA, Victoria M., TAYLOR, Alike, *et al.* An international assessment of ovarian cancer incidence and mortality. *Gynecol. Oncol.* 2013, **130**(1), 107-114.
- LOWY, Douglas 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.
- LUTSENKO, Svetlana, BARNES, Natalie L., BARTEE, Mee Y., *et al.* Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. *Physiol. Rev.* 2007; **87**(3), 1011-1046.
- MACK, Jody T., BELJANSKI, Vladimir, TEW, Kenneth D., *et al.* The ATP-binding cassette transporter ABCA2 as a mediator of intracellular trafficking. *Biomed. Pharmacother.* 2006; **60**(9), 587-592.
- MALONE, Kathleen E., BEGG, Colin B., HAILE, Robert W., *et al.* Population-Based Study of the Risk of Second Primary Contralateral Breast Cancer Associated With Carrying a Mutation in *BRCA1* or *BRCA2*. *J. Clin. Oncol.* 2010; **28**(14), 2404-2410.
- MANN, Andrea, HOGDALL, Estrid, RAMUS, Susan J., *et al.* Mismatch repair gene polymorphisms and survival in invasive ovarian cancer patients. *Eur. J. Cancer.* 2008; **44**(15), 2259-2265.
- MARTIN, Sarah A., LORD, Christopher J., ASHWORTH, Alan. Therapeutic Targeting of the DNA Mismatch Repair Pathway. *Clin. Cancer Res.* 2010; **16**(21), 5107-5113.

- METCALFE, 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.
- METCALFE, Kelly, GERSHMAN, Shelley, GHADIRIAN, Parviz, *et al.* Contralateral mastectomy and survival after breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations: retrospective analysis. *Br. Med. J.* 2014; **348**, g226.
- METZKER, Michael L. Sequencing technologies – the next generation. *Nat. Rev. Genetics.* 2010, **11**(1), 31-46.
- MODUGNO, Francesmary, NESS, Roberta B., ALLEN, Glenn O., *et al.* Oral contraceptive use, reproductive history, and risk of epithelial ovarian cancer in women with and without endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004; **191**(3), 733-740.
- MORENO-SMITH, Myrthala, HALDER, Jyotsnabaran B., MELTZER, Paul S., *et al.* ATP11B mediates platinum resistance in ovarian cancer. *J. Clin. Invest.* 2013; **123**(5), 2119-2130.
- MUELLER, Odilo, HAHNENBERGER, Karen, DITTMANN, Monika, *et al.* A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis.* 2000, **21**(1), 128-134.
- MURTAZA, Muhammed, DAWSON, Sarah J., TSUI, Dana W.Y., *et al.* Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature.* 2013; **497**(7447), 108-113.
- NAKAJIMA, Miki, FUJIKI, Yuto, KYO, Satoru, *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, Kentaro, KANZAKI, Atsuko, OGAWA, Kenji, *et al.* Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: Comparative analysis with expression of *MDR1*, *MRP1*, *MRP2*, *LRP* and *BCRP*. *Int. J. Cancer.* 2002; **101**(5), 488-495.
- NAKAYAMA, Kentaro, NAKAYAMA, Naomi, KATAGIRI, Hiroshi, *et al.* Mechanisms of Ovarian Cancer Metastasis: Biochemical Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; **13**(9), 11705-11717.
- NAROD, Steven A. BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010; **7**(12), 702-707.
- NECHUTA, Sarah J., CAAN, Bette J., CHEN, Wendy Y., *et al.* Soy food intake after diagnosis of breast cancer and survival: an in-depth analysis of combined evidence from cohort studies of US and Chinese women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012; **96**(1), 123-132.
- NESS, Roberta B., DODGE, Rhiannon C., EDWARDS, Robert P., *et al.* Contraception Methods, Beyond Oral Contraceptives and Tubal Ligation, and Risk of Ovarian Cancer. *Ann. Epidemiol.* 2011; **21**(3), 188-196.
- NIEMAN, Kristin M., KENNY, Hilary A., PENICKA, Carla V., *et al.* Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.* 2011; **17**(11), 1498-1503.

- NIKOLOVA, Dragomira N., DOGANOV, Nikolai, DIMITROV, Rumen, *et al.* Genome-wide Gene Expression Profiles of Ovarian Carcinoma: Identification of Molecular Targets for the Treatment of Ovarian Carcinoma. *Mol. Med. Rep.* 2009; **2**(3), 365-384.
- O'CONNELL, Greg J., RYAN, Eamonn, MURPHY, K. Joan, *et al.* Predictive value of CA 125 for ovarian carcinoma in patients presenting with pelvic masses. *Obstet. Gynecol.* 1987; **70**(6), 930-932.
- OFIR, Rachel, SEIDMAN, Rachel, RABINSKI, Tatiana, *et al.* Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death Differ.* 2002; **9**(6), 636-642.
- OHISHI, Yoshihiro, ODA, Yoshinao, UCHIUMI, Takeshi, *et al.* ATP-binding Cassette Superfamily Transporter Gene Expression in Human Primary Ovarian Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2002; **8**(12), 3767-3775.
- OSBORNE, C. Kent, BOLDT, David H., CLARK, Gary M., *et al.* Effects of Tamoxifen on Human Breast Cancer Cell Cycle Kinetics: Accumulation of Cells in Early G₁ Phase. *Cancer Res.* 1983; **43**(8), 3583-3585.
- PALM, Maria E., WEISE, Christoph F., LUNDIN, Christina, *et al.* Cisplatin binds human copper chaperone Atox1 and promotes unfolding in vitro. *PNAS.* 2011; **108**(17), 6951-6956.
- PALMGREN, Michael G., NISSEN, Poul. P-Type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* 2011; **40**, 243-266.
- PAYEN, Valery L., PORPORATO, Paolo E., BASELET, Bjorn, *et al.* Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; **73**(7), 1333-1348.
- PEARCE, Celeste L., TEMPLEMAN, Claire, ROSSING, Mary A., *et al.* Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol.* 2012; **13**(4), 385-394.
- PERLAND, Emelie, FREDRIKSSON, Robert. Classification Systems of Secondary Active Transporters. *Trends Pharmacol. Sci.* 2017; **38**(3), 305-315.
- PEROU, Charles M., SÛRLIE, Therese, EISEN, Michael B., *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; **406**(6797), 747-752.
- PFAFFL, Michael W., HORGAN, Graham W., DEMPFLE, Leo. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; **30**(9), e36.
- PHIPPS, Amanda I., CHLEBOWSKI, Rowan T., PRENTICE, Ross, *et al.* Reproductive History and Oral Contraceptive Use in Relation to Risk of Triple-Negative Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011; **103**(6), 470-477.
- PICCART, Martine J., BERTELSEN, Kamma, JAMES, Keith, *et al.* Randomized Intergroup Trial of Cisplatin-Paclitaxel Versus Cisplatin-Cyclophosphamide in Women With Advanced Epithelial Ovarian Cancer: Three-Year Results. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; **92**(9), 699-708.
- PIZOT, Cécile, BONIOL, Mathieu, MULLIE, Patrick, *et al.* Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Eur. J. Cancer.* 2016; **52**, 138-154.

- PORPORATO, Paolo E., PAYEN, Valéry L., BASELET, Bjorn, *et al.* Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 2: Mitochondria, lipid and amino acid metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; **73**(7), 1349-1363.
- PRADEEP, Sunila, KIM, Seung W., WU, Sherry Y., *et al.* Hematogenous Metastasis of Ovarian Cancer: Rethinking Mode of Spread. *Cancer Cell.* 2014; **26**(1), 77-91.
- PRAT, Jaime. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* 2012; **460**(3), 237-249.
- PRESTON-MARTIN, Susan, PIKE, Malcolm C., ROSS, Ronald K., *et al.* Increased Cell Division as a Cause of Human Cancer. *Cancer Res.* 1990; **50**(23), 7415-7421.
- PUJADE-LAURINE, Eric, HILPERT, Felix, WEBER, Béatrice, *et al.* Bevacizumab Combined With Chemotherapy for Platinum-Resistant Recurrent Ovarian Cancer: The AURELIA Open-Label Randomized Phase III Trial. *J. Clin. Oncol.* 2014; **32**(13), 1302-1308.
- QI, Peng, DU, Xiang. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine. *Mod. Pathol.* 2013; **26**(2), 155-165.
- QIU, Jun J., LIN, Ying Y., YE, Le C., *et al.* Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts poor patient prognosis and promotes tumor metastasis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2014; **134**(1), 121-128.
- QIU, Jun J., WANG, Yan, DING, Jing X., *et al.* The long non-coding RNA HOTAIR promotes the proliferation of serous ovarian cancer cells through the regulation of cell cycle arrest and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 2015; **333**(2), 238-248.
- RAMANATHAN, Balakrishnan, JAN, Kun Y., CHEN, Chien H., *et al.* Resistance to Paclitaxel Is Proportional to Cellular Total Antioxidant Capacity. *Cancer Res.* 2005, **65**(18), 8455-8460.
- RASMUSSEN, Christina B., KJAER, Susanne K., ALBIERI, Vanna, *et al.* Pelvic Inflammatory Disease and the Risk of Ovarian Cancer and Borderline Ovarian Tumors: A Pooled Analysis of 13 Case-Control Studies. *Am. J. Epidemiol.* 2017; **185**(1), 8-20.
- REED, Kerry, HEMBRUFF, Stacey L., SPROWL, Jason A., *et al.* The temporal relationship between *ABCBI* promoter hypomethylation, *ABCBI* expression and acquisition of drug resistance. *Pharmacogenomics J.* 2010; **10**(6), 489-504.
- ROBERTSON, Keith D. DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genetics.* 2005; **6**(8), 597-610.
- RUBIN, Stephen C., BENJAMIN, Ivor, BEHBAKHT, Kian, *et al.* Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of *BRCAl*. *N. Engl. J. Med.* 1996; **335**(19), 1413-1416.
- RUDAS, Margaretha, FILIPITS, Martin, TAUCHER, Susanne, *et al.* Expression of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 2003; **81**(2), 149-157.
- RUSTIN, Gordon J.S., NELSTROP, A.E., TUXEN, Malgorzata K., *et al.* Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA 125: A North Thames Ovary Group study. *Ann. Oncol.* 1996; **7**(4), 361-364.

- SAFI, Farouk, KOHLER, Ingrid, RÖTTINGER, Erwin, *et al.* The Value of the Tumor Marker CA 25-3 in Diagnosing and Monitoring Breast Cancer. A Comparative Study With Carcinoembryonic Antigen. *Cancer*. 1991; **68**(3), 574-582.
- SAMIMI, Goli, SAFAEI, Roohangiz, KATANO, Kuniyuki, *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, Bohumil, MÁJEK, Ondřej, ZAVORAL, Miroslav, *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.
- SHEN, Zheng, ZHANG, Xiaohui, TANG, Jinfu, *et al.* The coupling of epidermal growth factor receptor down regulation by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 to the hormone-induced cell cycle arrest at the G1-S checkpoint in ovarian cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011; **338**(1-2), 58-67.
- SHIMO, Arata, NISHIDATE, Toshihiko, OHTA, Tomohiko, *et al.* Elevated expression of protein regulator of cytokinesis 1, involved in the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2007; **98**(2), 174-181.
- SCHROEDER, Andreas, MUELLER, Odilo, STOCKER, Susanne, *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 2006; **7**, 3.
- SCHWARTZ, Donald R., KARDIA, Sharon L. R., SHEDDEN, Kerby 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.
- SIEGEL, Rebecca, MA, Jiemin, ZOU, Zhaohui, *et al.* Cancer statistics, 2014. *Ca-Cancer J. Clin.* 2014; **64**(1), 9–29.
- SIEH, Weiva, SUNDQUIST, Kristina, SUNDQUIST, Jan, *et al.* Intrauterine factors and risk of nonepithelial ovarian cancers. *Gynecol. Oncol.* 2014; **133**(2), 293-297.
- SIM, Ngak-Leng, KUMAR, Prateek, HU, Jing, *et al.* SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012; **40**(W1), W452–W457.
- SKOVAJSOVÁ, Miroslava, MÁJEK, Ondřej, DANEŠ, Jan, *et al.* Výsledky Národního programu screeningu karcinomu prsu v České republice. *Klin. Onkol.* 2014; **27**(Suppl 2), 2S69-2S78.
- SÖLÉTORMOS, György, DUFFY, Michael J., ABU HASSAN, Suher O., *et al.* Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2016; **26**(1), 43-51.
- SONG, Honglin, RAMUS, Susan J., QUAYE, Lydia, *et al.* Common variants in mismatch repair genes and risk of invasive ovarian cancer. *Carcinogenesis.* 2006; **27**(11), 2235-2242.
- SØRLIE, Therese, PEROU, Charles M., TIBSHIRANI, Robert, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS.* 2001; **98**(19), 10869-10874.
- SOUČEK, Pavel, ANZENBACHER, Pavel, SKOUMALOVÁ, Ivana, *et al.* Expression of Cytochrome P450 Genes in CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells.* 2005, **23**(9), 1417-1422.

- SUCHÁNEK, Štěpán, MÁJEK, Ondřej, ZAVORAL, Miroslav, *et al.* Výsledky Národního programu screeningu kolorektálního karcinomu v České republice – kolonoskopická vyšetření. *Klin. Onkol.* 2014; **27**(Suppl 2), 2S98-2S105.
- SUN, Can L., YUAN, Jian M., KOH, Woon P., *et al.* Green tea, black tea and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *Carcinogenesis.* 2006; **27**(7), 1310-1315.
- SUROWIAK, Pawel, MATERNA, Verena, KAPLENKO, Irina, *et al.* Topoisomerase 1A, HER/2*neu* and Ki67 expression in paired primary and relapse ovarian cancer tissue samples. *Histol. Histopathol.* 2006; **21**(7), 713-720.
- SUZUKI, Fumihiko, AKAHIRA, Jun, MIURA, Ikumi, *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.
- SWALES, Karen E., KORBONITS, Marta, CARPENTER, Robert, *et al.* The Farnesoid X Receptor Is Expressed in Breast Cancer and Regulates Apoptosis and Aromatase Expression. *Cancer Res.* 2006, **66**(20), 10120-10126.
- TEODORIDIS, Jens M., HALL, Jacqueline, MARSH, Sharon, *et al.* CpG Island Methylation of DNA Damage Response Genes in Advanced Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2005; **65**(19), 8961-8967.
- TIAN, Chunqiao, AMBROSONE, Christine B., DARCY, Kathleen M., *et al.* Common variants in ABCB1, ABCC2 and ABCG2 genes and clinical outcomes among women with advanced stage ovarian cancer treated with platinum and taxane-based chemotherapy: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.* 2012; **124**(3), 575-581.
- TOPIC, Elizabeta, GLUHAK, Jelica. Isolation of Restrictible DNA. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1991; **29**(5), 327-330.
- TSILIDIS, Konstantinos K., ALLEN, Naomi E., KEY, Tim J., *et al.* Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br. J. Cancer.* 2011; **105**(9), 1436-1442.
- TSUDA, Hitoshi, ITO, Yoichi M., OHASHI, Y., *et al.* Identification of Overexpression and Amplification of ABCF2 in Clear Cell Ovarian Adenocarcinomas by cDNA Microarray Analyses. *Clin. Cancer Res.* 2005; **11**(19), 6880-6888.
- TWOROGER, Shelley S., FAIRFIELD, Kathleen M., COLDITZ, Graham A., *et al.* Association of Oral Contraceptive Use, Other Contraceptive Methods, and Infertility with Ovarian Cancer Risk. *Am. J. Epidemiol.* 2007; **166**(8), 894-901.
- VANDESOMPELE, Jo, DE PRETER, Katleen, PATTYN, Filip, *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.
- VASILIOU, Vasilis, VASILIOU, Konstandinos, NEBERT, Daniel W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum. Genomics.* 2009; **3**(3), 281-290.
- VECCHIONE, Andrea, BELLETTI, Barbara, LOVAT, Francesca, *et al.* microRNA signature defines chemoresistance in ovarian cancer through modulation of angiogenesis. *PNAS.* 2013; **110**(24), 9845-9850.

- VESSEY, Martin, YEATES, David. Oral contraceptive use and cancer: final report from the Oxford–Family Planning Association contraceptive study. *Contraception*. 2013; **88**(6), 678-683.
- WARD, Lucas D., KELLIS, Manolis. 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, Miranda P., ARMSTRONG, Mia A., OEHLER, Martin K., *et al*. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2015; **96**(2), 220-256.
- WILKENS, Stephan. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*. 2015; **7**.
- WIMAN, Klas G., ZHIVOTOVSKY, Boris. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. *J. Intern. Med*. 2017; **281**(5), 483-495.
- WOJDACZ, Tomasz K., DOBROVIC, Alexander. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res*. 2007; **35**(6), e41.
- XIAO, Xue, MELTON, David W., GOURLEY, Charlie. Mismatch repair deficiency in ovarian cancer – Molecular characteristics and clinical implications. *Gynecol. Oncol*. 2014; **132**(2), 506-512.
- YAGER, James D., DAVIDSON, Nancy E. Mechanisms of disease: Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med*. 2006; **354**(3), 270-282.
- YALAZA, Metin, INAN, Aydin, BOZER, Mikdat. Male Breast Cancer. *J. Breast Health*. 2016; **12**(1), 1-8.
- YEUNG, Tsz-Lun, LEUNG, Cecilia S., YIP, Kay-Pong, *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, Ruitao, SHI, Huirong, REN, Fang, *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, Xiaohui, NICOSIA, Santo V., BAI, Wenlong. Vitamin D receptor is a novel drug target for ovarian cancer treatment. *Curr. Cancer Drug Targets*. 2006; **6**(3), 229-244.
- ZHAO, Linjie, HUANG, Shuang, MEI, Shenglin, *et al*. Pharmacological activation of estrogen receptor beta augments innate immunity to suppress cancer metastasis. *PNAS*. 2018; **115**(16), E3673-E3681.
- ZHAO, Zhiguo, WEN, Wanqing, MICHAILIDOU, Kyriaki, *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.
- ZISOWSKY, Jochen, KOEGEL, Susanne, LEYERS, Stefan, *et al*. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem. Pharmacol*. 2007; **73**(2), 298-307.

3. Internetové zdroje

Cellosaurus. *ExpASy* [online]. [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: http://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1452

Ensembl [online]. [cit. 2015-10-27]. Dostupné z: <http://www.ensembl.org/index.html>

Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.svod.cz/>

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

NCBI [online]. [cit. 2015-10-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Novotvary. *ÚZIS* [online]. [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary>

Primer3web version 4.0.0 [online]. [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://primer3.ut.ee/>

Qiagen [online]. [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/>

ThermoFisher Scientific [online]. [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html>

xCELLigence RTCA DP Real Time Cell Analyzer. *ACEA Biosciences* [online.] [cit. 2017-06-05]. Dostupné z: <https://www.aceabio.com/product/rtca-dp/>

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Seznam cílových genů a prób (TaqMan Gene Expression Assay) použitých ve studiích zabývajících se ovariálním karcinomem.

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

Příloha 2: SOUCEK, Pavel, HLAVAC, Viktor, ELSNEROVA, Katerina, *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

Příloha 3: ELSNEROVA, Katerina, MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Beatrice, CEROVSKA, Ela, *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

Příloha 4: ELSNEROVA, Katerina, BARTAKOVA, Alena, TIHLARIK, Josef, *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

Příloha 5: VACLAVIKOVA, Radka, KLAJIC, Jovana, BRYNYCHOVA, Veronika, ELSNEROVA, Katerina, *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)

Příloha 6: VÁCLAVÍKOVÁ, Radka, ELSNEROVÁ, Kateřina, MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, Beatrice, *et al.* Markery progresu a vzniku metastáz u ovariálního karcinomu sledované na základě genových expresních profilů. *Plzeň. Lék. Sborn.* 2015; **81**, 39-55. Hodnoceno dle systému RIV

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

Příloha 7: CEROVSKA, Ela, ELSNEROVA, Katerina, VACLAVIKOVA, Radka, *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

Příloha 8: HLAVAC, Viktor, KOVACOVA, Maria, ELSNEROVA, Katerina, *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

Příloha 9: SEBOROVA, Karolina, VACLAVIKOVA, Radka, SOUCEK, Pavel, ELSNEROVA, Katerina, *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

Příloha 1: Seznam cílových genů a prób (TaqMan Gene Expression Assay) použitých ve studiích zabývajících se ovariálním karcinomem.

Gen	Název genu (angl.)	Assay	Studie ^a
GAPDH ^b	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	Hs02758991_g1	
GUSB ^b	Glucuronidase Beta	Hs99999908_m1	
PPIA ^b	Peptidylprolyl Isomerase A	Hs99999904_m1	A, B, C
TBP ^b	TATA-Box Binding Protein	Hs00920495_m1	
UBC ^b	Ubiquitin C	Hs00824723_m1	A, B, C
YWHAZ ^b	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta	Hs03044281_g1	A, B, C
ABCA1	ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 1	Hs00194045_m1	A, C
ABCA2	ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 2	Hs00242232_m1	A, B, C
ABCA3	ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 3	Hs00184543_m1	A, B, C
ABCA7	ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 7	Hs00185303_m1	A, C
ABCA8	ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 8	Hs00992371_m1	A, B, C
ABCA9	ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 9	Hs00329320_m1	A, B, C
ABCA10 ^c	ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 10	Hs00365268_m1	A, B, C
ABCA12	ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 12	Hs00292421_m1	A, B, C
ABCA13	ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 13	Hs01110169_m1	A, C
ABCB1	ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 1	Hs00184491_m1	A, B, C
ABCB2	ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 2	Hs00388677_m1	A, C
ABCB3	ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 3	Hs00241060_m1	A, C
ABCB4	ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 4	Hs00240956_m1	A, C
ABCB5	ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 5	Hs00698751_m1	A
ABCB11	ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 11	Hs00184824_m1	A, C
ABCC1	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 1	Hs00219905_m1	A, C
ABCC2	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 2	Hs00166123_m1	A, C
ABCC3	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 3	Hs00358656_m1	A, B, C
ABCC4	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 4	Hs00195260_m1	A, C
ABCC5	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 5	Hs00981089_m1	A, C
ABCC6	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 6	Hs00184566_m1	A, B, C
ABCC7	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 7	Hs00357011_m1	A
ABCC8	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 8	Hs00165861_m1	A,
ABCC9	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 9	Hs00245832_m1	A, B, C
ABCC10	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 10	Hs00375716_m1	A, C
ABCC11	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 11	Hs01090768_m1	A
ABCC12	ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 12	Hs00264354_m1	A
ABCD1	ATP-Binding Cassette Subfamily D Member 1	Hs00163610_m1	A, C
ABCD2	ATP-Binding Cassette Subfamily D Member 2	Hs00193054_m1	A, B, C
ABCD3	ATP-Binding Cassette Subfamily D Member 3	Hs00161065_m1	A, B, C
ABCD4	ATP-Binding Cassette Subfamily D Member 4	Hs00245340_m1	A, C
ABCE1	ATP-Binding Cassette Subfamily E Member 1	Hs01009190_m1	A, C

ABCF1	ATP-Binding Cassette Subfamily F Member 1	Hs00153703_m1	A, C
ABCF2	ATP-Binding Cassette Subfamily F Member 2	Hs00606493_m1	A, C
ABCF3	ATP-Binding Cassette Subfamily F Member 3	Hs00217977_m1	A, C
ABCG1	ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 1	Hs00245154_m1	A, B, C
ABCG2	ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 2	Hs00184979_m1	A, B, C
ABCG5	ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 5	Hs00223686_m1	A
ABCG8	ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 8	Hs00223690_m1	A, C
ATOX1	Antioxidant 1 Copper Chaperone	Hs00187841_m1	A, C
ATP7A	ATPase Copper Transporting Alpha	Hs00163707_m1	A, B, C
ATP7B	ATPase Copper Transporting Beta	Hs00163739_m1	A, B, C
ATP11B	ATPase Phospholipid Transporting 11B (Putative)	Hs00966779_m1	A, C
CYP2C8	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 8	Hs00258314_m1	A
CYP3A4	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4	Hs00430021_m1	A
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Hs01076078_m1	A, B, C
ESR1	Estrogen Receptor 1	Hs00174860_m1	A
ESR2	Estrogen Receptor 2	Hs01100357_m1	A, B, C
GLRX ^c	Glutaredoxin	Hs00829752_g1	A, B, C
GPX3	Glutathione Peroxidase 3	Hs01078668_m1	A
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	Hs01001580_m1	A, B, C
HSP70	Heat Shock 70kDa Protein 4	Hs00382884_m1	A
HSP90AA1 ^c	Heat Shock 90kDa Protein 1, Alpha	Hs00743767_sH	A
KIF11	Kinesin Family Member 11	Hs00189698_m1	A
MKI67	Marker Of Proliferation Ki-67	Hs01032443_m1	A, B, C
MLH1	MutL Homolog 1	Hs00179866_m1	A, B, C
MLH3	MutL Homolog 3	Hs00271778_m1	A, B, C
MSH2	MutS Homolog 2	Hs00953523_m1	A, B, C
MSH3	MutS Homolog 3	Hs00989003_m1	A
MSH4 ^c	MutS Homolog 4	Hs00172489_m1	A
MSH6	MutS Homolog 6	Hs00264721_m1	A
NR0B2	Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 2	Hs00222677_m1	A, B, C
NR1H2 ^c	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 2	Hs00173195_m1	A
NR1H3	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 3	Hs00172885_m1	A
NR1H4	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 4	Hs00231968_m1	A, B, C
NR1I1	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group I Member 1	Hs01045840_m1	A, C
NR1I2	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group I Member 2	Hs01114267_m1	A, B, C
NR1I3	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group I Member 3	Hs00901571_m1	A
PLK1 ^c	Polo Like Kinase 1	Hs00153444_m1	A, B, C
PLK2	Polo Like Kinase 2	Hs01573405_g1	A, C
PMS1 ^c	PMS1 Homolog 1, Mismatch Repair System Component	Hs00922262_m1	A, C
PMS2	PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System	Hs00241053_m1	A

	Component	
PRC1	Protein Regulator Of Cytokinesis 1	Hs00187740_m1 B, C
PRKCH	Protein Kinase C Eta	Hs00178933_m1 A
RXRA	Retinoid X Receptor Alpha	Hs01067636_m1 A
RXRB	Retinoid X Receptor Beta	Hs00232774_m1 A
RXRG	Retinoid X Receptor Gamma	Hs00199455_m1 A
SLC16A14	Solute Carrier Family 16 Member 14	Hs00541300_m1 A, B, C
SLC22A1	Solute Carrier Family 22 Member 1	Hs00427552_m1 A, C
SLC22A2	Solute Carrier Family 22 Member 2	Hs01010723_m1 A
SLC22A3	Solute Carrier Family 22 Member 3	Hs01009568_m1 A, C
SLC22A4 ^d	Solute Carrier Family 22 Member 4	Hs00268200_m1 A, C
SLC22A5	Solute Carrier Family 22 Member 5	Hs00929869_m1 A, B, C
SLC22A11	Solute Carrier Family 22 Member 11	Hs00945829_m1 A
SLC22A18	Solute Carrier Family 22 Member 18	Hs00180039_m1 A, C
SLC31A1	Solute Carrier Family 31 Member 1	Hs00977268_g1 A, C
SLC31A2	Solute Carrier Family 31 Member 2	Hs00156984_m1 A, C
SLC47A1	Solute Carrier Family 47 Member 1	Hs00217320_m1 A, C
SLC47A2	Solute Carrier Family 47 Member 2	Hs00945650_m1 A
SOD1	Superoxide Dismutase 1, Soluble	Hs00533490_m1 A, B
SOD2	Superoxide Dismutase 2, Mitochondrial	Hs00167309_m1 A, B, C
SOD3	Superoxide Dismutase 3, Extracellular	Hs00162090_m1 A, B, C
TP53	Tumor Protein p53	Hs01034249_m1 A, B, C
TRAP1	TNF Receptor Associated Protein 1	Hs00212474_m1 A, C
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	Hs00900055_m1 A

^aStudie, v níž byl daný gen analyzován. A – pilotní studie; B – validační studie; C – studium intraperitoneálních metastáz.

^bGeny, u nichž byla testována stabilita exprese a z nichž byly vybírány referenční geny.

^cGeny, u nichž byla teplota nasedání primerů při real-time PCR 62 °C.

^dGen, u něž byla teplota nasedání primerů při real-time PCR 58 °C.

Příloha 2:

SOUCEK, Pavel, HLAVAC, Viktor, ELSNEROVA, Katerina, *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

Příloha 3:

ELSNEROVA, Katerina, MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Beatrice, CEROVSKA, Ela, *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

Příloha 4:

ELSNEROVA, Katerina, BARTAKOVA, Alena, TIHLARIK, Josef, *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

Příloha 5:

VACLAVIKOVA, Radka, KLAJIC, Jovana, BRYNYCHOVA, Veronika, ELSNEROVA, Katerina, *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

Příloha 6:

VÁCLAVÍKOVÁ, Radka, ELSNEROVÁ, Kateřina, MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, Beatrice, *et al.* Markery progresu a vzniku metastáz u ovariálního karcinomu sledované na základě genových expresních profilů. *Plzeň. Lék. Sborn.* 2015; **81**, 39-55. Hodnoceno dle systému RIV

Příloha 7:

CEROVSKA, Ela, ELSNEROVA, Katerina, VACLAVIKOVA, Radka, *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

Příloha 8:

HLAVAC, Viktor, KOVACOVA, Maria, ELSNEROVA, Katerina, *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

Příloha 9:

SEBOROVA, Karolina, VACLAVIKOVA, Radka, SOUCEK, Pavel, ELSNEROVA, Katerina, *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