

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Petr Dostál

**Studium chemorezistence u pacientů s kolorektálním karcinomem léčených
5-fluorouracilem**

A study of chemoresistance by patients with colorectal cancer treated with
5-fluorouracil

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Veronika Vymetálková, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem vycházel. Veškerý text jsem vypracoval podle pravidel a zodpovídám za jeho jazykovou správnost.

V Praze, 23.4. 2024



Bc. Petr Dostál

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat své školitelce Ing. Veronice Vymetálkové, Ph.D. za její pomoc, rady, laskavý přístup a ochotu se vším pomoci. Zároveň chci poděkovat za přidělení velice zajímavého tématu pro svůj diplomový projekt.

Dále bych rád poděkoval své konzultantce Ing. Anně Šiškové za její profesionalitu, ochotu, trpělivost a velkou pomoc při experimentech v laboratoři. Její rady byly přínosné také při psaní diplomové práce a tvorbě prezentace na obhajobu diplomové práce.

Touto cestou bych rád poděkoval svému konzultantovi MUDr. Josefovi Horákovi, Ph.D. za pomoc při práci s buňkami a během bioinformatické analýzy. Děkuji také za věcné poznámky při psaní diplomové práce.

Další poděkování patří paní Dominice Duškové za pomoc se vzorky pacientů, RNDr. Petrovi Hanákovi, Ph.D. za cenné rady při vybírání vhodných primerů a také Mgr. et Ing. Táně Závodné z oddělení Genetické toxikologie a epigenetiky za konzultaci při tvorbě knihoven.

Velké poděkování také patří Mgr. Selvi za pomoc během validace kandidátních genů.

Na závěr chci poděkovat MUDr. Pavlovi Vodičkovi, CSc., DSc. a celému oddělení Molekulární biologie nádorů na Ústavu experimentální medicíny AV ČR za možnost vypracování diplomového projektu, za spoustu nových zkušeností a v neposlední řadě také za skvělý lidský přístup.

Abstrakt

Volba léčebné strategie u onkologických pacientů závisí na celé řadě klinických a molekulárně biologických faktorů. Ačkoliv již bylo navrženo několik molekulárních biomarkerů, v klinické praxi se jich využívá jen pár a stále jich není dostatek pro spolehlivou personalizovanou medicínu. Vzhledem k nedostatečným výsledkům úspěšnosti léčby u mnoha pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) je zde naléhavá potřeba personalizované medicíny s cílem identifikovat nové prediktivní biomarkery.

Jednou z hlavních překážek při léčbě pokročilého stádia CRC je vývoj chemorezistence k systémové chemoterapii. Časná detekce rezistentních klonů nádorových buněk by mohla vést ke změně léčebných režimů, avšak vyžaduje dlouhodobé sledování pacientů a poznání specifických markerů chemorezistence.

Náplní této diplomové práce bylo stanovení biomarkerů spjatých s chemorezistencí na 5-fluorouracil (5-FU), jedno z nejčastěji používaných chemoterapeutik v léčbě pacientů s CRC. V prvním kroku se z maternálních (sensitivních) a rezistentních DLD-1 (rezistenti na 40 μ M 5-FU a rezistenti na 160 μ M 5-FU) buněčných linií připravila knihovna pro sekvenování celého transkriptomu za využití sekvenování nové generace (NGS). Pomocí bioinformatických analýz se vybraly vhodné kandidátní geny (*HIST1H2BE*, *CD44*, *DKK1*, *ALDH1L1* a *ABCC2*) k validaci na vzorcích od pacientů s CRC léčených 5-FU. Ty zahrnovaly tumorovou tkáň a okolní nepostiženou mukózu od pacientů s CRC, u kterých byla zjištěna buď chemorezistence, nebo kompletní odpověď na léčbu.

Na základě validace dat jsme potvrdili trend genové exprese u genů *CD44*, *DKK1*, *ABCC2* a *ALDH1L1*. Potenciální využití nově objevených markerů v klinické praxi u pacientů s CRC by mohlo přinést zlepšení léčby CRC.

Klíčová slova:

kolorektální karcinom, chemorezistence, 5-fluorouracil, biomarkery

Abstract

The choice of treatment strategy in patients with malignant disease depends on various clinical and molecular biological factors. Although several molecular predictive biomarkers have already been proposed, only a few of them are used in clinical practice and the number is still not enough for reliable personalized medicine. Given the lack of treatment success results in many colorectal cancer (CRC) patients, there is an urgent need for personalized medicine to identify new predictive biomarkers.

One of the main clinical challenges in the treatment of advanced CRC is the development of chemoresistance to systematic chemotherapy. Early detection of resistant cancer cells clones could lead to changes in treatment regimens but it requires a long-term follow up of patients and monitoring of specific markers of chemoresistance.

The aim of this master's thesis has been to determine the biomarkers associated with chemoresistance to 5-FU drug, one of the most used chemotherapeutics in the treatment of CRC patients. In the first step, the whole transcriptome of maternal (sensitive) and resistant DLD-1 (line resistant to 40 μM 5-FU and line resistant to 160 μM 5-FU) cell lines using the next generation sequencing (NGS) has been analyzed. Through bioinformatic analyses, potential candidate genes (*HIST1H2BE*, *CD44*, *DKK1*, *ALDH1L1* and *ABCC2*) were selected for subsequent validation in samples from CRC patients treated with 5-FU. These samples included tumor tissue and adjacent unaffected mucosa from CRC patients identified with chemoresistance or complete response to therapy.

Based on the data validation we confirmed the gene expression trend for the *CD44*, *DKK1*, *ABCC2* and *ALDH1L1* genes. The potential use of new discovered markers in clinical practice in CRC patients could lead to improvements in CRC treatment.

Keywords:

colorectal cancer, chemoresistance, 5-fluorouracil, biomarkers

Obsah

1.	Teoretický úvod	10
1.1	Kolorektální karcinom	10
1.1.1	Epidemiologie.....	10
1.1.2	Vlastnosti nádorových CRC buněk	13
1.1.3	Klasifikace CRC	15
1.2	Možnosti léčby.....	16
1.2.1	Mechanismus účinku 5-FU	18
1.2.2	Proléčiva 5-FU	20
1.3	Rezistence buněk	22
1.4	Biomarkery	23
2.	Cíle a hypotéza práce	26
3.	Materiál a metody	27
3.1	Použité chemikálie	27
3.2	Použité vybavení.....	28
3.3	Použité přístroje	29
3.4	Použité softwary	30
3.5	Práce s DLD-1 buněčnými liniemi.....	30
3.5.1	Rozmražení buněk	30
3.5.2	Kultivace buněk	31
3.5.3	Pasážování buněk	31
3.5.4	Zmrazení buněk	31
3.5.5	Testování na mycoplazmu	32
3.5.6	Izolace RNA	33
3.5.7	Kontrola kvality RNA	34
3.6	Příprava knihoven na sekvenování celého transkriptomu	36
3.6.1	rRNA deplece	36
3.6.2	Příprava knihoven na NGS sekvenaci	39
3.7	Bioinformatická analýza NGS dat	43
3.8	Validace vybraných kandidátních genů chemorezistence	44
3.8.1	Výběr finálního setu pacientů.....	44

3.8.2 Izolace RNA z tkáně pacientů	45
3.8.3 Reverzní transkripce RNA do cDNA	45
3.9 Statistická analýza.....	47
4. Výsledky	49
4.1 Stanovení transkriptomu chemorezistentních DLD-1 buněčných linií.....	49
4.2 Bioinformatická analýza a výběr kandidátních genů.....	50
4.2.1 Výběr kandidátních genů na základě zpracování bioinformatických (terciálních) dat ze sekvenování DLD-1 buněčných linií.....	54
4.3 Validace vybraných kandidátních genů v lidských vzorcích u pacientů s CRC se špatnou odpovědí na chemoterapii 5-FU	57
5. Diskuze	61
6. Závěr	66
7. Seznam příloh	67
8. Použitá literatura	71

Seznam zkratek

<u>zkratka:</u>	<u>anglický název:</u>	<u>český název:</u>
5-DFUR	5-deoxy-fluorouridine	5-deoxy-fluorouridin
5-FU	5-fluorouracil	5-fluorouracil
ADP	adenosinediphosphate	adenosindifosfát
ATP	adenosinetriphosphate	adenosin trifosfát
CA 19-9	carbohydrate antigen	sacharidový antigen
CEA	carcinoembryonic antigen	karcinoembryonální antigen
CES	carboxylesterase	karboxylesteráza
CH2THF	5,10-dimethylenetetrahydrofolate	5,10-dimethylenetetrahydrofolát
CH3THF	5-methylenetetrahydrofolate	5-methylenetetrahydrofolát
CRC	colorectal cancer	kolorektální karcinom
CT	Cycle Treshold	směrodatná odchylka mezi cykly
DHFU	dihydrofluorouracil	dihydrofluorouracil
DLD-1 R40	DLD-1 resistant 40 μ M 5-FU	DLD-1 rezistentní na 40 μ M 5-FU
DLD-1 R160	DLD-1 resistant 160 μ M 5-FU	DLD-1 rezistentní na 40 μ M 5-FU
DLD-1 WT	DLD-1 wild type	DLD-1 wild type
DMSO	dimethylsulfoxide	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid	kyselina deoxyribonukleová
DPD	dihydropyrimidinedehydrogenase	dihydropyrimidin dehydrogenáza
dThd	deoxythymidine	deoxythymidin
dTDP	deoxythymidinediphosphate	deoxythymidindifosfát
dTMP	deoxythymidinemonophosphate	deoxythymidinmonofosfát
dTTP	deoxythymidinetriphosphate	deoxythymidin trifosfát
dUMP	deoxyuridinemonophosphate	deoxyuridinmonofosfát
EMT	epithelial-mesenchymal transition	epitelo-mezenchymální tranzice
FBS	fetal bovine serum	fetální bovinní sérum
FdUDP	fluorodeoxyuridinediphosphate	fluorodeoxyuridindifosfát
FdUMP	fluorodeoxyuridinemonophosphate	fluorodeoxyuridinmonofosfát
FdUrd	fluorodeoxyuridine	fluorodeoxyuridin

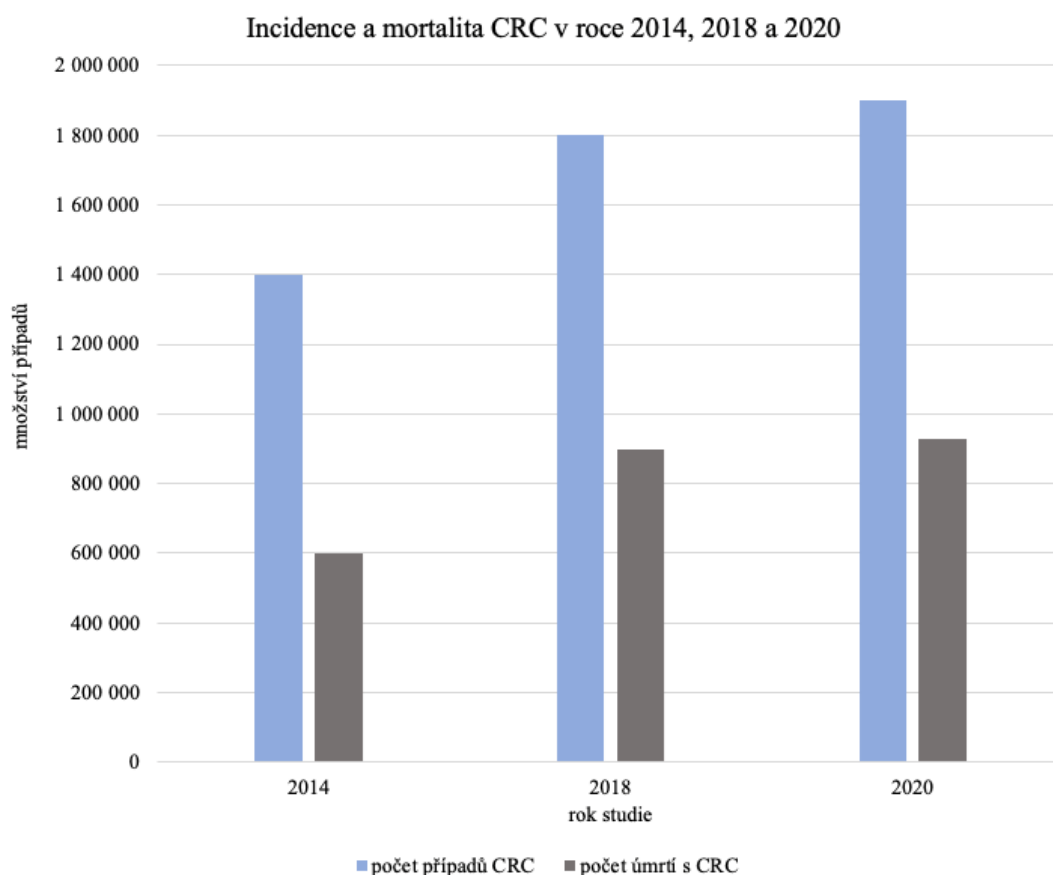
FdUTP	fluorodeoxyuridinetriphosphate	fluorodeoxyuridintrifosfát
FIT	fetal immunochemical test	fetální imunochemický test
FUDP	fluorouridinediphosphate	fluorouridindifosfát
FUMP	fluorouridinemonophosphate	fluorouridinmonofosfát
FUrd	fluorouridine	fluorouridin
FUTP	fluorouridinetriphosphate	fluorouridintrifosfát
LR	long read	long read (struktura transkriptů)
mCRC	metastatic colorectal cancer	metastatický kolorektální karcinom
MET	mesenchymal-epitel transition	mezenchymálně-epiteliálnítranzice
mRNA	messenger ribonucleic acid	mesengerová ribonukleová kyselina
miRNA	mikro ribonucleic acid	mikroRNA
MSI	microsatellite instability	mikrosatelitová nestabilita
MTHFR	methylenetetrahydrofolatereductase	methylenetetrahydrofolátreduktáza
NFW	nuclease free water	voda bez nukleáz
NGS	next generation sequencing	sekvenování nové generace
OPRT	orolate phosphoribosyltransferase	orolát fosforibosyltransferáza
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězcová reakce
PBS	phosphate buffered saline	fosfátový pufr
RIN	RNA integrity number	RNA integrity number
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomal ribonucleic acid	ribozomální ribonukleová kyselina
RT-qPCR	real-time polymerase chain reaction	polymerázová řetězcová reakce v reálném čase
SNP	single nucleotide polymorphism	jednonukleotidové polymorfismy
TE	Tris/EDTA buffer	Tris/EDTA pufr
TK	thymidinekinase	thymidinkináza
TP	thymidinephosphorylase	thymidinofosforyláza
UK	uridinekinase	uridinkináza
UP	uridinephosphatase	Uridinofosfatáza

1. Teoretický úvod

1.1 Kolorektální karcinom

1.1.1 Epidemiologie

Nádorová onemocnění stále představují velkou výzvu pro úspěšnost léčby, i pro současnou moderní medicínu. Velkým problémem je neustálý přírůstek nových případů a také nemalá úmrtnost. Dle statistické studie z roku 2014 (**Obrázek 1**) přibylo 1,4 milionů nových případů pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC), přičemž úmrtnost dosahovala 600 000 případů (Global Cancer Observatory 2022). V roce 2018 tomu bylo již o 400 000 nových případů více oproti roku 2014 s celosvětově druhou největší úmrtností, která činila téměř o 300 000 případů více než v roce 2014 (Bray *et al.* 2018). V roce 2020 dosáhlo množství nových případů o 100 000 více oproti roku 2018 s úmrtností téměř 930 000 případů (Global Cancer Observatory 2022). Jednalo se tak o jasnou vrůstající incidenci i úmrtnost.



Obrázek 1. Graf znázorňující zvyšující se trend množství nových případů CRC (Global Cancer Observatory 2022)

Zvyšující se trend poukazuje na potřebnost časné diagnostiky u konkrétních pacientů, personalizace léčby a tím dosažení lepších léčebných výsledků. Poměrně vysoký počet nových případů může také souviset s rozšířením a aplikací screeningových metod (Siegel *et al.* 2020).

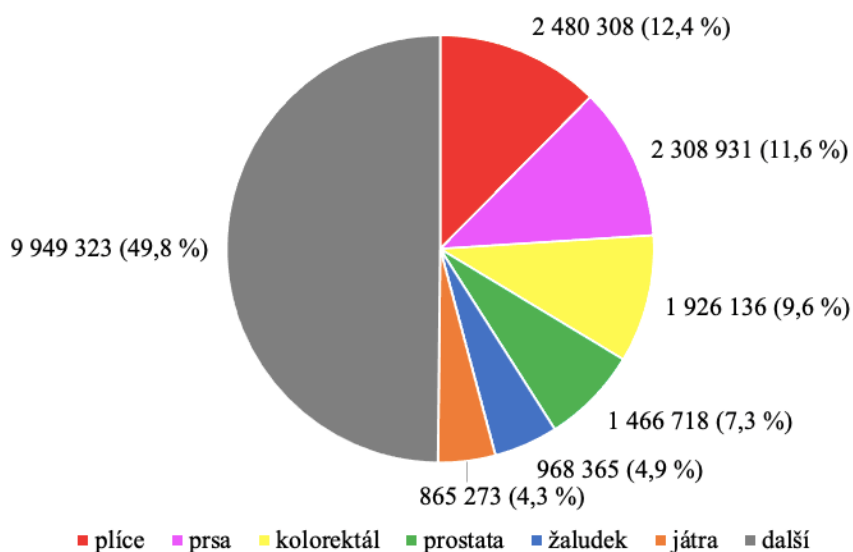
Tabulka 1. Deset států s nejvyšší četností případů CRC včetně znázornění počtu případů CRC na 100 000 obyvatel v roce 2020
(Global Cancer Observatory 2022)

pořadí	stát	počet případů v absolutních hodnotách	počet případů na 100 000 obyvatel
1.	Maďarsko	9 793	49,5
2.	Slovensko	4 821	43,9
3.	Norsko	4 976	41,9
4.	Nizozemí	17 015	41,0
5.	Dánsko	5 769	40,9
6.	Slovinsko	2 018	39,6
7.	Portugalsko	10 501	39,4
8.	Japonsko	148 505	38,5
9.	Lotyšsko	1 745	36,8
10.	Chorvatsko	3 706	36,3

Ačkoliv by se mohlo zdát, že CRC je problémem především v rozvojových zemích, opak je pravdou. Je známo, že četnost případů u mnoha nemocí prudce stoupá v rozvojových zemích, avšak vysoká incidence CRC je pozorována především ve vyspělých státech. Právě státy jako Slovensko s Maďarskem obsazují přední příčky v počtu případů pacientů s CRC (**Tabulka 1**). Důvodů může být více, ať už v genetické predispozici či nezdravým životním stylem v podobě kouření, alkoholu a stravy. Počet obyvatel ze Slovenska či Maďarska, kteří podstupují preventivní vyšetření je však velice podobný tomu jako v České republice. Právě Česká republika byla dle statistické analýzy z roku 2020 až na šestnáctém místě v počtu případů CRC v rámci celé Evropy, kdy incidence odpovídala 32,7 na 100 000 obyvatel (Kral *et al.* 2020). Před pár lety však Česká republika byla na předních příčkách v počtu zastoupení pacientů s CRC na 100 000 obyvatel.

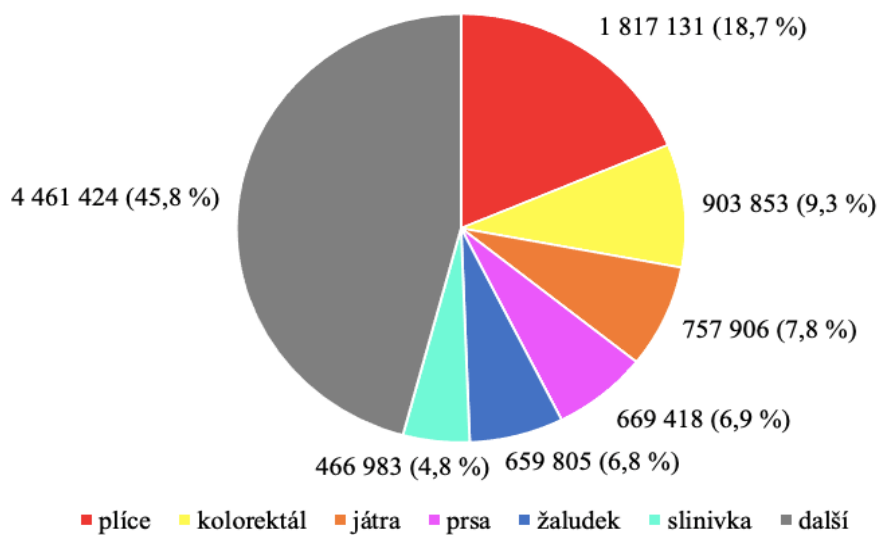
Z celosvětového hlediska je CRC třetí nejčastější nádorové onemocnění (**Obrázek 2**) s druhou největší úmrtností, která dosahuje téměř 50 % (**Obrázek 3**).

Absolutní hodnota, incidence, obě pohlaví, v roce 2022



Obrázek 2. Graf incidence nádorových onemocnění v roce 2022
(Global Cancer Observatory 2022)

Absolutní hodnota, úmrtnost, obě pohlaví, v roce 2022

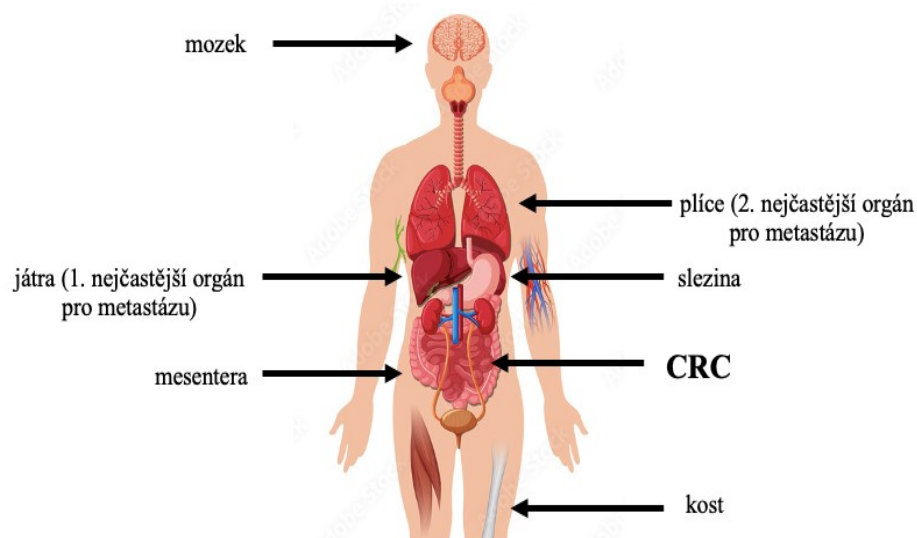


Obrázek 3. Graf úmrtnosti nádorových onemocnění v roce 2022
(Global Cancer Observatory 2022)

1.1.2 Vlastnosti nádorových CRC buněk

Nádorové buňky disponují celou řadou vlastností, které jim poskytují výhody oproti zdravým buňkám.

Metastazování, neboli proces šíření nádorových buněk z místa primárního nádoru přes krevní řečiště do vzdálenějších tkání a orgánů, představuje hlavní příčinu úmrtí pacientů s CRC. Z dosud provedených výzkumů bylo zjištěno, že až z 50 % veškerého metastatického šíření nádorových CRC buněk jsou postižená játra (Zarour *et al.* 2017). Tento fakt je zapříčiněn především díky propojení tlustého střeva s játry pomocí portálního žilního systému (Zarour *et al.* 2017). Dalším důkazem častého rozšíření jaterních metastáz dokládá studie z roku 2018 popisující výskyt nádorových buněk v játrech u 60 % veškerých pacientů s CRC (Oki *et al.* 2018). Druhým nejčastějším orgánem, do kterého metastázuji nádorové CRC buňky jsou plíce (Filip *et al.* 2020). Dalšími cíli pro metastatické nádorové buňky CRC mohou být kosti, mozek či slezina (**Obrázek 4**).



Obrázek 4. Schéma popisující nejčastější orgány, do kterých metastázuji nádorové buňky CRC (Seely *et al.* 2022) (vlastní úprava)

Existují také nádorové buňky, u nichž může být jejich proliferační aktivita potlačena na úplné minimum a lze je tak označit za spící tzv. senescentní (Chang 2011). U pacientů s CRC tak velmi často dochází k recidivě nádorového onemocnění, neboť jedna z hlavních hypotéz v rámci této problematiky pojednává o senescentních nádorových buňkách, jejichž senzitivita na působení léčiv je výrazně nižší oproti aktivně proliferujícím buňkám, čímž dochází k opětovnému metastázování

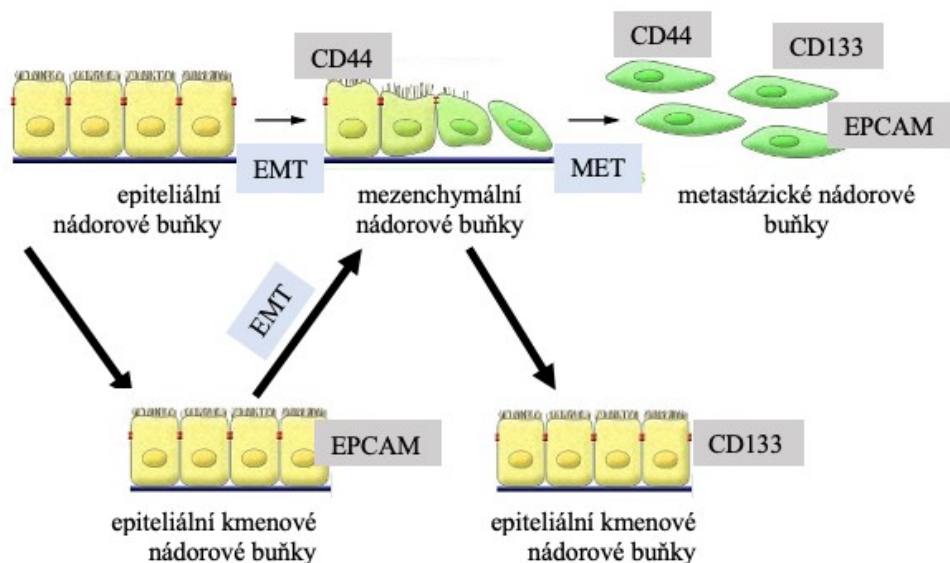
(Mansoori *et al.* 2017). Právě recidiva v důsledku sníženého účinku léčiv je výraznou překážkou pro snížení mortality CRC.

Proces, při kterém buňky ztrácí epitelový charakter a získávají znaky buněk mezenchymálního původu je označován jako epitel – mezenchymální tranzice (EMT). Díky tomuto komplexnímu mechanismu, zahrnující celou škálu změn v buněčné stavbě, získávají nádorové buňky schopnost efektivněji metastázovat do okolních orgánů. Jedná se o evolučně konzervovaný vývojový mechanismus, který se podílí na karcinogenezi a propůjčuje nádorovým buňkám metastatické vlastnosti zvýšením mobility, invaze a odolnosti vůči apoptickým stimulům.

V současné době definujeme tři základní typy EMT, přičemž rozdíl nastává v místě působení a odlišných fázích ontogenetického vývoje. První typ neboli EMT 1 nastává již během vývoje zárodku, kdy dochází k pohybu buněk při vývoji důležitých částí jako neurální lišta, nefronů či srdečních chlopní (Hay 2005). EMT 2 je charakteristický naopak při hojení ran a regeneraci orgánů (Matějka *et al.* 2017). Posledním typem je EMT 3, který je typický pro nádorová onemocnění, při nichž nastává zvýšená proliferace buněk (Hanahan 2022). Základním předpokladem pro vznik EMT 3 je schopnost buněk překonat bazální membránu a produkovat mezenchymální markery, jako jsou vimentin či desmin (Matějka *et al.* 2017).

Hlavními vlastnostmi, kterými disponují takové buňky jsou ztráta polarita, přeměna tvaru z kulatého na vřetenovitý, redukce mezibuněčných spojů, snížení závislosti na bazální membráně, zvýšená odolnost proti apoptóze a také aktivace metaloproteáz k degradaci extracelulárního matrixu, ztráta adheze a migrace (Matějka *et al.* 2017).

Mechanismus přechodu buněk z epiteliálního na mezenchymální fenotyp (**Obrázek 5**) je komplexní a reverzibilní proces. Specifitou takových buněk je přítomnost povrchových proteinů jako CD133, CD166 případně CD44 (Ricci-Vitiani *et al.* 2007). Díky této specifitě jsou povrchové proteiny jako například CD44 využívány jako biomarker pro přítomnost buněk iniciujících nádor neboli nádorových kmenových buněk.



Obrázek 5. Schéma znázorňující epitelu – mezenchymální tranzici a následné metastázování (Kalluri a Weinberg 2009) (Filip et al. 2020) (vlastní úprava)

Na **Obrázku 5** je možné vidět mechanismus EMT. Tumor iniciační buňky mají na svém povrchu markery CD44, CD133 a EPCAM.

Jak již bylo zmíněno, celý proces EMT je reverzibilní, kdy opačným procesem je takzvaná mezenchymálně–epiteliální transformace (MET), která je důležitým procesem pro přizpůsobení nádorových buněk v cílových orgánech při tvorbě sekundárních nádorů neboli metastázování.

U EMT existuje takzvaný „tumor budding“, neboli skutečnost, kdy buňky schopné tranzice jsou lokalizovány na okraji nádoru (Kalluri a Weinberg 2009). Jedná se o prognostický biomarker související právě s výskytem CRC (Lugli et al. 2021).

1.1.3 Klasifikace CRC

U CRC existují 2 základní druhy klasifikace. Prvním typem je TNM klasifikace, při níž dochází k určení závažnosti v místě primárního nádoru, označujeme jako T, dále v okolí mízních uzlin, označujeme jako N a v neposlední řadě v oblasti metastatického šíření, popisujeme pomocí M (Sobin L.H., Wittekind Ch. 2002). Druhým typem je klasifikace dle Dukese, která je již obsoletní (Zeman M. et al. 2006). V posledních letech je preferován především první typ, tedy TNM klasifikace, která označuje jednotlivá stádia od 0 do 4 oproti klasifikaci dle Dukese popisující fáze pomocí písmen A až D. U pacientů

v 1. stádiu je pětiletá doba přežití u 97 % pacientů, u 2. stádia je pětiletá doba přežití 87,5 % (Siegel *et al.* 2020).

V souvislosti s CRC bylo zaznamenáno, že až 60 % pacientů ve 3. stádiu dosáhli pětiletou dobu přežití (Siegel *et al.* 2020). Zásadní roli však představuje 4. stádium, které sčítá okolo 20 % veškerých evidovaných případů a pouze 13 % pacientů dosáhlo pětileté přežití (Siegel *et al.* 2020). Takto nízké procento přežití, resp. vysoká úmrtnost pacientů poukazuje na nutnost zlepšení dosud zavedených postupů v rámci diagnózy a léčby CRC.

1.2 Možnosti léčby

Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole 1.1, problematika CRC v souvislosti s nárůstem počtů případů v jednotlivých zemích je aktuální téma. Kromě diagnostiky a stanovení závažnosti nemoci je naprosto klíčová její léčba. U pacientů s CRC je tak jedním z nejčastějších řešení chirurgický zákrok, ať už v případě primárního nádoru, tak u vzdálených metastáz. Přibližně u 50 % pacientů po chirurgickém odstranění primárního nádoru dochází ke vzniku metastáz, přičemž úspěšnost následující léčby je u těchto pacientů poměrně nízká (Bray *et al.* 2018). I přes významný pokrok v léčbě tohoto onemocnění mnoho pacientů (60–70 %) nereaguje na konvenční chemoterapii. Mezi těmito pacienty může časem dojít k lokální nebo vzdálené recidivě. Jedním z důvodů špatné odpovědi na léčbu je rozvoj chemorezistence na podávání cytostatika (Filip *et al.* 2020).

Klíčové je tedy zefektivnění léčby u CRC, a především u metastatického kolorektálního karcinomu (mCRC), jelikož při vzniku jaterních metastáz je medián přežití v intervalu 5 až 20 měsíců (Nakayama *et al.* 2020).

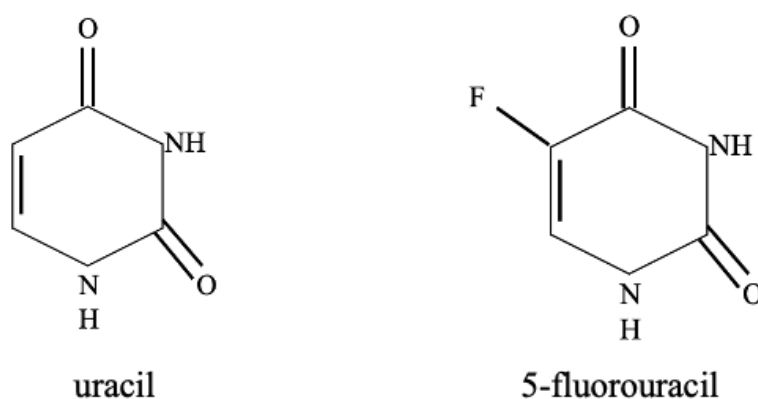
Při léčbě CRC rozlišujeme tři typy. První představuje léčba neoadjuvantní využívající se především u karcinomu rekta a kombinující radioterapii s chemoterapií. Hlavním významem této léčby je zmenšení konkrétního nádoru před samotným chirurgickým zákrokem. Nevýhodou této léčby je poměrně vysoká toxicita, a proto je tedy nutné zohlednit zdravotní stav pacienta. Druhým typem je adjuvantní léčba aplikovaná po operačním zákroku s cílem zamezit vzniku recidiv a případného rozvoje metastáz. Poslední typ léčby je označován jako paliativní a je využíván především u pacientů v posledním stádiu z důvodu snahy o zlepšení kvality života.

Z hlediska léčby dále rozlišujeme standartní chemoterapii, založenou na léčbě pomocí 5-fluorouracil (5-FU). V posledních letech se do popředí dostává cílená léčba, která využívá malé specifické molekuly a cíleně účinkuje inhibicí proliferace,

diferenciace a migrace nádorových buněk. V posledních letech se poukázalo na vliv inhibitorů checkpointů (inhibitory kontrolních bodů imunitní reakce), které zamezí rezistenci k imunitním reakcím (Filip *et al.* 2020).

Základní látkou, která je užívána během chemoterapie u CRC pacientů je 5-FU. Vznik rezistence nádorových buněk vůči 5-FU je jedním z hlavních problémů úspěšnosti léčby. Během posledních desítek let proto dochází k neustálému vývoji jak léčiva 5-FU, tak i jeho proléčiv.

5-FU (**Obrázek 6**) je charakterizován jako antimetabolit, ve kterém dochází k substituci fluoru za vodík na uhlíku v páté pozici u uracilu (Vértessy a Tóth 2009).



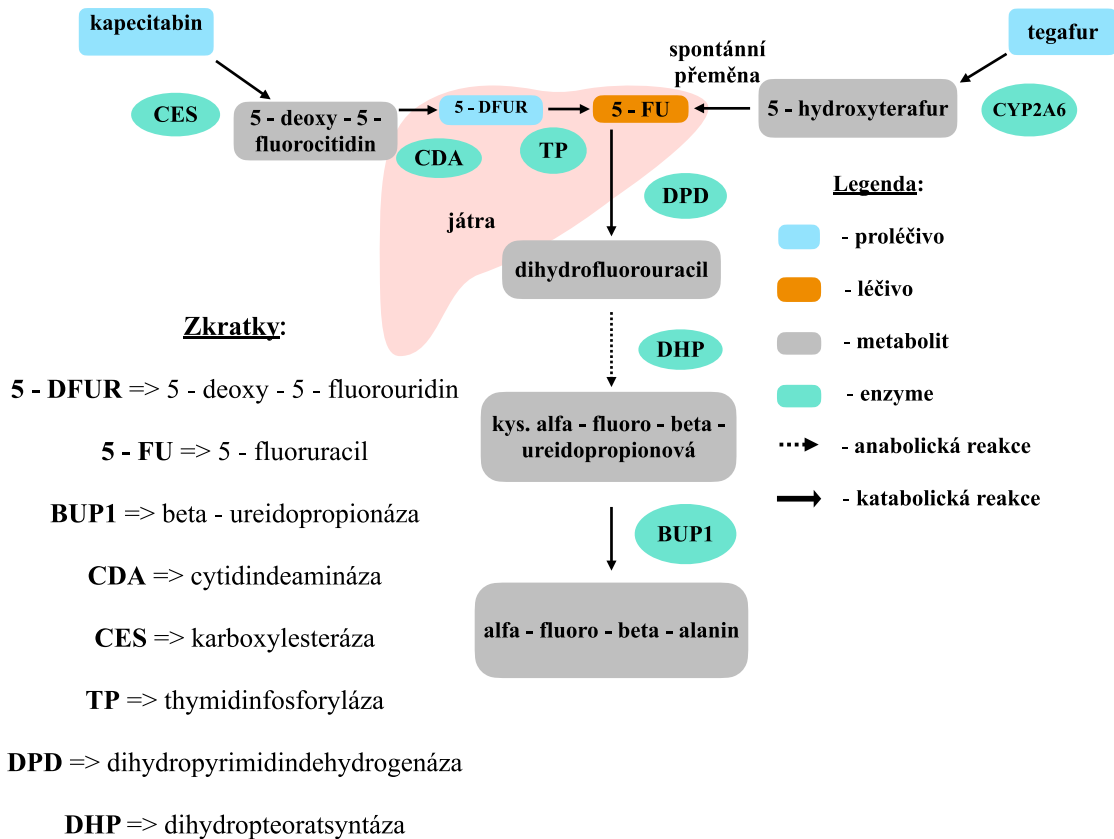
Obrázek 6. Porovnání uracilu a 5-fluorouracilu (vlastní zpracování)

Z historického hlediska je 5-FU jedním z prvních chemoterapeutických léčiv, jehož účinky měly prokazatelnou protinádorovou aktivitu. První, kdo dokázal syntetizovat 5-FU byl tým profesora Heidelbergera (Heidelberger *et al.* 1957). V roce 1954 bylo prokázáno navázání uracilu do jaterního nádoru potkanů, přičemž byla nemaligní tkáň nedotčena (Rutman *et al.* 1954). Výhodou 5-FU je podobná molekulární hmotnost fluoru i uhlíku, dále pak silná vazba mezi těmito prvky (Vodenkova *et al.* 2020). Nevýhodou od počátku představovala jeho vysoká toxicita, nízká terapeutická účinnost a v mnohých případech nepředvídatelná absorpce v gastrointestinálním traktu. Z hlediska zefektivnění účinků 5-FU začalo docházet ke kombinování 5-FU s oxaliplatinou, kdy ve finále došlo ke zvýšení léčebné odpovědi (Lamont a Schilsky 1999). Postupem času došlo ke zlepšení účinků a zmírnění toxicity 5-FU prostřednictvím jeho kombinace s jinými terapeutickými látkami, konkrétně v režimu FOLFOX, tedy kombinace 5-FU s oxaliplatinou a leucovorinem, případně režim FOLFIRI, neboli kombinace 5-FU

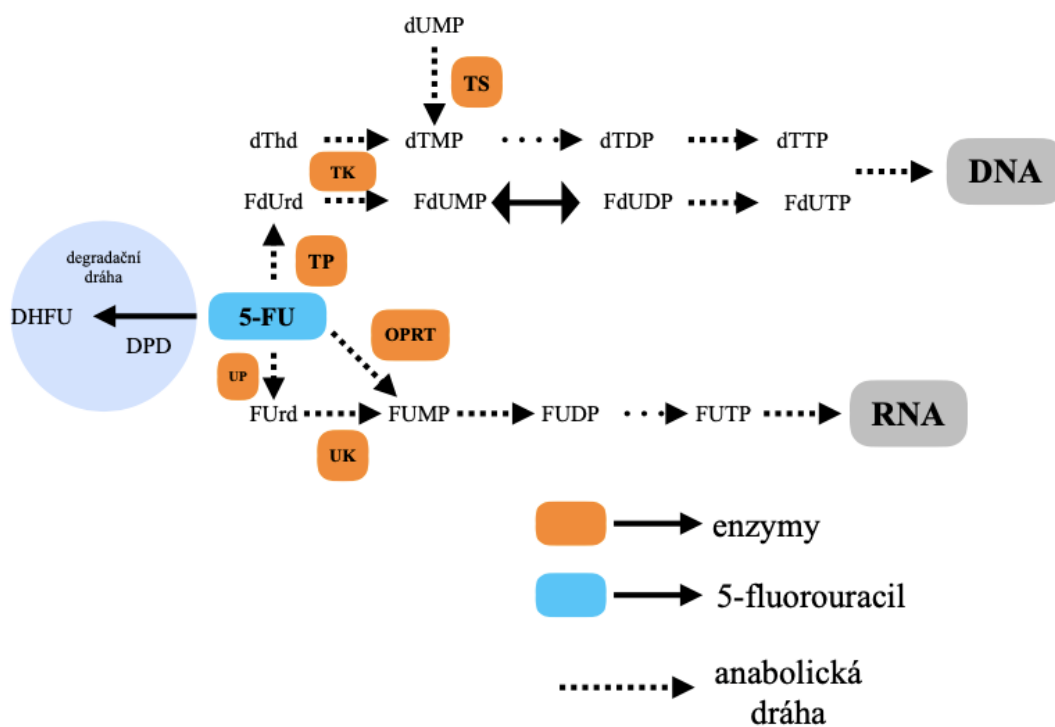
leucovorinem s irinotecanem (Tournigand *et al.* 2004). Další možností může být režim FOLFOXIRI, kdy dochází ke kombinaci leucovorinu, 5-FU, oxaliplatiny a irinotecanu.

1.2.1 Mechanismus účinku 5-FU

Metabolismus proléčiv a 5-FU je popsán v **Obrázku 7**. Důležitou funkci zde zastávají enzymy jako karboxylesteráza či thymidinofosforyláza.



Obrázek 7. Metabolismus proléčiv a 5-FU včetně následných metabolitů
 (Vodenkova *et al.* 2020) (vlastní úprava)



Obrázek 8. Metabolická aktivace 5–FU na DNA a ribonukleovou kyselinu (RNA) včetně degradační dráhy v nádorových buňkách (Svoboda a Slabý 2004) (vlastní úprava)

5–FU (5-fluorouracil)	DNA (kyselina deoxyribonukleová)
dThd (deoxythymidin)	dUMP (deoxyuridinmonofosfát)
dTMP (deoxythymidinmonofosfát)	dTDP (deoxythymidindifosfát)
dTTP (deoxythymidintrifosfát)	DHFU (dihydrofluorouracil)
DPD (dihydropyrimidindehydrogenáza)	FdUMP (fluorodeoxyuridinmonofosfát)
FdUDP (fluorodeoxyuridindifosfát)	FdUTP (fluorodeoxyuridintrifosfát)
FdUrd (fluorodeoxyuridin)	FUDP (fluorouridindifosfát)
FUMP (fluorouridinmonofosfát)	FUrd (fluorouridine)
FUTP (fluorouridintrifosfát)	TK (thymidinkináza)
TP (thymidinofosforyláza)	TS (thymidilázyntáza)
UK (uridinkináza)	UP (uridinofosforyláza)
OPRT (orolát fosforibozyltransferáza)	RNA (kyselina ribonukleová)

Na **Obrázku 8** lze vidět metabolickou aktivaci 5–FU pomocí anabolické dráhy, kdy dochází k přeměně produktů až na finální metabolity, které interagují s DNA, resp. s RNA v nádorových buňkách střeva a rekta (Svoboda a Slabý 2004).

Do metabolické dráhy pro místo účinku na RNA vstupuje 5–FU, který je pomocí enzymu uridinofosfatázy (UP) přeměněn na fluorouridin (FUrd). Následně dochází k přeměně FUrd pomocí uridinkinázy na fluorouridinmonofosfát (FUMP),

fluorouridindifosfát (FUDP) až na finální fluorouridintrifosfát (FUTP). Právě FUTP je následně začleněn do RNA čímž dochází k dysfunkci syntézy RNA. Další dráhou vznikají metabolity, které se následně začleňují do DNA. 5-FU je pomocí thymidinfosforylázy (TP) přeměněn na fluorodeoxyuridin (FdUrd), následně přes enzym thymidinkináza (TK) přeměněn na fluorodeoxyuridinmonofosfát (FdUMP), fluorodeoxyuridindifosfát (FdUDP) a finální fluorodeoxyuridintrifosfát (FdUTP).

Druhou alternativní metabolickou dráhu představuje deoxythymidin (dThd), který je přeměněn na deoxythymidinmonofosfát (dTMP). Tomuto kroku pomáhá deoxyuridinmonofosfát a enzym thymidylsyntáza (TS). V následujícím kroku je dTMP metabolizován na deoxythymidindifosfát (dTDP) a poté na deoxythymidintrifosfát (dTTP).

Právě produkty FdUTP a dTTP jsou schopny interagovat s DNA, kde přispívají ke vzniku DNA zlomů, díky nimž může být následně spuštěna apoptotická kaskáda. Součástí **Obrázku 8** je také degradační dráha 5-FU, kdy pomocí enzymu dihydropyrimidindehydrogenázy (DPD) je 5-FU metabolizován na inaktivní DHFU.

1.2.2 Proléčiva 5-FU

Využití 5-FU jakožto pooperačního chemoterapeutického léčiva je převážně u pacientů s CRC ve 3. a 4. stádiu. Vhodné je poznamenat, že pacienti v 1. a 2. stádiu chemoterapii nedostávají. Existuje však výjimka, kdy pacienti ve 2. stádiu podstupují chemoterapii na bázi 5-FU, konkrétně pokud nádor nevykazuje mikrosatelitovou nestabilitu (MSI).

Skutečnost, že většina dávky čisté formy 5-FU je po jeho užití metabolizována v játrech na neaktivní metabolity jako dihydrofluorouracil (DHFU) a α -fluoro- β -alanin (Miura *et al.* 2010), bylo nutné vytvořit efektivnější způsob využití 5-FU. Další problém představuje fakt, že až 20 % dávky 5-FU je rovnou vyloučeno prostřednictvím moči. Z tohoto důvodu postupně vznikaly různé typy proléčiv, jejichž hlavní funkcí bylo zefektivnění účinku samotného léčiva, tak že po jejich podání byly metabolizovány v játrech na farmakologicky aktivní léčiva. Jednalo se o perorální proléčiva. Hlavní výhodou takových látek je lepší absorpce v gastrointestinálním traktu s následnou přeměnou na 5-FU až v játrech, čímž dochází k delšímu působení samotného léčiva a dosažení efektivnější léčby.

Prvním proléčivem objeveným v 80. letech 20. století byl 5-deoxy-fluorouridin (5-DFUR), jehož aktivita byla zcela mimořádná oproti jiným

proléčivům z této doby (Vodenkova *et al.* 2020). Hlavní nevýhodou však byla rezistence leukemických buněk vůči 5–DFUR a také výrazná toxicita v gastrointestinálním traktu, při níž pravděpodobně docházelo díky vstřebávání 5–FU v tenkém střevě (Malet-Martino a Martino 2002).

Dalším významným proléčivem je kapecitabin, jehož farmaceutický název zní Xeloda. Jakmile je látka intravenózně podána, dochází k metabolické přeměně v nádorové tkáni na 5–DFUR prostřednictvím enzymů karboxylesterázy (CES) a cytidindeaminázy (CDA) (Johnston a Kaye 2001). V následujícím kroku je 5–DFUR přeměněn v nádorové tkáni na 5–FU pomocí enzymu thymidinofosforylázy (TP) (Cao a Rustum 2000). Předpokládalo se, že koncentrace TP se rapidně zvyšuje v tkáních postižených nádorem (Schüller *et al.* 2000). Díky této skutečnosti je zřejmé, že při působení kapecitabinu dojde k nárůstu koncentrace 5–FU v nádorové tkáni právě díky enzymu TP. Prostřednictvím klinických studií bylo zjištěno, že v primárních nádorech CRC byl kapecitabin přednostněji aktivován a docházelo tak ke zvýšení koncentrace 5–FU v nádorových tkáních, přesněji koncentrace 5–FU se oproti okolním tkáním zvýšila 3,2 krát (Vodenkova *et al.* 2020). Další jeho výhodou bylo pozorování nízké toxicity u pacientů ve 3. fázi klinické studii (Johnston a Kaye 2001).

Proléčivo disponující výbornou vstřebatelností v gastrointestinálním traktu a využívající se déle jak 30 let bylo pojmenováno jako tegafur. Přesněji lze toto proléčivo pojmenovat jako 1,2–tetrahydrofuryl–5–fluorouracil. Zemí vývoje byl Sovětský svaz v době studené války (Toide *et al.* 1977). Účinky tegafuru jsou aktivovány prostřednictvím izoenzymu CYP2A6 na cytochromu P450 a dále pak systémem rozpustných enzymů (Köhne a Peters 2000). Oproti proléčivům zmíněných v předchozí části, tegafur disponuje mnoha nežádoucími účinky, jako je nevolnost, průjem, neurologická toxicita, zvracení či v extrémních případech i kóma. To má za následek omezené využívání a striktnější pravidla při jeho podávání pacientům. Kvůli zmíněným nežádoucím účinkům byla vytvořena náhrada označována jako tegafur – uracil, kdy poměr složek tegafuru a uracilu činí 1:4 (Diasio 1998). Podstatou této látky je zlepšení terapeutických účinků a zmírnění toxicity samotného tegafuru. Právě uracil přispívá k prodloužení poločasu rozpadu 5–FU. Po mnoha výzkumech byl tegafur–uracil schválen ke klinickému využití na pacientech v 50 státech na celém světě (Wang *et al.* 2011).

Nedílnou součástí skupiny proléčiv 5–FU je také eniluracil, jehož hlavní funkcí je zvýšení biologické dostupnosti 5–FU a tím i dosažení pravidelné absorpce, čímž lze lépe předpovědět potenciální toxicitu (Schilsky a Kindler 2000). Výhodou tohoto

proléčiva je, že eniluracil není toxický, ovšem jeho účinkem dochází ke zvýšení toxicity 5-FU. V důsledku této toxicity a nepříznivých výsledků z klinických studií byl výzkum eniluracilu zastaven v roce 2000 (Lamont a Schilsky 1999).

Existuje celá řada dalších proléčiv, jejichž výzkum nadále pokračuje a jejichž účinky se testují v klinických studiích. Jako další proléčiva 5-FU lze uvést emitefur či S-1 jakožto derivát tegafuru s enzymovými inhibitory 5-chlor-2,4-dihydroxypyridinu a oxonátu draselného. Výhodou S-1 může být umožnění vyšší koncentrace 5-FU a nižší toxicita (Miyamoto *et al.* 2014).

Jako poslední možné proléčivo lze uvést trifluridin-tipiracil, jehož hlavní účinek je inhibice buněčné proliferace a omezení růstu nádoru (Peeters *et al.* 2018).

1.3 Rezistence buněk

Jednou z mnoha vlastností nádorových buněk je schopnost rychlé reakce na vnější prostředí a následné přizpůsobení se na účinky určitého stresového faktoru.

Ačkoliv jsou nádorové buňky během léčby vystaveny vnějšímu stresu, evoluční mechanismy poskytují včasnou adaptaci na měnící se podmínky prostředí, čímž dochází ke zvýhodnění proliferace nádorových buněk. Hlavní schopností těchto buněk je vznik chemorezistence vůči lékům, čímž dochází k selhání léčby nádorů u pacientů (Wang *et al.* 2017). Příkladem mechanismů jakožto odpověď na chemoterapii u nádorových buněk může být snížený příjem léčiva, zvýšený výdej léčiva, změna cílové molekuly, změna metabolismu léčiva, potlačení apoptózy, posílení DNA opravných systémů, zastavení buněčného cyklu, aktivace alternativních drah.

Rezistence může být vrozená nebo získaná. V případě vrozené rezistence jsou nádorové buňky schopny přirozeně odolávat vůči cytotoxickým látkám. Oproti tomu získaná rezistence nastává až během působení chemoterapeutik.

U chemorezistentních nádorových buněk může existovat koncept multilékové rezistence (Gottesman *et al.* 2002), při níž dochází ke vzniku rezistence vůči skupině léčiv se stejným, resp. podobným účinkem mechanismu (Chang 2011), ačkoliv byly léčeny pouze jedním léčivem. Tato schopnost nádorových buněk je jednou z hlavních příčin selhávání léčby. Odhaduje se, že u více než 90 % pacientů s metastázami dochází k selhání léčby především díky zisku chemorezistence, přesněji multilékové rezistence (Chang 2011).

1.4 Biomarkery

Významným problémem při léčbě pacientů s CRC je jeho rozsáhlá heterogenita. Hlavním předpokladem pro zlepšení celkové léčby je vytvoření efektivnější terapie, která by byla přesně přizpůsobena konkrétním pacientům. Taková terapie musí zohledňovat genomické, proteomické i epigenomické charakteristiky jednotlivých nádorových buněk. Právě neadekvátní vyhodnocení nastavení léčby CRC je jednou z příčin selhávání léčby a krátké doby přežití (Niederst *et al.* 2015).

K rozpoznání takových charakteristik nám pomáhají biomarkery. Ty tedy lze charakterizovat jako znak, případně vlastnost, kterou lze změřit a následně využít jako indikátor fyziologických a patologických procesů (Svoboda 2013).

Biomarkery lze rozdělit do 5 základních skupin, a to biomarkery rizika, diagnostické biomarkery, prognostické biomarkery, biomarkery predikující účinnost léčby a prediktivní biomarkery. Jednotlivé vztahy mezi různými skupinami biomarkerů popisuje **Obrázek 9**. Biomarkery rizika, diagnostické a prognostické biomarkery korelují s biologickou individualitou pacienta či choroby a také vlivem prostředí.

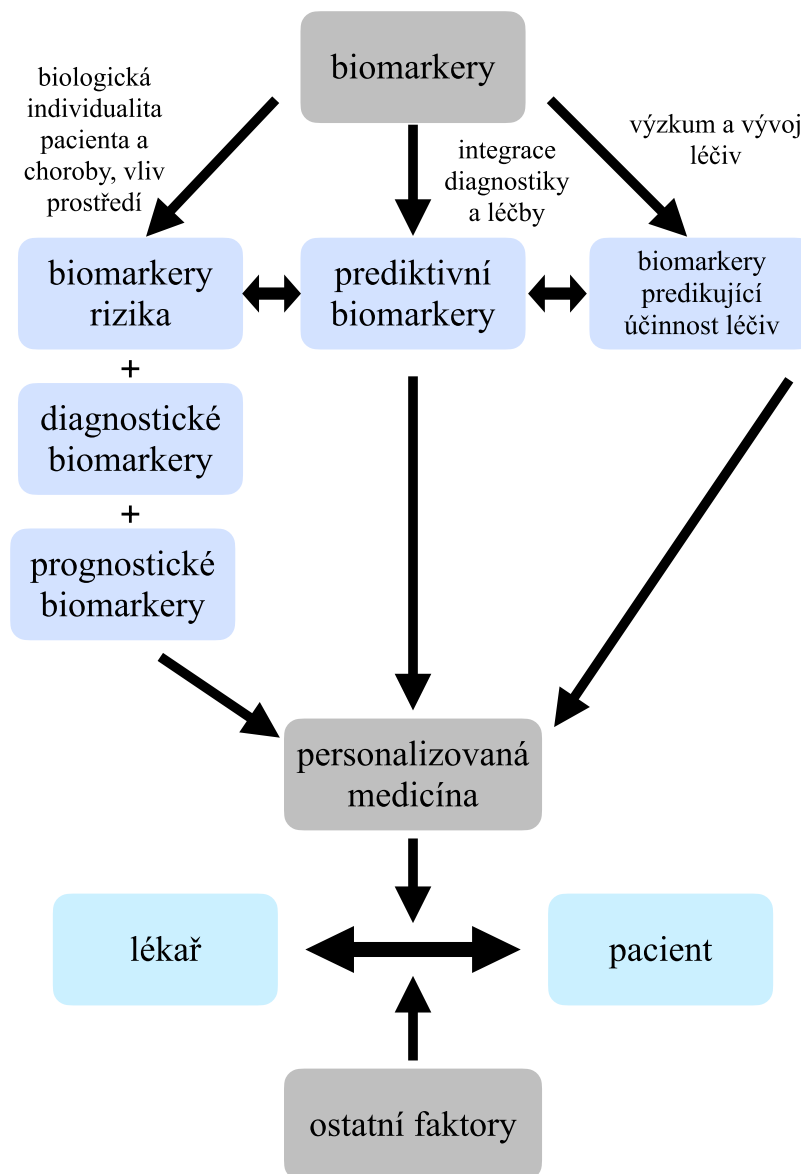
První skupinou biomarkerů jsou takzvané biomarkery rizika, jejichž hlavní charakteristikou je predikce vzniku onemocnění u zdravého jedince. Tento typ slouží především k identifikaci osob či populací s genetickou predispozicí ke vzniku nádorových onemocnění (Svoboda 2013). Mezi biomarkery zvýšeného rizika vzniku hereditárních forem CRC lze zařadit přítomnost mutace v genech jako *BRCA1*, *BRCA2*, *APC*, *TP53* a *APC* (Imperiale *et al.* 2014). S dědičnou formou CRC souvisí i Lynchův syndrom, který je zapříčiněn mutací genů skupiny tzv. „mismatch repair“ (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* a *PMS2*) (Venderbosch *et al.* 2014).

Diagnostické biomarkery lze popsat jako ukazatele asociované s nemocí, ať už s výskytem, tak s rozsahem. Funkcí těchto biomarkerů je schopnost diagnostiky konkrétního onemocnění. Mezi diagnostické biomarkery související s CRC patří methylovaný gen *Septin 9* ve volné cirkulující DNA, případně fekální imunochemický test (FIT), díky kterému lze stanovit koncentraci hemoglobinu ve stolici (Song a Li 2015).

Prognostické biomarkery souvisejí s faktorem přežití a lze tak stanovit celkovou prognózu pacienta s nádorovým onemocněním, konkrétně vztah pacienta k nádorovému onemocnění či možným komplikacím léčby. Mezi takové biomarkery související s CRC lze uvést hladiny onkomarkerů sacharidového antigenu (CA19-9) a karcinoembryonálního antigenu (CEA) v krvi (Gonzalez de Castro *et al.* 2013).

Prediktivní biomarkery jsou ovlivněny integrací diagnostiky, léčbou a jejich stanovení probíhá za účelem predikce určitých molekulárních vlastností, jako je například přítomnost mutace v genu *KRAS*. Prediktivní biomarkery slouží k predikci odpovědi nádorového onemocnění na léčbu, případně na možnou toxicitu léčiv. Na základě těchto informací lze predikovat účinnost léčiva či toxicitu (Svoboda 2013).

Veškeré tyto skupiny a podskupiny biomarkerů mají vliv na personalizovanou medicínu, která společně s ostatními faktory, jako jsou osobní anamnéza pacienta nebo socioenvironmentální faktory. Veškeré tyto vztahy ukazují jak vysoce komplexní a diferenciovanou skupinou jsou biomarkery.



Obrázek 9. Schéma popisující vztahy mezi jednotlivými skupinami biomarkerů a také vztah k personalizované medicíně (Svoboda a Slabý 2004) (vlastní úprava)

Co se týče řazení biomarkerů dle původu, markery jsou rozlišovány na úrovni genomu (kódující, nekódující, jaderná a mimojaderná DNA), transkriptomu (kódující a nekódující RNA), proteomu (proteinové varianty a komplexy), metabolomu (primární a sekundární metabolity, hormony či signální molekuly) a fenomu (soubor fenotypů na buněčné, orgánové či organismové úrovni) (Chiang *et al.* 2023).

2. Cíle a hypotéza práce

Cílem této diplomové práce byla identifikace biomarkerů související s chemorezistencí CRC nádorových buněk na 5-FU při léčbě CRC. Hypotézou této práce bylo ověření, zda námi identifikované biomarkery na *in vitro* úrovni by mohly predikovat odpověď na léčbu 5-FU u CRC pacienta, čímž by napomohly personalizované medicíně.

Práce byla rozdělena do tří částí, ve kterých byly stanoveny tyto jednotlivé cíle:

- Příprava knihoven pro sekvenování celého transkriptomu DLD-1 buněčných linií pomocí metody sekvenování nové generace (NGS).
- Bioinformatická analýza a následný výběr kandidátních genů.
- Validace vybraných kandidátních genů u pacientů s CRC léčených 5-FU.

3. Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

Tabulka 2. Seznam použitých chemikálií

látka	výrobce
70 % ethanol	Capp (Německo)
EDTA	Capp (Německo)
fetální bovinní sérum	Capp (Německo)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	ThermoFisher scientific (USA)
HS RNA Kit (15 NT), 500 pro Fragment Analyzer System	Agilent (USA)
Multiplex Oligos pro kit	New England Biolabs (USA)
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	ThermoFisher scientific (USA)
neesenciální aminokyseliny	Capp (Německo)
PBS	Capp (Německo)
Qiazol	Qiagen (Německo)
Qubit dsDNA HS Assay kit	ThermoFisher scientific (USA)
Qubit RNA HS Assay kit	ThermoFisher scientific (USA)
Agilent DNA 6 000 Nano kit	Agilent (USA)
Agilent RNA 6 000 Nano kit	Agilent (USA)
RNase mini kit	Qiagen (Německo)
RNase ZAP (250 ml)	ThermoFisher scientific (USA)
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen (USA)
NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (96 Unique Dual Index Primer Pairs) (NEB#E6440S)	New England Biolabs (USA)
NEBNext® rRNA Denletion Kit v2 (Human/Mouse/Rat) (NEB#E6310L)	New England Biolabs (USA)
NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB#E7760S)	New England Biolabs (USA)
streptomycin	Capp (Německo)
TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG	ThermoFisher scientific (USA)
tekuté médium DMEM	Capp (Německo)
trypsin	Capp (Německo)
voda bez nukleáz	ThermoFisher scientific (USA)

3.2 Použité vybavení

Tabulka 3. Seznam použitého vybavení

vybavení	výrobce
automatická pipeta 10 ul	Capp (Německo)
automatická pipeta 200 ul	Capp (Německo)
automatická pipeta 1000 ul	Capp (Německo)
box na led	P-Lab (Česká republika)
časovač	P-Lab (Česká republika)
DNA 6 000 Nano Chips	Agilent (USA)
chladicí kuličky	P-Lab (Česká republika)
jednorázová pipeta 5 ml	Capp (Německo)
jednorázová pipeta 10 ml	Capp (Německo)
jednorázové špičky na pipety	Capp (Německo)
jednorázové rukavice	Capp (Německo)
zkumavky QLAshredder	Eppendorf SE (Německo)
zkumavky RNázy	Eppendorf SE (Německo)
krabička na vzorky	P-Lab (Česká republika)
kuličky na pročištění	Capp (Německo)
MagNa Lyzér Green Beads	Roche (Německo)
magnetická deska	Promega (USA)
Petriho miska	Inset (Česká republika)
RNA 6 000 Nano Chips	Agilent (USA)
stojan na zkumavky	Inset (Česká republika)
stripy	Applied Biosystems (USA)
stříčka na 70 % ethanol	Inset (Česká republika)
vícehlavňová pipeta - 8 hlavic (0,5 – 10 ul)	Capp (Německo)
vícehlavňová pipeta - 8 hlavic (20 – 300 ul)	Capp (Německo)
zamrazovací stojan	HPST (Česká republika)

3.3 Použité přístroje

Tabulka 4. Seznam použitých přístrojů

přístroj	výrobce
bioanalyzer	Agilent (USA)
centrifuga	Hermle (Německo)
cycler	ThermoFisher scientific (USA)
fragment analyzer	ThermoFisher scientific (USA)
hluboko mrazící box -80 °C	Trigon plus (Česká republika)
homogenizátor	ThermoFisher scientific (USA)
inkubátor	ThermoFisher scientific (USA)
laminární box	TUV (Německo)
luminometr	ThermoFisher scientific (USA)
MagNa Lyzer homogenizátor	Roche (Německo)
mikrocentrifuga	Capp (Německo)
mikroskop	Capp (Německo)
MiniAmp Thermal cycler	ThermoFisher scientific (USA)
Nanodrop 2 000	ThermoFisher scientific (USA)
NovaSeq 6 000 (S1 flowcell)	New England Biolabs (USA)
pipetor	Capp (Německo)
primovací stanice	Agilent (USA)
QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR	ThermoFisher scientific (USA)
Qubit 3	ThermoFisher scientific (USA)
vortex	BioTech (Česká republika)

3.4 Použité softwary

Tabulka 5. Seznam použitých softwarů

software	výrobce
BASH	Brian Fox, USA
Excel	Microsoft, USA
FASTQC	Simon Andrews, UK
GraphPadprism	Dotmatics, USA
RSEM	Bo Li a Colin Dewey, USA
RStudio	Inc, USA
STAR	Alexander Dobin, USA
Trimmomatic	Tony Bolger, USA

3.5 Práce s DLD–1 buněčnými liniemi

3.5.1 Rozmražení buněk

Veškeré buněčné linie využívané v tomto diplomovém projektu byly převzaty z Oddělení molekulární biologie nádorů Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR. DLD–1 buněčné linie včetně rezistentů na 5–FU o koncentracích 40 μ M a 160 μ M připravil MUDr. Josef Horák, Ph.D. Vytváření rezistentů na 5–FU probíhalo prostřednictvím kultivace DLD–1 buněčné linie, ke které bylo postupně přidáváno adekvátní množství 5–FU. Po působení selekčního tlaku a následném ošetření na Mycoplazmu došlo k získání rezistentů na 5–FU o již zmíněných koncentracích.

Tři zamrazené alikvótované buněčné linie byly vyndány z tekutého dusíku a vloženy do vodní lázně na teplotu 37 °C po dobu 3 minut. Buňky byly naneseny do nové zkumavky k 5 ml kultivačního média (**Tabulka 6**). Celkový počet buněk činil 7 milionů. Následovala centrifugace vzorku po dobu 10 minut při zrychlení 1 000 g. Po vzniku buněčného peletu bylo odsáto původní médium a přidáno 5 ml nového média. Pomocí pipety o objemu 1 ml došlo k resuspendaci vzorku a následnému přenesení na Petriho misku o velikosti 5 cm nebo 10 cm dle velikosti pelety buněk a přidáno dostatečné množství kultivačního média. Nakonec byly rozmrazené buňky přendány do inkubátoru Thermo scientific při teplotě 37 °C a koncentraci CO₂ 51 %.

Veškerá práce s buňkami probíhala v laminárním boxu Euroclone stupně čistoty 1.

Tabulka 6. Seznam látek včetně objemů tvořící kultivační médium

složení kultivačního média	objem
tekuté médium DMEM	448 ml
FBS (fetální bovinní sérum)	50 ml
Penicilin a Streptomycin	1 ml
neesenciální aminokyseliny	1 ml
celkový objem	500 ml

3.5.2 Kultivace buněk

K experimentům byla použita buněčná linie DLD–1 wild type (WT) a buněčné linie rezistentní na 5–FU o koncentraci 40 μ M (DLD–1 R40) a rezistentní na 5–FU o koncentraci 160 μ M (DLD–1 R160). Mechanismus přípravy rezistentů na 5–FU byl popsán v kapitole 3.5.1. Veškeré buněčné linie byly kultivovány v médiu, jehož složení popisuje **Tabulka 6**.

Každá buněčná linie byla pěstována v biologickém triplikátu, aby bylo dosaženo co nejpřesnějších výsledků.

3.5.3 Pasážování buněk

Buňky byly pasážovány, jakmile svou proliferací zaplnily zhruba 70 % povrchu Petriho misky. Nejprve bylo odstraněno původní médium a buňky byly dvakrát omyty roztokem fosfátového pufru (PBS). Následně byl do Petriho misky na celý povrch přidán 1 ml trypsinu s EDTA a ponechán inkubací po dobu 5 minut při 37 °C. Jakmile trypsin společně s EDTA oddělil buňky z povrchu misky, došlo k přidání média, které neutralizovalo účinek trypsinu s EDTA. Opakovaným nasáváním a vysáváním objemu v pipetě došlo k oddělení buněk. Následně byly buňky rozděleny do nových misek a došlo k přidání adekvátního množství média pro jejich naředění. Na závěr byly Petriho misky s buňkami uloženy do kultivátoru. Počet buněk v jedné Petriho misce činil 10 milionů.

3.5.4 Zmrazení buněk

Pro budoucí práci s buňkami byly připraveny alikvóty k dlouhodobému uložení do tekutého dusíku. Během zmrazování bylo nejprve potřeba buňky převést do suspenze. Alikvóty se suspenzí buněk byly vloženy do centrifugy po dobu 10 minut při zrychlení 1000 g. Následně došlo k oddělení média od buněčné pelety. Poté bylo přidáno zmrazovací médium (**Tabulka 7**). Buněčný pelet byl resuspendován a následně

aliquótován do zmrazovacích zkumavek o velikosti 2 ml. Celkový objem buněčné suspenze činil 1 ml. Množství buněk činilo 10 milionů.

Na závěr byly zkumavky umístěny nejprve do zmrazovacího stojanu s chladicí kapalinou isopropanolem pro pomalejšího zmrazování a uloženy do mrazícího boxu při teplotě -80 °C po dobu 24 hodin a poté vloženy do tekutého dusíku ke dlouhodobému skladování.

Tabulka 7. Seznam látek včetně objemů tvořící zmrazovací médium

složení zmrazovacího média	objem
kultivační médium	4,5 ml
FBS	4,5 ml
DMSO (dimethylsulfoxid)	1 ml
celkový objem	10 ml

3.5.5 Testování na mycoplazmu

Jedním z nejčastějších problémů během kultivace buněk je kontaminace buněčných linií organismy rodu mycoplazma. Před sekvenační analýzou bylo nutné otestovat buněčné linie na přítomnost mycoplazmy.

K otestování buněčných linií byla použita sada MycoAlert Mycoplasma Detection Kit. Nejprve byly veškeré reagenty vystaveny pokojové teplotě. Zkumavky s 2 ml buněčného vzorku byly centrifugovány po dobu 5 minut při zrychlení 200 g. Následně došlo k odebrání 100 µl vyčištěného supernatantu, který byl přidán do kyvety v luminometru. K vzorku bylo přidáno 100 µl Mycoalert reagentu a po pěti minutách byla změřena luminiscence. Výsledné číslo bylo evidováno jako A–hodnota. Nastavení luminometru odpovídalo 1 sekundě integrovaného čtení.

Po prvním měření došlo k přidání 100 µl Mycoalert substrátu k měřenému vzorku. Po deseti minutách byla opět změřena luminiscence a výsledné číslo bylo zaevidováno jako B–hodnota.

Podstatou MycoAlert testu je využívání aktivity mycoplazmatických enzymů. V případě, že jsou ve vzorku zástupci rodu Mycoplasma, dochází během testu k jejich lýze a mycoplazmatické enzymy reagují s MycoAlert substrátem. Následně dochází k přeměně adenosindifosfátu (ADP) na adenosintrifosfát (ATP). Po změření hladiny ATP před i po přidání MycoAlert substrátu lze získat poměr, který charakterizuje přítomnost či nepřítomnost mycoplazmatických zástupců. Výsledný poměr lze spočítat jako B hodnota/A hodnota. Pokud je výsledek pod 0,9, měřený vzorek je bez zástupců rodu

Mycoplasma. Pokud poměr přesáhne hodnotu 1,2, vzorek je kontaminovaný mycoplazmatickými organismy. V případě naměření hodnoty mezi 0,9 až 1,2 je potřeba celý test provést znovu.

V **Tabulce 8** lze vidět hodnoty A i B včetně výsledného poměru vypočítaného jako B-hodnota/A-hodnota. Výsledné poměry u všech devíti buněčných linií byly pod hodnotou 0,9, a tudíž byla vyhodnocena nepřítomnost mycoplazmy u každého vzorku.

Tabulka 8. Výsledné hodnoty jednotlivých buněčných linií při testování na mycoplazmu

buněčná linie	A-hodnota	B-hodnota	výsledný poměr:	vyhodnocení
DLD-1 WT 1	219	183	0,8356	bez mycoplazmy
DLD-1 WT 2	217	178	0,8203	bez mycoplazmy
DLD-1 WT 3	213	176	0,8263	bez mycoplazmy
DLD-1 R40 1	275	199	0,7236	bez mycoplazmy
DLD-1 R40 2	265	193	0,7283	bez mycoplazmy
DLD-1 R40 3	260	191	0,7346	bez mycoplazmy
DLD-1 R160 1	354	304	0,8588	bez mycoplazmy
DLD-1 R160 2	350	302	0,8629	bez mycoplazmy
DLD-1 R160 3	361	307	0,8504	bez mycoplazmy

3.5.6 Izolace RNA

K izolaci RNA z buněk DLD-1 (přibližně 10 milionů buněk) byla využita sada RNeasy Mini Kit. Postup izolace RNA je naprosto totožný u všech buněčných linií. Petriho misky byly uloženy do boxu s ledem, aby nedošlo k degradaci RNA. Následně bylo odsáto kultivační médium a buňky byly promyty PBS. Poté bylo přidáno 700 μ l lyzačního pufru (QIAzol). Pomocí stěrky byly buňky setřeny z Petriho misky, odebrány do zkumavky o objemu 1 ml a ponechány 5 minut při teplotě 25 °C. Nově vzniklý lyzát byl homogenizován za použití chemikálie QIAshredder. Lyzát byl nanesen do zkumavky společně se 140 μ l chloroformu a po 3 minutách centrifugován 15 minut při zrychlení 12 000 g. Z homogenizovaného lyzátu byla odstraněna kapalná fáze a poté přidáno 600 μ l 70 % ethanolu.

Do kolonky RNeasy umístěné ve sběrné zkumavce bylo nanesen 700 μ l vzorku. Dále byl lyzát centrifugován po dobu 15 vteřin při zrychlení 8 000 g. Průtok ve sběrné zkumavce byl odstraněn.

Dalším krokem byla DNase treatment, kdy bylo nejdříve přidáno 350 μ l pufru RW 1 do kolonky RNeasy, následovala centrifugace po dobu 15 vteřin při zrychlení 8 000 g. Poté bylo přidáno přímo na filtr 80 μ l objemu roztoku s enzymem pro štěpení

DNA (10 μ l DNase I a 70 μ l pufru RDD), který byl ponechán 15 minut na pokojové teplotě, poté bylo přidáno dalších 350 μ l RW 1. Průtok byl opět odstraněn.

Do kolonky RNeasy byl následně napipetován objem 500 μ l pufru RPE a vzorek centrifugován po dobu 15 vteřin při zrychlení 8 000 g. Průtok byl odstraněn a opět došlo k přidání 500 μ l pufru RPE do kolonky RNeasy 2 minuty při 8 000 g. Poté 1 minuta při 8 000 g v nové sběrné zkumavce. Tento krok byl důležitý pro zajištění nulového přenosu ethanolu během eluce RNA.

Na závěr byla kolonka RNeasy umístěna do nové sběrné zkumavky o objemu 1,5 ml a přidáno 40 μ l čisté vody bez nukleázy (NFW). Vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při zrychlení 8 000 g, aby došlo k eluci RNA.

Po získání finálního objemu byla změřena čistota a koncentrace RNA (v ng/ μ l) u jednotlivých vzorků, jak na Nanodrop ONE (pro ověření čistoty OD260/280 a 260/230), tak na Qubitu pro přesnou koncentraci RNA. Master mix pro měření koncentrace RNA na Qubitu byl připraven dle doporučení výrobce, přičemž se finální objem spočítal jako počet vzorků + 2 standardy + 1 zásobní. Výsledná hodnota se vynásobila 199 μ l pufru a k finální hodnotě bylo přičten adekvátní objem barvy (v μ l) podle množství vzorků. Dále byl připraven objem standardu 1 a 2 jako 190 μ l master mixu + 10 μ l standardu 1 resp. 190 μ l master mixu + 10 μ l standardu 2. Objem měřených vzorků byl připraven jako 199 μ l master mixu + 1 μ l vzorku. Následně byly do Qubitu postupně vloženy standart 1, standart 2 a poté i jednotlivé vzorky a odečteny jejich hodnoty v ng/ μ l.

3.5.7 Kontrola kvality RNA

Před vytvářením NGS knihoven bylo zapotřebí zkontrolovat kvalitu, v tomto případě RNA integrity number (RIN), izolované RNA na bioanalyzeru pomocí kitu Agilent RNA 6 000 Nano Kit. U tvorby knihoven pro následnou sekvenaci celého transkriptomu bylo důležité vycházet z kvalitní RNA (optimálně RIN 7–10). Výsledné hodnoty kvality RNA jsou zapsány v **Tabulce 9**.

Tabulka 9. Výsledky kontroly kvality RNA u jednotlivých buněčných linií přes Bioanalyzor

buněčná linie	RIN
DLD-1 WT 1	10
DLD-1 WT 2	10
DLD-1 WT 3	10
DLD-1 R40 1	10
DLD-1 R40 2	10
DLD-1 R40 3	10
DLD-1 R160 1	9,9
DLD-1 R160 2	10
DLD-1 R160 3	10

Následně došlo ke zředění vzorků, konkrétně desetkrát. Příprava gelu a RNA referenčního žebříku probíhala dle instrukcí výrobce.

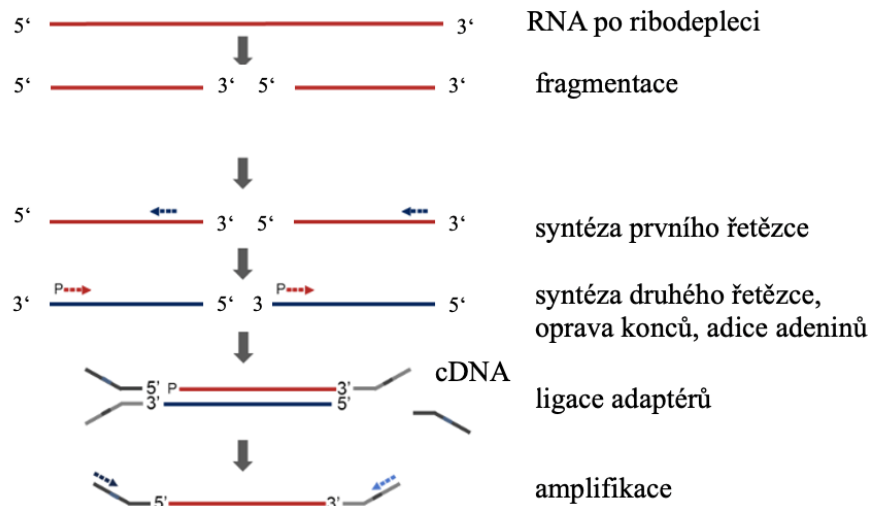
Čip (**Obrázek 10**) byl umístěn do primovací stanice. Po nanesení 9 μ l Gel–Dye mixu do tří předem označených pozic na čipu, 5 μ l loadovacího markeru do pozic pro vzorky a žebřík a 1 μ l RNA žebříku do pozice označené žebříkem byl přidán 1 μ l vzorku do pozic určených pro vzorky (1–12). Na závěr byl čip vortexován (Vortex Genie 2) po dobu 1 minuty a poté umístěn do bioanalyzeru.



Obrázek 10. Čip na kontrolu kvality RNA (Vlastní tvorba)

3.6 Příprava knihoven na sekvenování celého transkriptomu

Celý protokol se skládal ze dvou částí. Nejprve bylo zapotřebí odstranit ribozomální RNA (rRNA) prostřednictvím procesu ribo-deplece kitem NEBNext rRNA Depletion Kit v2 (Human/Mouse/Rat) (NEB #E6310L) a poté proběhla samotná příprava knihovny kitem NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB #E7760S). Schéma přípravy knihoven je na **Obrázku 11**.



Obrázek 11. Znárodnění tvorby sekvenačních knihoven
(vlastní úprava dle protokolu)

3.6.1 rRNA deplece

Prvním krokem bylo zředění devíti vzorků na požadované vstupní množství RNA s NFW (biologické triplikáty DLD-1 WT, DLD-1 R40 a DLD-1 R160). Výsledný objem každého vzorku činil 11 μ l o 1 000 ng celkové RNA a s RIN pohybující se mezi 9–10.

Výpočet koncentrace RNA pro tvorbu NGS knihoven popisuje **Tabulka 10**.

Tabulka 10. Výpočet koncentrace RNA (ng/μl) pro tvorbu NGS knihoven

buněčná linie	koncentrace RNA (ng/μl)	množství RNA (μl)	množství čisté vody (μl)
DLD-1 WT 1	424,00	2,40	8,60
DLD-1 WT 2	306,00	3,30	7,70
DLD-1 WT 3	312,00	3,20	7,80
DLD-1 R40 1	268,00	3,70	7,30
DLD-1 R40 2	280,00	3,60	7,40
DLD-1 R40 3	338,00	3,00	8,00
DLD-1 R160 1	428,00	2,30	8,70
DLD-1 R160 2	510,00	2,00	9,00
DLD-1 R160 3	488,00	2,00	9,00
výsledný objem			11 μl

Postup rRNA deplece probíhal takto:

Nejprve došlo k hybridizaci s RNA sondami. Ke každému vzorku byly přidány reagensie dle **Tabulky 11** a minimálně 10x byl vzorek propipetován a stočen na minicentrifuze. Veškerý postup probíhal na ledu. Vzorky byly poté umístěny do přehřátého cycleru a byl spuštěn program dle **Tabulky 12**. Po uplynutí času byly vzorky vyndány, stočeny na mikrocentrifuze a umístěny na chladicí destičku.

Tabulka 11. Seznam reagensií pro hybridizaci se sondami

pořadí	látka	objem
1	vzorek izolované RNA z buněčných linií DLD-1	11 μl
2	NEBNext v2 rRNA vyčerpávající roztok	2 μl
3	NEBNext hybridizační pufr sondy	2 μl
celkový objem		15 μl

Tabulka 12. Program cycleru při hybridizaci se sondami

fáze	čas	teplota
1	2 minuty	95 °C
2	snižování teploty o 0,1 °C za 1 vteřinu	22 °C
3	5 minut	22 °C
4	neurčito	4 °C
teplota víka		105 °C

Další částí bylo štěpení RNA na kratší sekvence pomocí H RNázy. K hybridizovanému vzorku byly přidány reagenty dle **Tabulky 13**. Poté došlo k propipetování vzorků alespoň 10x, krátkému stočení na mikrocentrifuze a vložení do cycleru s programem dle **Tabulky 14**.

Tabulka 13. Seznam reagentů pro štěpení RNA

pořadí	látka	objem
1	vzorek po hybridizaci	15 μ l
2	RNáza reakční pufr	2 μ l
3	NEBNext termostabilní H RNáza	2 μ l
4	NFW	1 μ l
celkový objem		20 μl

Tabulka 14. Program cycleru při štěpení RNA

fáze	čas	teplota
1	30 minut	50 °C
2	neurčito	4 °C
teplota víka		55 °C

Dále došlo ke štěpení pomocí DNázy I. Ke vzorkům byly přidány reagenty dle **Tabulky 15**. Poté bylo těchto 50 μ l důkladně propipetováno alespoň 10x, krátce stočeno na mikrocentrifuze a vloženo do cycleru s programem dle **Tabulky 16**.

Tabulka 15. Seznam reagentů pro štěpení pomocí DNázy

pořadí	látka	objem
1	vzorek po štěpení RNA	20 μ l
2	DNáza 1 reakční pufr	5 μ l
3	NEBNext DNáza 1	2,5 μ l
4	NFW	22,5 μ l
celkový objem		50 μl

Tabulka 16. Program cycleru při štěpení pomocí DNázy

fáze	čas	teplota
1	30 minut	37 °C
2	neurčito	4 °C
teplota víka		40 °C

Na závěr ribo–deplece byla provedena purifikace RNA pomocí magnetických Agencourt RNAClean XP kuliček. Falcona s kuličkami byla důkladně vortexována, vytemperována na pokojovou teplotu a následně bylo přidáno do každé nové zkumavky 90 μ l roztoku s kuličkami, přidáno 50 μ l vzorku do zkumavky s kuličkami, propipetováno a následně vzorky inkubovány po dobu 15 minut na ledu. Dalším krokem bylo přendání zkumavek na magnetickou destičku a po přesunutí kuliček a vyčeření vzorku byl odebrán supernatant a kuličky zůstaly v jamce s navázanou RNA. Samotná purifikace probíhala tak, že se ke kuličkám v magnetickém stojánku přidalo 200 μ l 80 % ethanolu po dobu 30 vteřin. Poté byl 80 % ethanol odstraněn a celý proces promytí byl ještě jednou zopakován. Po odstranění veškerého viditelného kapalného 80 % ethanolu se kuličky sušily přesně 1 minutu, aby došlo k odpaření zbytkového etanolu v peletě s kuličkami, ale ne více, aby nedošlo k přesušení a popraskání pelety, které by potom zhoršilo eluci produktu z kuliček. Následně byly zkumavky s kuličkami přesunuty z magnetického stojánku na obyčejný stojánek a každý vzorek byl alespoň 10x propipetován s NFW a inkubován po dobu alespoň 2 minut při pokojové teplotě. Poté byly zkumavky přemístěny zpět na magnetický stojánek a po vyčeření roztoku (alespoň další 2 minuty) bylo možné odebrat 5 μ l eluátu obsahujícího RNA bez rRNA do nové zkumavky. Vzorky byly opět umístěny na led pro zamezení degradace RNA. Po odstranění rRNA bylo možné přistoupit k samotné tvorbě knihoven.

3.6.2 Příprava knihoven na NGS sekvenaci

Prvním krokem při vytváření knihoven byla teplotní fragmentace RNA. Ke vzorkům byly přidány reagentie dle **Tabulky 17**. Vzorky o objemu 10 μ l byly propipetovány alespoň 10x, stočeny na mikrocentrifuze a vloženy do cycleru s nastaveným programem dle **Tabulky 18**. Po uplynutí zmíněné doby byly vzorky opět propipetovány alespoň 10x, stočeny na mikrocentrifuze a umístěny na chladicí destičku.

Tabulka 17. Seznam reagentií pro teplotní fragmentaci RNA

pořadí	látka	objem
1	vzorek s RNA	5 μ l
2	NEBNext reakční pufr	4 μ l
3	náhodné primery	1 μ l
celkový objem		10 μl

Tabulka 18. Program cycleru při teplotní fragmentaci RNA

fáze	čas	teplota
1	13,5 minut	94 °C
2	neurčito	4 °C
teplota víka		50 °C

Další fází byla syntéza prvního vlákna cDNA pomocí primerů. K 10 µl získaných vzorků z předešlého kroku byly přidány reagentie dle **Tabulky 19**. Vzorky o objemu 20 µl byly propipetovány alespoň 10x, stočeny na mikrocentrifuze a vloženy do cycleru s nastaveným programem dle **Tabulky 20**.

Tabulka 19. Seznam reagentií pro syntézu prvního vlákna cDNA

pořadí	látka	objem
1	vzorek po teplotní fragmentaci	10 µl
2	NEBNext specifický reagent pro první vlákno	8 µl
3	NEBNext enzymatického mixu pro syntézu prvního vlákna	2 µl
celkový objem		20 µl

Tabulka 20. Program cycleru při syntéze prvního vlákna cDNA

fáze	čas	teplota
1	10 minut	25 °C
2	15 minut	42 °C
3	15 minut	70 °C
4	neurčito	4 °C
teplota víka		80 °C

Třetí částí byla syntéza druhého vlákna cDNA. K 20 µl vzorků z předešlého kroku byly přidány reagentie dle **Tabulky 21**. Výsledných 80 µl každého vzorku bylo důkladně propipetováno alespoň 10x, stočeno na mikrocentrifuze a inkubováno v cycleru po dobu 1 hodiny při teplotě 16 °C (**Tabulka 22**). Teplota víka cycleru nesměla přesáhnout 40 °C.

Tabulka 21. Seznam reagensií pro syntézu druhého vlákna cDNA

pořadí	látka	objem
1	vzorek po syntéze prvního vlákna cDNA	20 μ l
2	NEBNext reakční pufr pro syntézu druhého vlákna	8 μ l
3	NEBNext enzymatický mix pro syntézu druhého vlákna	4 μ l
4	NFW	48 μ l
celkový objem		80 μl

Tabulka 22. Program cycleru při syntéze druhého vlákna cDNA

fáze	čas	teplota
1	60 minut	16 °C
2	neurčito	4 °C
teplota víka		vypnuto

Následně proběhla purifikace vzorku na magnetických kuličkách po syntéze druhého vlákna cDNA. Ke každému vzorku bylo přidáno 144 μ l roztoku s kuličkami a proběhlo přečištění 80 % ethanolem. Pro závěrečnou eluci se ke kuličkám přidalo 53 μ l tris/EDTA (TE) pufru a po eluci bylo odebráno 50 μ l pro další krok.

Po pročištění došlo k úpravě konců cDNA knihovny, aby došlo k odstranění chybných částí. K 50 μ l vzorku byly přidány reagensie dle **Tabulky 23**. Každý vzorek (60 μ l) byl propipetován alespoň 10x, stočen na mikrocetřifuze a inkubováno v cycleru s nastaveným programem dle **Tabulky 24**. Poté byly vzorky vyndány z cycleru a umístěny na led.

Tabulka 23. Seznam reagensií pro úpravu konců cDNA knihovny

pořadí	látka	objem
1	vzorek po syntéze druhého vlákna cDNA	50 μ l
2	NEBNext Ultra II reakční pufr na úpravu konců	7 μ l
3	NEBNext Ultra II enzymatický mix pro úpravu konců	3 μ l
celkový objem		60 μl

Tabulka 24. Program cycleru při úpravě konců cDNA knihovny

fáze	čas	teplota
1	30 minut	20 °C
2	30 minut	65 °C
3	neurčito	4 °C
teplota víka		75 °C

Následovala ligace neboli napojování adaptérů na oba konce fragmentu. Adaptéry mají unikátní sekvence a lze poté identifikovat vzorky po sekvenaci. K 60 μl vzorku bylo přidáno nejprve 2,5 μl 1:5 zředěného adaptoru, poté došlo k přidání reagensů dle **Tabulky 25**. Výsledných 93,5 μl každého vzorku bylo propipetováno alespoň 10x, stočeno na mikrocentrifuze a inkubováno v cycleru po dobu 15 minut při teplotě 20 °C. Poté byly přidány do každého vzorku 3 μl USER enzymu. Následovala další inkubace v cycleru po dobu 15 minut při teplotě 37 °C s přehřátým víkem na 45 °C (**Tabulka 26**).

Tabulka 25. Seznam reagensů pro napojování adaptérů na oba konce fragmentu

pořadí	látka	objem
1	vzorek po úpravě konců cDNA	60 μl
2	1:5 zředěný adaptor	2,5 μl
3	NEBNext legační zesilovač	1 μl
4	NEBNext Ultra II legační master mixu	30 μl
celkový objem		93,5 μl

Tabulka 26. Program cycleru při napojování adaptérů na oba konce fragmentu

fáze	čas	teplota	poznámka
1	15 minut	20 °C	vypnuté zahřívání víka
2	15 minut	37 °C	teplota víka 45 °C
3	neurčito	4 °C	

Po ligaci adaptérů následovala purifikace na magnetických kuličkách. Ke každému vzorku bylo přidáno 87 μl roztoku s kuličkami a proběhlo přečištění 80 % ethanolem. Pro závěrečnou eluci se ke kuličkám přidalo 17 μl TE pufru a po eluci bylo odebráno 15 μl pro další krok.

Následovala polymerázová řetězcová reakce (PCR) pro navýšení počtu kopií cDNA. K 15 μl každého vzorku byly přidány reagensie dle **Tabulky 27**. Výsledných 50 μl každého vzorku bylo propipetováno alespoň 10x, stočeno na mikrocentrifuze a vloženo do cycleru s nastaveným programem dle **Tabulky 28**. Počet cyklů byl zvolen dle vstupního množství RNA pro rRNA depleci, jak je doporučeno výrobcem. Následně proběhla purifikace vzorku na magnetických kuličkách. Ke každému vzorku bylo přidáno

45 μ l roztoku s kuličkami a proběhlo přečištění 80 % ethanolem. Pro závěrečnou eluci se ke kuličkám přidalo 23 μ l TE pufru a po eluci bylo odebráno 20 μ l vzorku.

Tabulka 27. Seznam reagensií pro PCR

pořadí	látka	objem
1	vzorek po napojování adaptérů	15 μ l
2	NEBNext Ultra II Q5 Master mix	25 μ l
3	primery s indexem	10 μ l
celkový objem		50 μl

Tabulka 28. Program cycleru při PCR

fáze	čas	teplota	počet cyklů
1	30 vteřin	98 °C	1
2	10 vteřin	98 °C	9
	75 vteřin	65 °C	
3	5 minut	65 °C	1
4	neurčito	4 °C	1
teplota víka		80 °C	

Po skončení posledního kroku byla zkontrolována aktuální koncentrace cDNA v každém vzorku na přístroji Qubit kitem DNA HS invitrogen 6 000. Kontrola velikosti knihovny jednotlivých vzorků probíhala na bioanalyzáru kitem (Agilent DNA 6 000 Nano kit). Kontrola odhalila přítomnost adaptor dimerů, tudíž bylo provedeno opětovné přečištění na kuličkách, jak je popsáno v této kapitole následované dalším měřením koncentrace na Qubitu a druhou kontrolou vzorků na přesnějším fragment analyzáru, která již poskytla finální výsledky.

3.7 Bioinformatická analýza NGS dat

Bioinformatickou analýzu můžeme rozdělit do 3 základních kroků: primární, sekundární a terciální zpracování dat. Primární analýza zpracovává data čtením signálů vlastního NGS sekvenování, která vyobrazují prosté seřazení nukleotidů a vlastní sekvenátor je následně přepíše do sekundárních dat v podobě textových fastq souborů, které představují nukleotidové sekvence jednotlivých sekvenovaných fragmentů. Primární analýza byla provedena ve firmě SEQme. Využili jsme program Illumina–knihovna vytvořena zákazníkem ShareSeq/Lane Sequencing. Dráhu jsme zvolili jako 250–600 base pairs (PE 150). Jedna dráha měla k dispozici 600 milionů

readů, tudíž u jednoho vzorku bylo okolo 67 milionů readů. Jednalo se o pair-end, takže byl transkript čten z jednoho i druhého konce, čímž byl celý proces přesnější. Do procesu poolování jsme použili všech 9 vzorků.

Do sekundární analýzy patří zpracování sekundárních dat a následné vygenerování dat terciálních, které jsou vhodné pro statistickou analýzu. Součástí byla kontrola kvality dat přes software FASTQC. Na základě výstupu z kvality dat se pak přistoupilo k čištění dat pomocí programu TRIMMOMATIC. Následovalo mapování sekvencí na lidský genom verze hg38 pomocí nástroje STAR. Na závěr došlo k vygenerování terciálních dat v podobě tabulky znázorňující jednotlivé geny a jejich četnost pomocí programu RSEM.

Terciální analýza dat je statistické zpracování terciálních dat a vytvoření výstupů z analýzy ve formě tabulky popisující jednotlivé geny seřazené dle jejich rozdílné exprese mezi skupinami. Tato část analýzy probíhala s využitím programovacího jazyka R a pomocí programu R-Studio. Výsledkem bioinformatické byly vytvořené tabulky zobrazující geny s nejvyšší expresí a grafické zobrazení. V programu R-Studio byly použity balíčky knihoven dplyr, ggplot2, ComplexHeatmap a edgeR.

3.8 Validace vybraných kandidátních genů chemorezistence

3.8.1 Výběr finálního setu pacientů

Veškeré biologické vzorky pacientů s CRC byly získány z Chirurgické kliniky ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze. Zde byla také schválena studie etickou komisí. Pacienti podepsali písemný informovaný souhlas, který byl navržený podle norem Helsinské deklarace. Během chirurgické resekce tumoru byly odebrány párové biopsie kolorektálních tumorů a přilehlé sliznice. Párové biopsie byly následně zmrazené a skladovány při teplotě -80 °C. Veškeré charakteristiky nádorů byly stanoveny patologi Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Klinicko – patologické informace o rekrutovaných pacientech s rakovinou jsou uvedeny v **Tabulce 29**. Vzorky byly poté transportovány na suchém ledu do Oddělení molekulární biologie nádorů Ústavu experimentální medicíny AV ČR, kde byly také provedeny všechny experimentální analýzy.

K výběru finálního setu pacientů byl využit set vzorků pacientů (celkový počet 356 pacientů) uskladněných na Oddělení molekulární biologie nádorů. Na základě kritérií jako režim léčby (5-FU), recidiva či duplicita byl vyselektován finální set 42 pacientů (**Tabulka 29**).

Tabulka 29. Charakteristika pacientů, jejichž vzorky byly použity v této práci

charakteristika		počet
počet jedinců	-	42
průměrný věk	-	66,2 let (45 let až 83 let)
pohlaví	mužské	21
	ženské	21
recidiva	ano	10
	ne	32
stav přežití	mrtví	14
	naživu	28
lokalizace	C18	35
	C19	7
léčba	XELODA	21
	FUFA	3
	FOLFOX	11
	FOLFOX, De GRAMONT, XELODA	2
	FOLFOX, De GRAMONT	2
	De GRAMONT	1
	FOLFOX, XELODA, FOLFIRI	2

3.8.2 Izolace RNA z tkáně pacientů

Veškerá izolace RNA probíhala ze zmražené tkáně pomocí RNeasa Mini Kit. K izolaci bylo použito adekvátní množství tkáně doporučené výrobcem kitu. Tkáň byla rozdrcena pomocí MagNa Lyser Green Beads v pufru RTL (600 µl) v homogenizátoru. Následně byl lyzát centrifugován po dobu 3 minut při maximální rychlosti. Supernatant byl odebrán do nové zkumavky. Poté bylo k lyzátu přidáno 550 µl 70 % etanolu a došlo k důkladnému propipetování. 700 µl vzorku bylo přemístěno do zkumavky s filtrem a došlo k centrifugaci po dobu 15 vteřin při 8 000 g. Průtok byl odstraněn.

Zbytek protokolu byl totožný jako při izolaci RNA z DLD-1 buněčných linií popsané v kapitole 3.5.6 včetně přečištění od DNA pomocí RNase-Free DNase Setu.

3.8.3 Reverzní transkripce RNA do cDNA

K reverzní transkripci RNA do cDNA byl použit kit High Capacity cDNA Reverse Transcription. K přepisu bylo použito 750 ng celkové RNA izolované z párových biopsií CRC pacientů. Bylo nutné připravit interplate kontrolu, která vznikla poolem náhodným výběrem 10 pacientů z celého zkoumaného setu pacientů. Seznam

reagencií pro tvorbu master mixu popisuje **Tabulka 30**. Do 96 jamkové destičky bylo napipetováno 10 μ l master mixu, následně bylo přidáno 10 μ l izolované RNA a destička byla stočena na centrifuze. Následně byla 96 jamková destička vložena do cycleru dle programu, který popisuje **Tabulka 31**. Jakmile byl proces reverzní transkripce hotov, všechny vzorky byly naředěny na koncentraci 10 ng/ μ l.

Tabulka 30. Seznam reagentů pro master mix na reverzní transkripci RNA do cDNA

složení master mixu	objem
10x RT pufr	2 μ l
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 μ l
10x RT Random Primers	2 μ l
MultiScribe reverse transcriptáza	1 μ l
RNáza inhibitor	1 μ l
NFW	3,2 μ l
celkový objem	10 μl

Tabulka 31. Program cycleru při reverzní transkripci RNA do cDNA

fáze	čas	teplota
1	10 minut	25 °C
2	120 minut	37 °C
3	5 minut	85 °C
4	neurčito	4 °C
teplota víka		80 °C

K polymerázové řetězové reakci v reálném čase (RT-qPCR) byl použit TaqMan Universal master mix II NO UNG. Složení reagenční směsi popisuje **Tabulka 32**. Veškerý proces probíhal na 384 jamkové destičce v přístroji QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systém s nastaveným programem dle **Tabulky 33**. Eseje měřených genů včetně referenčních genů využitých v diplomové práci jsou popsány v **Tabulce 34**. Na základě předchozí práce se vzorky na Oddělení molekulární biologie nádorů na Ústavu experimentální medicíny AV ČR byly již dříve vybrány referenční geny pro tyto druhy tkáně. Genová exprese byla měřena v biologických triplikátech.

Tabulka 32. Seznam reagenčních směsí pro tvorbu reakční směsi při Real time q-PCR

složení reagenční směsi	objem
TaqMan Universal master mix II NO UNG	5 μ l
sonda na cílený gen	1 μ l
vzorek	2 μ l
NFW	2 μ l
celkový objem	10 μl

Tabulka 33. Program cycleru při Real time q-PCR

fáze	čas	teplota	počet cyklů
1	2 minuty	50 °C	1
2	10 minut	95 °C	1
3	15 sekund	95 °C	45
	1 minuta	60 °C	
4	neurčito	4 °C	
teplota víka		80 °C	

Tabulka 34. Seznam esejí použitých v diplomové práci (ThermoFisher)

gen	ID
<i>HIST1H2BE</i>	Hs00543841 m1
<i>ALDH1L1</i>	Hs01003842 m1
<i>CD44</i>	Hs01075864 m1
<i>DKK1</i>	Hs00183740 m1
<i>ABCC2</i>	Hs00960489 m1
<i>ACTB</i>	Hs01060665 m1

3.9 Statistická analýza

Veškerá získaná data z RNAseq byla zpracována v programu R Studio. Pomocí balíčků knihoven a následným zadáním příkazových řádků byla získána data ve formě tabulky v excel. Následně došlo k výběru prvních 50 genů s největší expresí u DLD-1 R40 a DLD-1 R160 a proběhla analýze těchto genů na základě literatury a porovnání míry exprese konkrétního genu u protějšího souboru (v případě DLD-1 R40 byl daný gen porovnáván s genem u souboru DLD-1 R160 a naopak).

Zpracování dat z RT-qPCR probíhalo v programu Microsoft excel, kdy došlo nejdříve k normalizování cíleného genu na referenční gen. Z referenčních genů (*ACTB*, *HPRT*, *TUBA*, *B2M*) byl vybrán jako nejoptimálnější *ACTB*. Každý vzorek byl zpracován

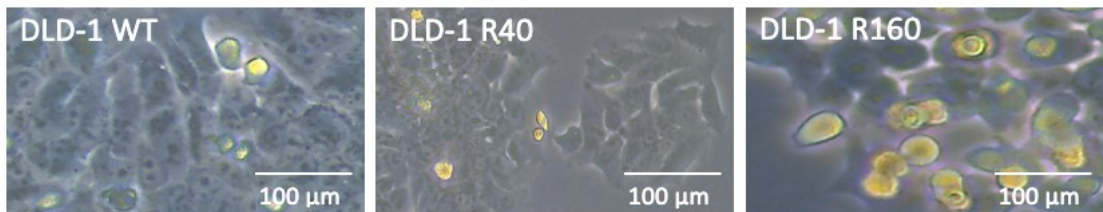
v biologickém triplikátu. Směrodatná odchylka mezi jednotlivými počty cyklů amplifikace triplikátů označovaná jako Cycle Treshold (CT) musela být nižší než 0,5. V opačném případě byla tato hodnota vyřazena.

Do výsledného grafu byly zaznamenány hodnoty $-\Delta CT$, kdy ΔCT je rozdíl CT hodnot tumoru/mukózy měřeného genu a CT referenčního genu. Jeden sloupec označoval hodnoty pro tumor, druhý sloupec pro nepostiženou tkáň. Hodnota párového T-testu byla vypočítána v programu GraphPadprism.

4. Výsledky

4.1 Stanovení transkriptomu chemorezistentních DLD-1 buněčných linií

K získání adekvátních informací o potenciálních kandidátních genech u nádorových DLD-1 buněk (**Obrázek 12**) CRC bylo zapotřebí vytvořit knihovny pro následnou sekvenaci metodou NGS. Informace o použitých buněčných liniích byly popsány v kapitole 3.5.



Zvětšení 400x

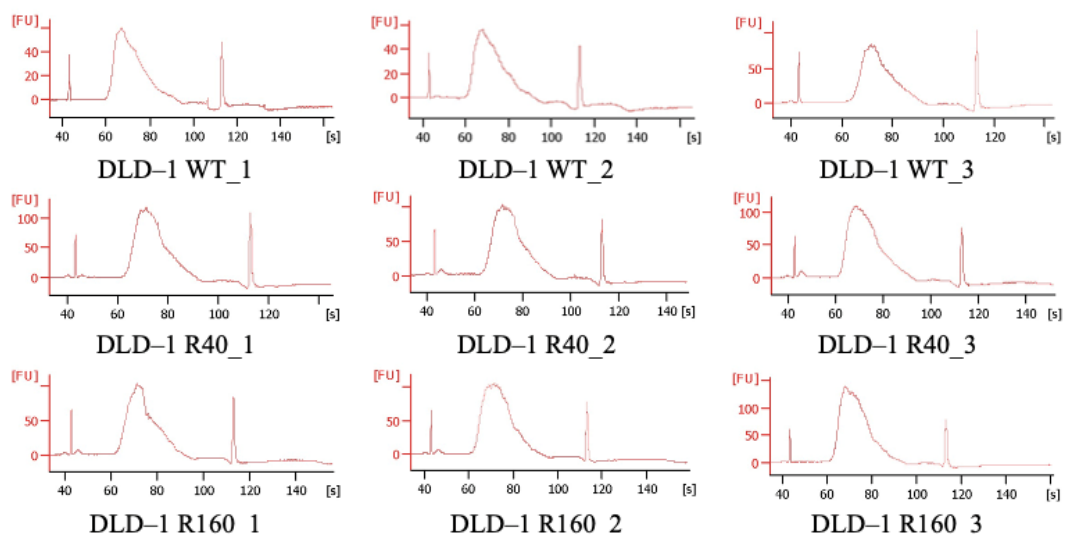
Obrázek 12. Porovnání buněčných linií DLD-1 (vlastní zpracování)

A – buněčná linie DLD-1 WT

B – buněčná linie DLD-1 R40

C – buněčná linie DLD-1 R16

Proces vytvoření knihoven včetně nutné ribo – deplece byl důkladně popsán v kapitole 3.6.1. Kontrolu vzorků po přípravě knihoven popisuje **Obrázek 13**.



Obrázek 13. Kontrola vytvořených jednotlivých vzorků po přípravě knihoven. Všechny vzorky splňovaly podmínky pro poolování a byly očištěny od adaptor dimerů

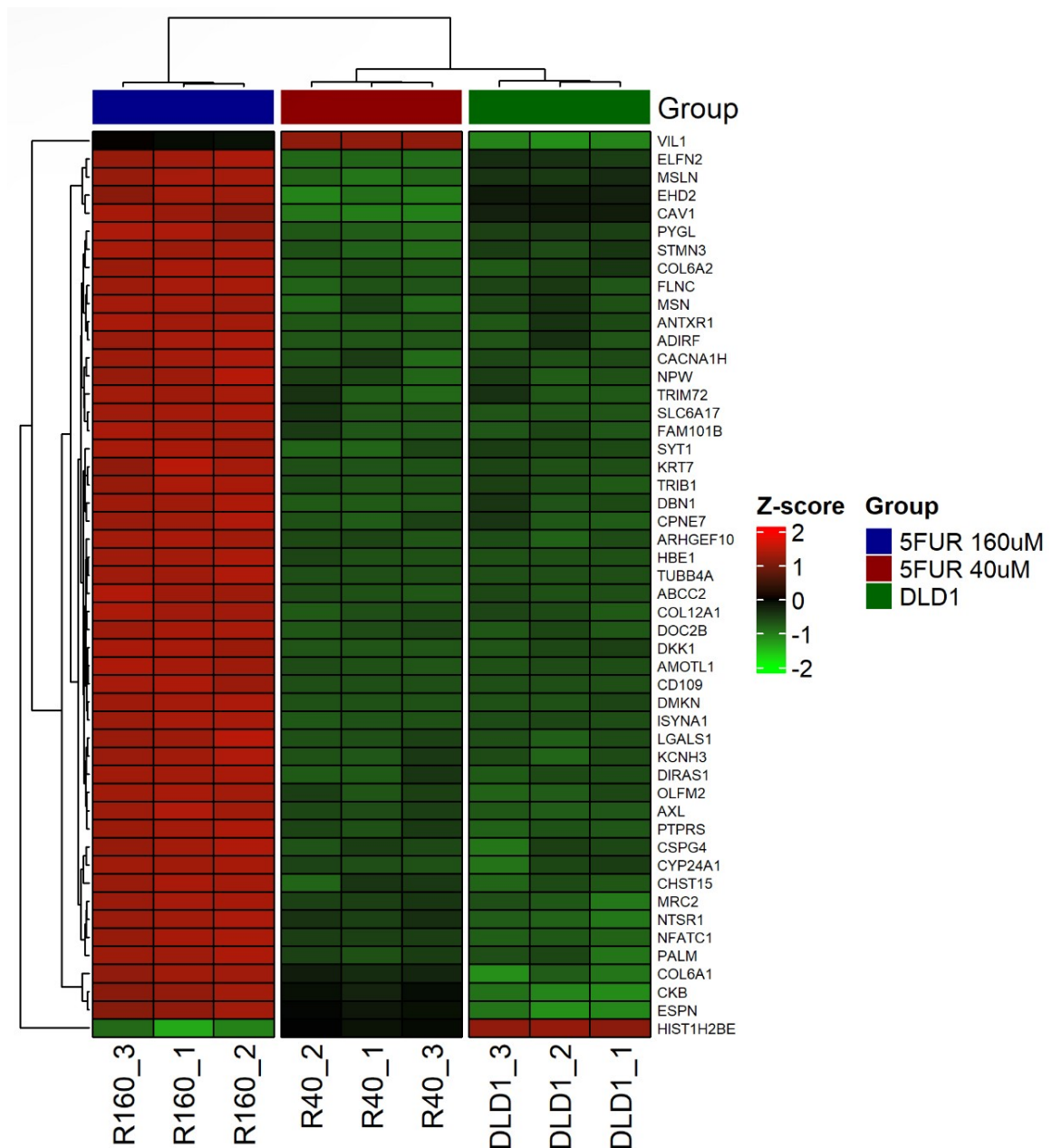
4.2 Bioinformatická analýza a výběr kandidátních genů

Pro výběr vhodných kandidátních genů bylo zapotřebí provést bioinformatickou analýzu. Celý proces bioinformatické analýzy je popsán v kapitole 3.7.

Během analýzy terciálních dat byly vyfiltrovány geny s nulovou expresí a expresí pod patnáctým percentilem.

Součástí bioinformatické analýzy byla tvorba heatmapy, která je znázorněna na **Obrázku 14**. Analýza heatmapy slouží k vizualizaci genové exprese u jednotlivých buněčných linií, tedy DLD-1 WT (3 biologické triplikáty), DLD-1 R40 (3 biologické triplikáty) a DLD-1 R160 (3 biologické triplikáty). Buněčné linie jsou zobrazeny na ose x. Na ose y jsou znázorněny geny s největší expresí. Klíčová je normalizace Z-skóre, které se počítá na základě každého genu. Průměrná genová exprese je vydělena směrodatnou odchylkou, přičemž výsledné Z-skóre (pro každý gen) je vyobrazeno odlišnou barvou v rozmezí intervalu (-2;2) viz **Obrázek 14**.

Z výsledné heatmapy je vidět, že největší rozdíl genové exprese vůči sensitivní DLD-1 WT měly geny u biologických triplikátů DLD-1 R160 a také, že jednotlivé triplikáty byly stabilní a správně vytvořené.

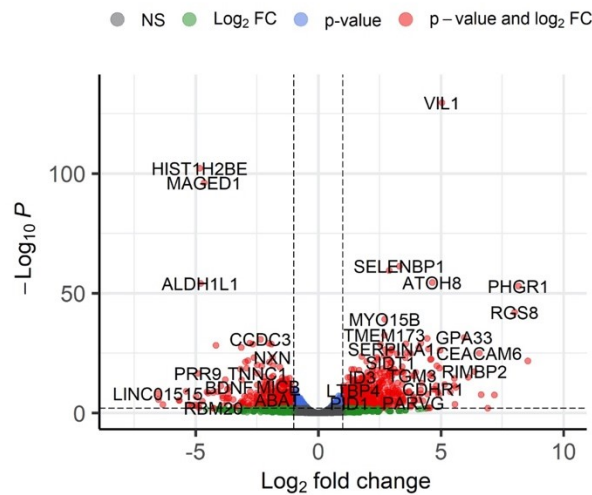


Obrázek 14. Heatmapa genů u jednotlivých buněčných linií vytvořená v programu R-Studio

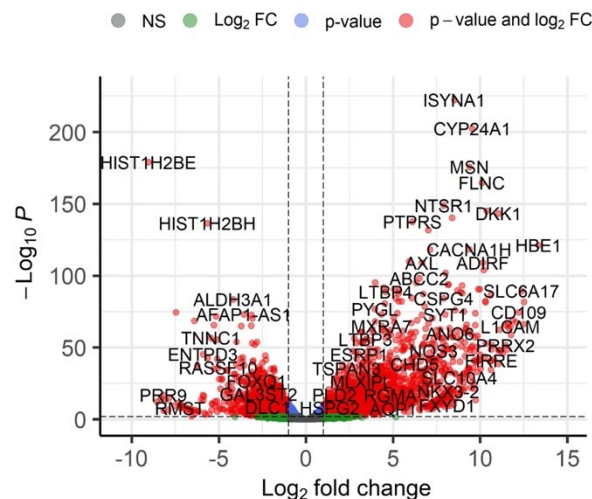
Díky bioinformatické analýze byly získány také volcano ploty, které sloužily k zobrazení závislosti p hodnoty (statistické významnosti) na fold change (kolikrát více byly konkrétní geny exprimovány u jedné buněčné linie v porovnání s druhou buněčnou linií). V našem případě byly vytvořeny 2 volcano ploty. V prvním případě byly porovnávány geny buněčných linií DLD-1 R40 vůči DLD-1 WT (**Obrázek 15**). Nejvíce up-regulovanými geny byly *VIL1*, *ATOH8* či *PHGRI*. Nejvíce down-regulovanými geny byly *HIST1H2BE*, *MAGED1* a *ALDH1L1*.

U druhého případu byly porovnávány geny buněčných linií DLD-1 R160 vůči DLD-1 WT (**Obrázek 16**). Nejvíce down-regulovanými geny byly *HIST1H2BE*, *HIST1H2BH* či *ALHD3A1*, nejvíce up-regulované geny byly *ISYNA 1*, *CYP24A1* či *MSN*.

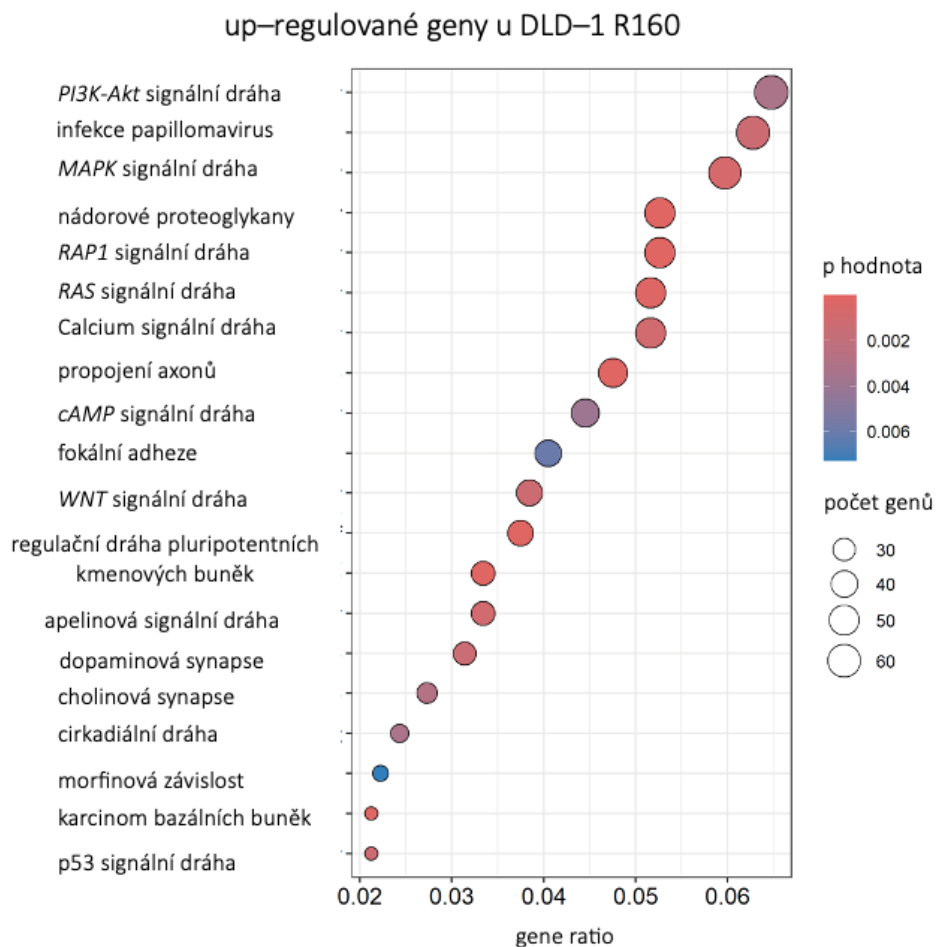
Z výsledných volcanů plotů lze vidět, že větší rozdíl genové exprese vůči senzitivní DLD-1 WT byl pozorován u DLD-1 R160.



Obrázek 15. Volcano plot porovnávající geny buněčných linií DLD-1 R40 vůči DLD-1 WT (vytvořeno v programu R-Studio)



Obrázek 16. Volcano plot porovnávající geny buněčných linií DLD-1 R160 vůči DLD-1 WT (vytvořeno v programu R-Studio)



Obrázek 17. Funkční analýza up-regulovaných genů u buněčné linie DLD-1 R160 (vytvořeno v programu R-Studio)

Během bioinformatické analýzy byla provedena funkční analýza DLD-1 rezistentních buněčných linií. **Obrázek 17** popisuje funkční analýzu up-regulovaných genů u DLD-1 R160. Můžeme zde vidět signální dráhy p53, *RAP*, *RAS*, *cAMP* či například *PI3K-Akt* podílející se na regulaci buněčného cyklu, *MAPK* podílející se na přenosu signálu na povrch buňky. Tyto signální dráhy se podílí na ovlivnění buněčného cyklu, což může pravděpodobně přispět k získání chemorezistence u nádorových buněk.

U buněčné linie DLD-1 R40 nebylo dostatek signifikantních drah k vyobrazení grafu, nicméně mezi těchto pár drah patřily geny podílející se na DNA replikaci či geny skupiny ABC transportérů.

4.2.1 Výběr kandidátních genů na základě zpracování bioinformatických (terciálních) dat ze sekvenování DLD-1 buněčných linií

Výsledkem práce v R-studiu bylo vygenerování dvou tabulek, kdy v 1. tabulce docházelo k porovnávání genové exprese u souboru DLD-1 R40 a souboru DLD-1 WT (**Příloha 1**). V 2. tabulce byla porovnávána genová exprese u souboru DLD-1 R160 a souboru DLD-1 WT (**Příloha 2**). Díky tomuto porovnání byly určeny geny, jejichž exprese byla vyšší u rezistentní buněčné linie oproti DLD-1 WT.

Deset nejvíce signifikantně odlišně exprimovaných genů u buněčné linie DLD-1 R40 vůči senzitivní buněčné linii DLD-1 WT je zobrazeno v **Tabulce 35** a u buněčné linie DLD-1 R160 v **Tabulce 36**.

Tabulka 35. Porovnání genové exprese mezi DLD-1 R40 a DLD-1 WT

gen	logFC	logCPM	LR	pořadí
<i>VILI</i>	5,04	6,16	609,06	411.
<i>HIST1H2BE</i>	-4,84	7,01	481,79	3.
<i>MAGED1</i>	-4,66	6,72	453,28	9673.
<i>SELENBP1</i>	3,31	8,64	292,68	7736.
<i>CPT1A</i>	2,89	7,02	284,30	128.
<i>ATOH8</i>	4,65	5,85	260,50	1067.
<i>ALDH1L1</i>	-4,80	4,84	258,56	56.
<i>PHGR1</i>	8,16	3,42	252,94	712.
<i>RGS8</i>	8,01	2,35	202,74	4239.
<i>MYO15B</i>	2,70	6,66	189,34	9565.

logFC = logaritmičká hodnota o základu 2 z fold change mezi DLD-1 WT a DLD-1 R40

logCPM = logaritmičká hodnota o základu 2 z counts per milion (normalizovaná hodnota exprese na milion readů)

LR = Likelihood Ratio (poměr maximálního likelihood hodnoty a likelihood nulové hypotézy)

pořadí = pořadí genu u souboru porovnávací genovou expresi mezi DLD-1 R160 a DLD-1 WT

Tabulka 36. Porovnání genové exprese mezi DLD-1 R160 a DLD-1 WT

gen	logFC	logCPM	LR	pořadí
<i>ISYNA1</i>	8,53	7,88	1035,72	8702.
<i>CYP24A1</i>	9,54	6,92	943,06	13609.
<i>HIST1H2BE</i>	-9,05	7,01	833,97	2.
<i>MSN</i>	9,39	6,56	818,51	5198.
<i>FLNC</i>	10,10	6,82	767,40	5356.
<i>NTSR1</i>	7,89	7,67	694,15	463.
<i>COL6A2</i>	10,37	6,89	676,92	3456.
<i>DKK1</i>	11,04	6,44	668,36	4176.
<i>COL6A1</i>	8,38	6,93	653,42	145.
<i>PTPRS</i>	6,10	7,39	641,24	4189.

logFC = logaritmičká hodnota o základu 2 z fold change mezi DLD-1 WT a DLD-1 R160

logCPM = logaritmičká hodnota o základu 2 z counts per milion (normalizovaná hodnota exprese na milion readů)

LR = Likelihood Ratio (poměr maximálního likelihood hodnoty a likelihood nulové hypotézy)

pořadí = pořadí genu u souboru porovnávaných genovou expresi mezi DLD-1 R40 a DLD-1 WT

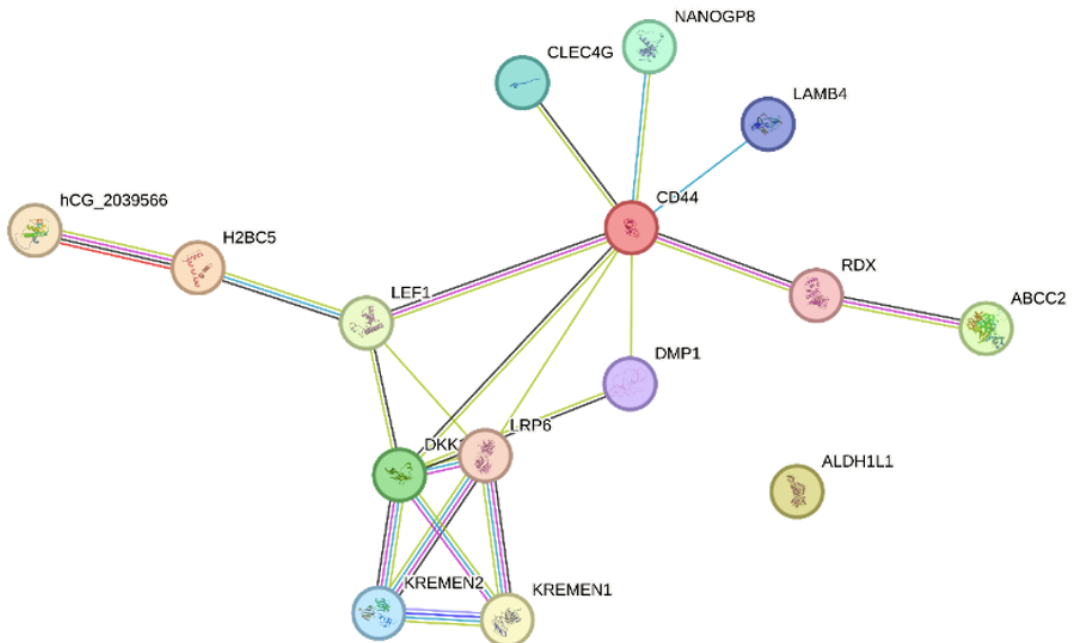
Na základě signifikance a průniku výsledků (**Tabulka 35 a 36**), popisu funkcí jednotlivých genů v literatuře, funkční analýze, relevanci k nádorovému onemocnění a léčbě bylo vybráno 5 potenciálních kandidátních genů. Konkrétně se jednalo o *HIST1H2BE*, *ALDH1L1*, *CD44*, *DKK1* a *ABCC2*.

Porovnání genové exprese vybraných potenciálních biomarkerů popisuje **Tabulka 37**.

Tabulka 37. Porovnání genové exprese kandidátních genů mezi DLD-1 R40 a DLD-1 WT a mezi DLD-1 R160 a DLD-1 WT

DLD-1 R40 vs DLD-1 WT			
gen	logFC	logCPM	LR
<i>HIST1H2BE</i>	-4,84	7,00	481,79
<i>ALDH1L1</i>	-4,80	4,84	258,56
<i>CD44</i>	2,53	8,61	139,66
<i>DKK1</i>	-3,14	6,44	4,66
<i>ABCC2</i>	-0,09	5,72	0,07
DLD-1 R160 vs DLD-1 WT			
gen	logFC	logCPM	LR
<i>HIST1H2BE</i>	-9,05	7,01	833,97
<i>ALDH1L1</i>	-7,46	4,84	348,03
<i>CD44</i>	4,51	8,61	376,38
<i>DKK1</i>	11,04	6,44	668,36
<i>ABCC2</i>	6,50	5,72	458,76

Výběr kandidátních genů byl podpořen i funkčním propojením na proteinové úrovni některých těchto genů jako *HIST1H2BE* (*H2BC5*), *CD44*, *DKK1* a *ABCC2* (**Obrázek 18**).



Obrázek 18. Proteinová mapa genů *HIST1H2BE* (*H2BC5*), *CD44*, *DKK1*, a *ABCC2* (*string-db.org*)

4.3 Validace vybraných kandidátních genů v lidských vzorcích u pacientů s CRC se špatnou odpovědí na chemoterapii 5–FU

Na základě výsledků analýzy transkriptomu z *in vitro* studií byly vybrány kandidátní geny (*HIST1H2BE*, *ALDH1L1*, *CD44*, *DKK1* a *ABCC2*), jejichž expresní hladiny byly validovány na vzorcích tumorové tkáně a přilehlé zdravé mukóze od pacientů s CRC léčených režimy na bázi 5–FU.

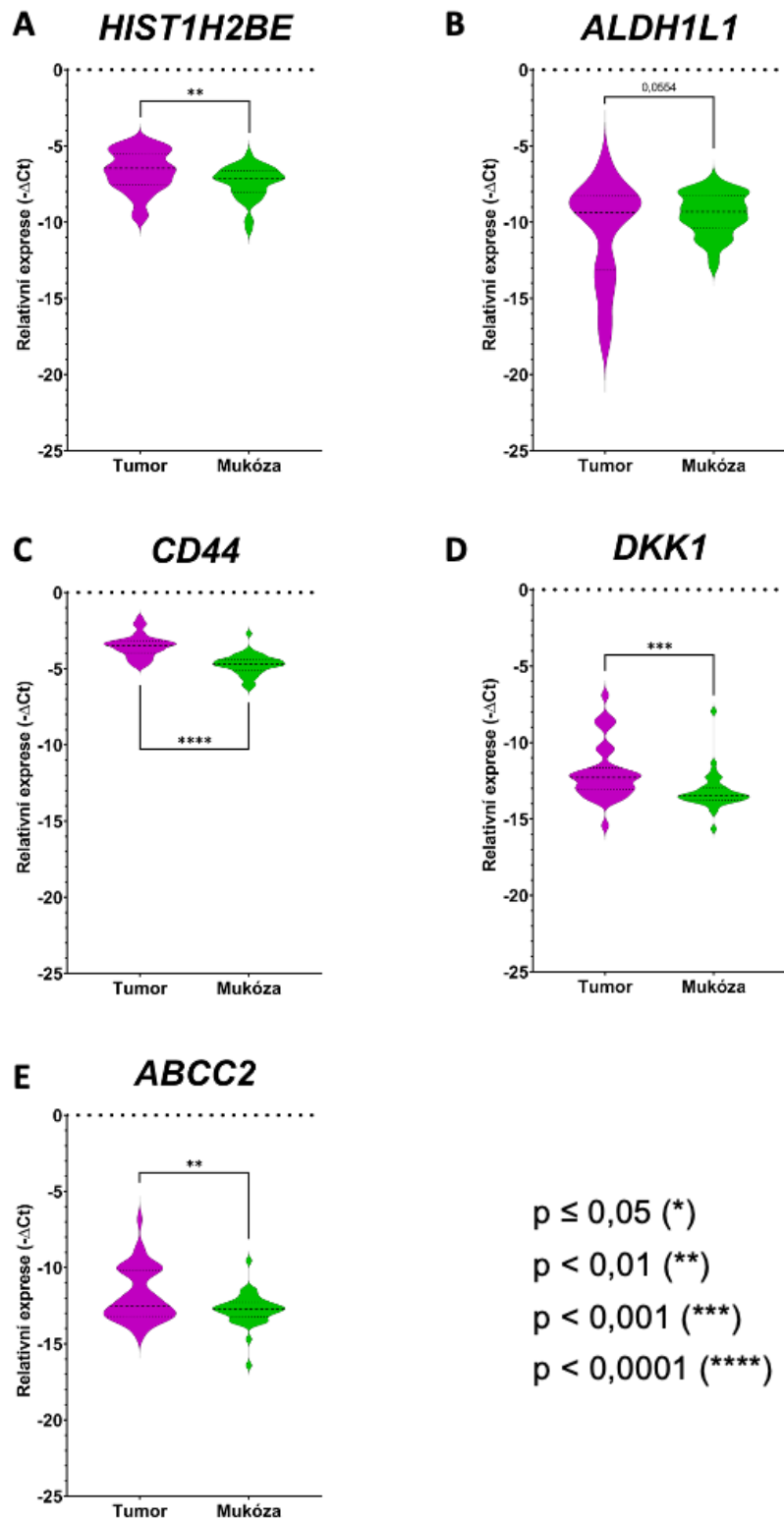
Pacienti s CRC vybráni do naší studie podstupovali různé typy léčby. Prvním typem léčby je režim FUFA neboli kombinace 5–FU a leucovorinu. Maximální délka užívání je 6 měsíců a vhodné je také poznamenat, že je tento režim užíván u pacientů ve 2. stádiu nemoci. Do této práce byly použity vzorky od 3 pacientů, kteří byli léčeni v režimu FUFA.

FOLFOX užíván u pacientů ve 3. a 4. stádiu léčby. Do této práce byly použity vzorky od 17 pacientů, kteří byli léčeni v režimu FOLFOX.

Do této práce byly použity vzorky od 21 pacientů, kteří byli léčeni v režimu XELODA a 5 pacientů léčených v režimu De GRAMONT.

Na základě RT-qPCR došlo k získání dat genové exprese u pěti vybraných kandidátních genů, kde došlo k porovnání hodnot relativní genové exprese ($-\Delta\text{CT}$) mezi tumorem a okolní nepostiženou mukózou.

Mezi skupinami pacientů s recidivou a bez recidivy nebyl pozorován rozdíl v expresních hladinách vybraných kandidátních genů chemorezistence, což mohlo být způsobeno nepoměrem v počtu pacientů v obou skupinách (10 pacientů s recidivou *versus* 32 pacientů bez recidivy).



Obrázek 19. Validace vybraných kandidátních genů chemorezistence
(vytvořeno v programu GraphPadprism)

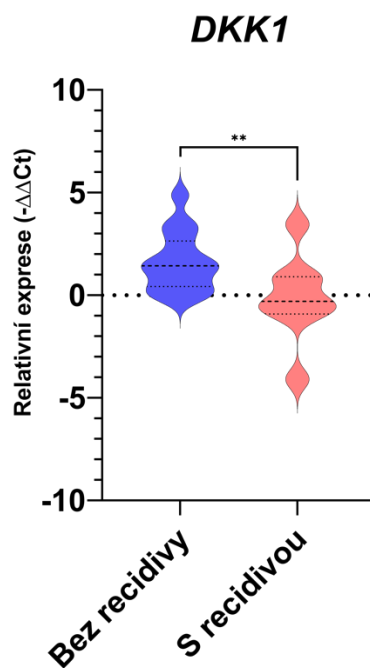
Prvním genem, který byl validován na setu pacientů s CRC byl gen *HIST1H2BE*. V tomto případě byla však během validace zjištěna zvýšená hladina genu v tumoru oproti nepostižené okolní mukóze (**Obrázek 19A**), což značí odlišný trend, než byl zjištěn u rezistentů buněčné linie DLD-1. Tento fakt může být zapříčiněn odlišnými podmínkami, které mohou nastat u buněk během *in vitro* experimentů, než je tomu u buněk uvnitř lidského organismu.

V **Obrázku 19B** lze pozorovat nesignifikantní nižší expresní hladiny u genu *ALDH1L1* v tumorové tkáni ($P = 0,0554$), což opět potvrzuje trend získaný u DLD-1 rezistentních linií. U obou buněčných DLD-1 rezistentů byla snižená hladina tohoto genu, přičemž větší rozdíl snižené hladiny oproti DLD-1 WT byl pozorován u DLD-1 R160.

U genu *CD44* byla signifikantně zvýšená hladina v tumoru oproti nepostižené okolní mukóze (**Obrázek 19C**). Zvýšená hladina genu *CD44* byla rovněž pozorována u buněčných DLD-1 rezistentů, kdy vyšší rozdíl zvýšené hladiny byl zaznamenán u DLD-1 R160.

Signifikantně zvýšená hladina genu *DKK1* byla pozorována v tumoru oproti nepostižené okolní mukóze (**Obrázek 19D**). I zde byl potvrzen trend zvýšené hladiny jako u buněčné linie DLD-1 R160. U DLD-1 R40 byla však snižená hladina tohoto genu, a tudíž se může jednat o další důkaz rozdílných mechanismů u odlišujících se typů rezistentů.

Obrázek 19E ukazuje výslednou validaci genu *ABCC2* v tumoru a okolní nepostižené mukóze. Z výsledku lze vidět, že statisticky signifikantně vyšší genová exprese byla pozorována v tumoru, což odpovídá trendu jako u buněčných linií DLD-1 R160 v porovnání se senzitivní DLD-1 WT buněčnou linií. Zajímavostí však je, že u DLD-1 R40 vykazoval gen *ABCC2* nižší hladiny genové exprese, tudíž zde byl rozdíl mezi jednotlivými typy rezistentů.



Obrázek 20. Validace hladiny exprese genu *DKK1* na pacientech s recidivou a pacientech bez recidivy ($P < 0,01$ (**)) (vytvořeno v programu GraphPadprism)

Během validace došlo také k porovnání hladiny genové exprese jednotlivých genů mezi skupinou pacientů s recidivou a skupinou pacientů bez recidivy. Vzhledem k nepoměru pacientů (10 pacientů s recidivou, 32 pacientů bez recidivy) nebyl sledován žádný signifikantní rozdíl u genů *HIST1H2BE*, *CD44*, *ABCC2* a *ALDH1L1*. Pouze u genu *DKK1* byl vidět signifikantní rozdíl genové exprese. Zajímavé však je, že vyšší hladina genu *DKK1* byla pozorována u pacientů bez recidivy (**Obrázek 20**).

5. Diskuze

Chemorezistence představuje jednu z hlavních příčin selhání terapie, a proto je pochopení mechanismů vedoucích k rezistenci nádorových buněk CRC jedním z hlavních předpokladů pro nalezení způsobu, jak ji překonat. V současné době je základním typem léčby CRC chemoterapie pomocí léčiva 5-FU. Na základě stádia nemoci jsou pacienti léčeni odlišnými léčebnými režimy, mezi které lze zařadit FUFA, FOLFOX, XELODA či De GRAMONT.

Cílem této diplomové práce bylo stanovení transkriptomu sensitivních a chemorezistentních DLD-1 buněčných linií vůči 5-FU. Pomocí bioinformatické analýzy byly vybrány kandidátní geny chemorezistence, které byly následně validovány na setu pacientů léčených 5-FU.

Během práce s buněčnými liniemi byly patrné viditelné morfologické rozdíly mezi jednotlivými buněčnými liniemi. Buněčná linie DLD-1 WT byla pevně přisedlá na Petriho misce a bylo velmi obtížné tyto buňky seškrábat a následně přenést do sběrné zkumavky. U DLD-1 R40 byl sběr o něco snadnější. U posledního biologického triplikátu, tedy u DLD-1 R160 byl sběr nejjednodušší, kdy po přidání trypsinu došlo k okamžitému oddělení drtivé většiny buněk od dna Petriho misky. Tyto rozdíly v morfologii a adhezi mohou být způsobeny právě epitelo-mezenchymální tranzicí u DLD-1 R40 a DLD-1 R160.

Na základě bioinformatické analýzy bylo vybráno pět potenciálních kandidátních genů, konkrétně *HIST1H2BE*, *ALDH1L1*, *CD44*, *DKK1* a *ABCC2*. Díky funkční analýze byly zjištěny nejvíce up-regulované dráhy, které mimo jiné zahrnovaly cAMP (gen *ABCC2*), p53 signální dráhu, *RAP*, *RAS*, *cAMP* či například *PI3K-Akt*.

Vybrané kandidátní geny byly validovány na setu 42 pacientů s CRC léčených 5-FU, u kterých byla známá odpověď na léčbu. U setu pacientů bylo též známá přítomnost či nepřítomnost recidivy. Získané výsledky validace byly porovnány s výsledky analýzy transkriptomu DLD-1 rezistentních linií. Během sledování expresních hladin nebyl pozorován rozdíl mezi pacienty s a bez recidivy (kromě genu *DKK1*). To mohlo být způsobeno rozdílným počtem pacientů v obou skupinách (10 pacientů s recidivou, 32 pacientů bez recidivy), což značí statisticky velký nepoměr k provedení analýzy.

Prvním z možných biomarkerů byl gen *HIST1H2BE*. Mezi základní vlastnosti tohoto genu lze uvést ovlivnění balení konců telomer, podílení se na buněčném cyklu,

antibakteriální aktivita související s epitelem tlustého střeva a také je tento gen spojen s Ehrlichovým nádorovým karcinomem (Aljohani *et al.* 2023). Dle studie z roku 2015 bylo zjištěno, že zvýšená exprese genu *HIST1H2BE* souvisela se zvýšenou proliferací nádorové buněčné linie karcinomu prsu (Nayak *et al.* 2015). Pro gen *HIST1H2BE* existuje 103 reaktomových drah, mezi které lze zmínit aktivaci genu *PKN1* stimulující transkripci androgenního receptoru, aktivaci genů *HOX* během vývoje zadní části mozku či tvorbu amyloidních vláken. Interakci *HIST1H2BE* s dalšími geny (Aljohani *et al.* 2023).

Na základě analýzy transkriptomu chemorezistentních DLD–1 buněčných linií byla v *in vitro* podmínkách objevena snížená hladina genu *HIST1H2BE*. U DLD–1 R160 byla hladina tohoto genu nižší vůči DLD–1 WT. Validace genu *HIST1H2BE* však ukázala zvýšenou hladinu genu v nádorové tkáni vůči okolní nepostižené mukóze. Odlišné pozorované hladiny mezi *in vitro* podmínkami a hladinami stanovenými u pacientů mohou být důsledkem odlišných podmínek mezi *in vitro* a lidskými vzorky. Dle studie z roku 2013 bylo zjištěno, že gen *HIST1H2BE* zkoumán na buněčných liniích H1299 měl zvýšenou hladinu (Kari *et al.* 2013). V našich výsledcích z *in vitro* studie se však jednalo o opačný trend, který mohl být zapříčiněn využitím odlišné buněčné linie. DLD–1 byla izolována z adenokarcinomu tlustého střeva 51 letého nemetastazujícího pacienta s CRC (Tanaka *et al.* 2016).

Druhým z vybraných kandidátních genů je *ALDH1L1*, neboli gen ovlivňující snížení apoptózy, spadá do skupiny aldehyddehydrogenázy 1 a je též označován jako gen související s progresí nádorových onemocnění. Mechanismus genu *ALDH1L1* spočívá v oxidoreduktáze a aldehyddehydrogenáze, přičemž se mimo jiné podílí i na metabolismu vitamínů rozpustných ve vodě (Qu *et al.* 2022).

Genem *ALDH1L1* se zabývala studie z roku 2022, kde byla zjištěna snížená expresní hladina genu v nádorových buňkách u karcinomu dutiny ústní oproti přilehlé tkáni (Qu *et al.* 2022). Gen *ALDH1L1* byl také předmětem zkoumání ve studii Dmitriev *et al.*, kde sledovali nižší hladinu mRNA genu *ALDH1L1* v CRC tkáni oproti přilehlé způsobenou potlačením transkripce skrze hypermetylaci promotoru (Dmitriev *et al.* 2020). Analýza transkriptomu DLD–1 rezistentních buněčných linií ukázala sníženou expresní hladinu oproti DLD–1 WT.

Dalším vybraným kandidátním genem byl *DKK1*. Zhu *et al.* pozoroval, že vysoké exprese genu *DKK1* v krvi mají souvislost s výskytem různých nádorových onemocnění jako rakovina prsu, prostaty či CRC (Zhu *et al.* 2021). Zároveň bylo zjištěno, že zvýšená exprese tohoto genu může také hrát roli při vzniku metastáz, ovšem významným faktorem

je typ nádorového onemocnění související s odlišnými metabolickými mechanismy dané tkáně (Zhu *et al.* 2021). Další funkcí tohoto genu je interakce s transmembránovým proteinem KREMEN, který souvisí s LRP5/6 a má vliv na růstové faktory (Ahn *et al.* 2011).

Analýza transkriptomu rezistentů ukázala sníženou expresní hladinu genu *DKK1* u DLD-1 R40, naopak u DLD-1 R160 byla sledována zvýšená hladina. Bylo tak možné vidět odlišné expresní hladiny genu *DKK1* v závislosti na rozdílných koncentracích léčiva 5-FU.

Validace genu *DKK1* ukázala zvýšenou expresní hladinu v tumoru oproti nepostižené mukóze. Zvýšenou hladinu exprese genu *DKK1* v tumoru oproti okolní tkáni potvrdila i studie z roku 2021 (Caldwell *et al.* 2021). Se zvyšující se rezistencí vůči 5-FU mohou nádorové buňky více migrovat a snižovat tak účinnost léčby.

U genu *DKK1* byl pozorován signifikantní rozdíl genové exprese mezi pacienty s recidivou a pacienty bez recidivy. Vyšší hladina genové exprese však byla zaznamenána u pacientů bez recidivy, což byla jedna z hlavních příčin, proč tento gen nebyl vybrán za nejslibnější biomarker chemorezistence, a to i navzdory tomu, že se jednalo o gen s druhou nejvyšší signifikancí v rámci validace. Jednalo se však o poměrně malé počty analyzovaných skupin pacientů.

Dalším potenciálním biomarkerem byl gen *ABCC2* spadající do skupiny ABC transportérů. V předchozích studiích bylo zjištěno, že gen *ABCC2* se podílí na přenášení protinádorových léčiv jako například antracyklin a je možné tak předpokládat, že význam tohoto genu by mohl být v zisku chemorezistence nádorových buněk (Cui *et al.* 1999).

V této práci byla na základě analýzy transkriptomu DLD-1 buněčných linií zjištěna snížená expresní hladina genu *ABCC2* u DLD-1 R40 a naopak zvýšená expresní hladina u DLD-1 R160 buněčných linií. Na základě výsledků validace hladin exprese genů byla potvrzena zvýšená expresní hladina genu *ABCC2* v tumorové tkáni oproti přilehlé, což korespondovalo z *in vitro* studie u více rezistentní DLD-1 linie na 5-FU. Nelze vyloučit ani odlišné mechanismy, které nastávají při nižší koncentraci 5-FU. Studie z roku 2015 potvrdila zvýšenou hladinu genu *ABCC2* u pacientů s CRC (Andersen *et al.* 2015).

Posledním kandidátním biomarkerem chemorezistence v této práci byl vybrán gen *CD44*. CD44, široce exprimovaná adhezní molekula na buněčném povrchu, hraje důležitou roli při podpoře nádorové angiogeneze prostřednictvím regulace různých funkcí endoteliálních buněk, jako je proliferace, migrace, adheze, invaze. Mnohé studie odhalily,

že vyšší exprese *CD44* korelovala s fenotypem nádorových kmenových buněk a EMT, čímž přispěla k nádorové invazi, metastázám, recidivám a chemorezistenci (Xu *et al.* 2015).

Dle studie z roku 2019 bylo zjištěno, že zvýšená exprese genu *CD44* je nepříznivým markerem pro pacienty s CRC, může totiž indikovat vznik metastáz v lymfatických uzlinách (Wang *et al.* 2019). Významnou dráhou pro *CD44* je metabolismus glykosaminoglykanů, který je součástí vrozeného imunitního systému, případně aktivita cytokinového receptoru (Misra *et al.* 2015).

Validace exprese genu *CD44* na pacientech CRC léčených 5-FU potvrdila trend zvýšené expresní hladiny genu v tumoru oproti okolní nepostižené mukóze. Tyto výsledky se shodují se studií Chandra *et al.*, kde byla sledovaná zvýšená hladina markeru *CD44* v lidských nádorových vzorcích (Chandra *et al.* 2016). Na základě analýzy transkriptomu rezistentů buněčných linií DLD-1, validace na pacientech CRC léčených 5-FU, poznatků o EMT a také asociačních studií zkoumající hladinu genu, byl vybrán gen *CD44* jako nejrelevantnější marker chemorezistence CRC v naší studii.

Objev těchto pěti kandidátních genů spjatých s chemorezistencí nádorových buněk CRC může přispět ke zlepšení léčby CRC. V případě nálezů markerů chemorezistence v primárním tumoru by mohl klinický onkolog změnit typ léčby, neboť tyto markery naznačují, že jsou nádorové buňky onoho pacienta rezistentní vůči aktuální léčbě. Mohlo by tak dojít k rychlejší změně typu léčby, resp. léčebných režimů a včasnému vypořádání se s chemorezistencí nádorových buněk CRC. Další možností jak by mohl klinický onkolog postupovat při nálezů vybraných kandidátních genů chemorezistence je zintenzivnění zvoleného léčebného režimu.

Cíle této diplomové práce zmíněné na začátku diskuze byly splněny, neboť došlo k identifikaci markerů chemorezistence u 5-FU rezistentních nádorových buněk DLD-1, jejichž validace potvrdila zvýšené hladiny u genů *CD44*, *DKK1* a *ABCC2*, a snížené hladiny genu *ALDH1L1* v tumoru oproti okolní nepostižené mukóze. Hypotéza této práce byla také potvrzena, neboť DLD-1 buněčné linie rezistentní vůči 5-FU byly vhodným modelem ke studiu chemorezistence na 5-FU u pacientů s CRC. Zároveň byla potvrzena i druhá část hypotézy, tedy že námi identifikované geny spjaté s chemorezistencí na 5-FU na buněčných liniích jsou slibnými biomarkery.

Antropologický aspekt této diplomové práce spočíval v poukázání na velkou problematiku chemorezistence u pacientů s CRC. Chemorezistence u pacientů s CRC je komplexní problém, který je těsně spojen s evolucí nádorových buněk. Tento proces je

důsledkem genetických a epigenetických změn v nádorových buňkách, které vedou k jejich odolnosti vůči chemoterapeutickým zásahům. Porozumění evoluci chemorezistence, ať už vrozené nebo získané, může vést k vývoji nových terapeutických strategií pro léčbu CRC. Jako příklad lze zmínit, že využití kombinované léčby s léky působícími různými mechanismy může efektivně cílit na různé klony nádorových buněk, může napomoci k překonání chemorezistence, podpořit klinické onkology o strategii léčby a přispět tak ke zlepšení kvality života pacientů.

Na závěr je nutné poznamenat, že tento diplomový projekt je pilotní studií a je potřeba provést validaci na větším souboru pacientů, abychom potvrdili výběr kandidátních genů chemorezistence.

6. Závěr

Chemorezistence představuje jednu z největších překážek při léčbě pacientů s CRC. Tato diplomová práce popisuje průběh tvorby knihoven z DLD–1 buněčných linií a jejich rezistentních linií na 5–FU pro NGS sekvenaci, bioinformatickou analýzu, díky níž byly vybrány možné kandidátní geny spjaté s chemorezistencí, a také validaci výsledků, která probíhala u pacientů s CRC. U těchto pacientů léčených 5–FU, u nichž byla známá odpověď na léčbu 5–FU z důvodu dlouhodobého sledování těchto pacientů, byla měřena exprese vybraných genů v tumoru a okolní nepostižené mukózy.

Po osekvenování knihoven bylo na základě bioinformatické analýzy vybráno pět potenciálních kandidátních genů chemorezistence, konkrétně *HIST1H2BE*, *ALDH1L1*, *CD44*, *DKK1*, *ABCC2*. Výběr kandidátních genů byl podložen i výsledky funkční analýzy, kde byly pozorovány nejvíce aktivní dráhy (signální dráha p53, cAMP signální dráha či WNT signální dráha) u chemorezistentních linií DLD–1 R160 vůči sensitivní DLD–1 WT.

Na základě validace byl potvrzen signifikantní trend genové exprese shodující se s výsledky analýzy transkriptomu DLD–1 rezistentních buněčných linií u genů *ABCC2*, *CD44* a *DKK1*. U genu *ALDH1L1* byl potvrzen trend genové exprese, ovšem p hodnota se pouze blížila signifikantní hranici 0,05. U genu *HIST1H2BE* byl nalezen opačný trend genové exprese oproti DLD–1 rezistentním buněčným liniím. Zároveň byl pozorován rozdíl v expresních hladinách celého transkriptomu s vyšší koncentrací 5–FU, zejména pak u DLD–1 R160. Rozdíl v genové expresi mezi pacienty s recidivou a bez recidivy byl pouze u genu *DKK1*, kde byla pozorována zvýšená hladina genu *DKK1* u pacientů bez recidivy.

Na základě statistické signifikantnosti výsledků exprese kandidátních genů, dostupné literatury, poznatků o EMT a současných výzkumů byl vybrán za nejrelevantnější marker chemorezistence gen *CD44*.

Antropologickým aspektem diplomové práce bylo poukázání na problematiku chemorezistence u pacientů s CRC a s tím spojenou vysokou mortalitou u těchto pacientů.

Dosud objevených markerů je celá řada a jejich počet se díky novým studiím stále zvyšuje. Je však nutné otestovat získaná data v klinických studiích a následně určit další postup, jak zefektivnit personalizovanou medicínu a přispět k zefektivnění léčby pacientů s chemorezistencí u tak závažného nádorového onemocnění, jako je CRC.

7. Seznam příloh

Příloha 1. Porovnání genové exprese mezi DLD-1 R40 a DLD-1 WT

gen	logFC	logCPM	LR	pořadí
<i>VIL1</i>	5,04	6,16	609,06	411.
<i>HIST1H2BE</i>	-4,84	7,01	481,79	3.
<i>MAGED1</i>	-4,66	6,72	453,28	9673.
<i>SELENBP1</i>	3,31	8,64	292,68	7736.
<i>CPT1A</i>	2,89	7,02	284,3	128.
<i>ATOH8</i>	4,65	5,85	260,5	1067.
<i>ALDH1L1</i>	-4,8	4,84	258,56	56.
<i>PHGR1</i>	8,16	3,42	252,94	712.
<i>RGS8</i>	8,01	2,35	202,74	4239.
<i>MYO15B</i>	2,7	6,66	189,34	9565.
<i>TMEM173</i>	2,69	5,49	158,84	571.
<i>GPA33</i>	5,95	4,04	154,04	1127.
<i>LGALS4</i>	4,44	3,22	151,9	4245.
<i>CCDC3</i>	-2,35	5,37	150,33	12264.
<i>IRF8</i>	4,19	2,29	142,92	13537.
<i>MAPKAPK2</i>	-2,02	6,55	142,62	2804.
<i>SLC2A3</i>	-2,8	4,6	142,34	488.
<i>CST1</i>	3,57	3,64	141,17	4220.
<i>CST7</i>	-2,68	5,27	140,73	64.
<i>RHOB</i>	-1,91	7,84	140,64	732.
<i>CD44</i>	2,53	8,61	139,66	50.
<i>TRPS1</i>	-4,18	3,1	137,92	272.
<i>TENM3</i>	-3,14	5,28	133,74	70.
<i>ABCG1</i>	4,09	3,42	133,22	806.
<i>CD177</i>	4,49	2,44	130,98	12691.
<i>SERPINA1</i>	2,99	4,43	130,17	2892.
<i>AHNAK2</i>	2,73	8,23	129,49	94.
<i>C15orf48</i>	4,96	2,29	128,43	7249.
<i>PDE4A</i>	2,99	5,46	128,24	47.
<i>DPEP1</i>	3,61	3,41	124,28	13507.
<i>CEACAM6</i>	6,56	3,24	122,26	1384.
<i>CCND2</i>	3,76	2,46	121,53	803.
<i>NOX1</i>	2,92	4,04	121,52	963.
<i>ESPN</i>	3,2	6,43	120,73	16.
<i>LFNG</i>	2,69	5,09	116,24	1581.

gen	logFC	logCPM	LR	pořadí
<i>ARSD</i>	1,77	5,98	115,7	12297.
<i>PRR15</i>	2,38	5,95	114,09	12602.
<i>NXN</i>	-1,87	7,52	113,48	2600.
<i>PKD1L1</i>	3,54	3,1	113,33	8683.
<i>SYT12</i>	-2,62	5,49	113,21	580.
<i>CKB</i>	2,43	7,98	110	17.
<i>CEACAM1</i>	4,59	3,4	109,97	1342.
<i>REG4</i>	4,58	2,44	109,72	12729.
<i>SCG5</i>	2,87	4,48	109,44	10854.
<i>ENTPD3</i>	-2,88	3,29	107,32	197.
<i>KLK4</i>	8,54	1,34	106,82	1883.
<i>BTG2</i>	1,97	5,43	105,94	446.
<i>TMEM139</i>	-2,97	3,95	104,58	1050.
<i>SCARA3</i>	-2	5,58	103,89	1211.

Příloha 2. Porovnání genové exprese mezi DLD-1 R160 a DLD-1 WT

gen	logFC	logCPM	LR	pořadí
<i>ISYNA1</i>	8,53	7,88	1035,72	8702.
<i>CYP24A1</i>	9,54	6,92	943,06	13609.
<i>HIST1H2BE</i>	-9,05	7,01	833,97	2.
<i>MSN</i>	9,39	6,56	818,51	5198.
<i>FLNC</i>	10,1	6,82	767,4	5356.
<i>NTSR1</i>	7,89	7,67	694,15	463.
<i>COL6A2</i>	10,37	6,89	676,92	3456.
<i>DKK1</i>	11,04	6,44	668,36	4176.
<i>COL6A1</i>	8,38	6,93	653,42	145.
<i>PTPRS</i>	6,1	7,39	641,24	4189.
<i>HIST1H2BH</i>	-5,66	8,18	636,12	128.
<i>DBN1</i>	7,02	6,83	613,89	4852.
<i>HBE1</i>	13,35	5,6	565,43	8411.
<i>CACNA1H</i>	9,38	5,91	551,98	14612.
<i>ESPN</i>	7,13	6,43	551,28	35.
<i>CKB</i>	5,92	7,98	513,34	42.
<i>ADIRF</i>	10,15	6,01	508,81	3138.
<i>AXL</i>	6,67	5,68	508,72	5971.
<i>DIRAS1</i>	10,19	5,08	485,3	13545.
<i>ARHGEF10</i>	8	5,03	475,65	2702.
<i>ABCC2</i>	6,5	5,72	458,76	13422.
<i>TRIB1</i>	3,97	8,31	445,41	12751.
<i>LGALS1</i>	6,33	7,19	443,73	10367.
<i>OLFM2</i>	8,15	4,85	438,73	8942.
<i>KCNH3</i>	8,18	5,87	438,63	10993.
<i>PALM</i>	8,95	5,27	434,85	309.
<i>ELFN2</i>	4,47	6,37	428,54	642.
<i>COL12A1</i>	9,98	4,88	423,27	14035.
<i>CHST15</i>	9,88	5,28	423,21	5430.
<i>FBXO2</i>	5,05	6,16	422,13	5479.
<i>TRIM72</i>	8,7	5,03	418,8	14834.
<i>NAVI</i>	5,34	5,51	418,51	206.
<i>SLC6A17</i>	12,37	4,6	417,34	5003.
<i>LTBP4</i>	4,56	7,13	414,25	238.
<i>AMOTL1</i>	8,87	4,94	413,28	13371.
<i>MRC2</i>	8,97	4,75	410,25	3267.

gen	logFC	logCPM	LR	pořadí
<i>FKBP10</i>	5,29	4,94	408,98	2279.
<i>NFATC1</i>	6,73	5,07	406,97	3685.
<i>DMKN</i>	10,6	4,69	403,53	7604.
<i>MSLN</i>	6,1	5,35	394,5	880.
<i>EHD2</i>	5,16	6,91	393,58	63.
<i>CSPG4</i>	7,91	5,89	393,13	8033.
<i>ALDH3A1</i>	-4,18	6,1	389,6	8306.
<i>DOC2B</i>	10,3	4,39	384,35	12458.
<i>KRT7</i>	5,48	6,59	383,76	661.
<i>PDE4A</i>	5,31	5,46	383,56	47.
<i>TUBB4A</i>	12,51	4,74	381,36	15324.
<i>FAM101B</i>	10,3	4,4	379,93	12447.
<i>CD44</i>	4,51	8,61	376,38	50.

8. Použitá literatura

Anh, V., E., Chu, M., L., Choi, H., et al. 2011. Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6. *Developmental Cell* [online]. 21(5), 862–873. ISSN 1878-1551. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2011.09.003

Aljohani, H., Khodier, A., E., Al-Gayyar, M. 2023. Antitumor Activity of Luteolin Against Ehrlich Solid Carcinoma in Rats via Blocking Wnt/ β -Catenin/SMAD4 Pathway. *Cureus* [online]. 15(5), e39789. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.39789

Andersen, V., Vogel, L., K., Kopp, T., I., et al. 2015. High ABCC2 and Low ABCG2 Gene Expression Are Early Events in the Colorectal Adenoma-Carcinoma Sequence. *PLoS ONE* [online]. 10(3), e0119255. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0119255

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., et al. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 68(6), 394–424. ISSN 1542-4863. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21492

Caldwell, Ch., Rottman, Ch., J., Paces, W., et al. 2021. Validation of a DKK1 RNAscope chromogenic in situ hybridization assay for gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma tumors. *Scientific Reports* [online]. 11, 9920. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-89060-3

Cao, S., Rustum, Y., M. 2000. Synergistic antitumor activity of irinotecan in combination with 5-fluorouracil in rats bearing advanced colorectal cancer: role of drug sequence and dose. *Cancer Research*. 60(14), 3717–3721. ISSN 0008-5472.

Cui, Y., Konig, J., Buchholz, J., K., et al. 1999. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Molecular Pharmacology*. 55(5), 929–937. ISSN 0026-895X.

Diasio, R., B. 1998. The role of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) modulation in 5-FU pharmacology. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 12(10 Suppl 7), 23–27. ISSN 0890-9091.

Dmitriev, A., A., Beniaminov, A., D., Melnikova, N., V., et al. 2020. [Functional Hypermethylation of ALDH1L1, PLCL2, and PPP2R3A in Colon Cancer]. *Molekuliarnaiia Biologiia* [online]. 54(2), 204–211. ISSN 0026-8984. Dostupné z: doi:10.1134/S002689842001005X

Filip, S., Vymetalkova, V., Petera, J., et al. 2020. Distant Metastasis in Colorectal Cancer Patients—Do We Have New Predicting Clinicopathological and Molecular Biomarkers? A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 21(15), 5255. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21155255

Global Cancer Observatory. 2022. Colorectal cancer statistics. *WCRF International* [online]. [vid. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/colorectal-cancer-statistics/>

Gonzalez, C., Clarke, D., P., Al-Lazikani, B., Workman, P. 2013. Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* [online]. 93(3), 252–259. ISSN 1532-6535. Dostupné z: doi:10.1038/clpt.2012.237

Gottesman, M., M., Fojo, T., Bates, S., E. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2(1), 48–58. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc706

Hanahan, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* [online]. 12(1), 31–46. ISSN 2159-8274. Dostupné z: doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Hay, E., D. 2005. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Developmental Dynamics* [online]. 233(3), 706–720. ISSN 1097-0177. Dostupné z: doi:10.1002/dvdy.20345

Heidelberger, Ch., Chaudhuri, N., K., Danneberg, P., Mooren, D., et al. 1957. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* [online]. 179(4561), 663–666. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/179663a0

Chandra, V., Lee, Y., M., Gupta, U., et al. 2016. Quantitative assessment of CD44 genetic variants and cancer susceptibility in Asians: a meta-analysis. *Oncotarget* [online]. 7(45), 74286–74302. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.10951

Chang, A. 2011. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer* [online]. 71(1), 3–10. ISSN 0169-5002. Dostupné z: doi:10.1016/j.lungcan.2010.08.022

Chiang, Ch., Ch., Yeh, H., Lim, S., N., et al. 2023. Transcriptome analysis creates a new era of precision medicine for managing recurrent hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 29(5), 780–799. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v29.i5.780

Imperiale, T., F., Ransohoff, D., F., et al. 2014. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *The New England Journal of Medicine* [online]. 370(14), 1287–1297. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1311194

Johnston, P., G., Kaye, S. 2001. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anti-Cancer Drugs* [online]. 12(8), 639–646. ISSN 0959-4973. Dostupné z: doi:10.1097/00001813-200109000-00001

Kalluri, R., Weinberg, R., A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 119(6), 1420–1428. ISSN 1558-8238. Dostupné z: doi:10.1172/JCI39104

Kari, V., Karpiuk, O., Tieg, B., et al. 2013. A Subset of Histone H2B Genes Produces Polyadenylated mRNAs under a Variety of Cellular Conditions. *PLoS ONE* [online]. 8(5), e63745. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0063745

Kohne, C., H., Peters, G., J. 2000. UFT: mechanism of drug action. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 14(10 Suppl 9), 13–18. ISSN 0890-9091.

Kral, J., Kojecky V., Stepan, M., et al. 2020. The experience with colorectal cancer screening in the Czech Republic: the detection at earlier stages and improved clinical outcomes. *Public Health* [online]. 185, 153–158. ISSN 0033-3506. Dostupné z: doi:10.1016/j.puhe.2020.05.021

Lamont, E., B., Schilsky, R., L. 1999. The oral fluoropyrimidines in cancer chemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 5(9), 2289–2296. ISSN 1078-0432.

Lugli, A., Zlobec, I., Berger, M., D., et al. 2021. Tumour budding in solid cancers. *Nature Reviews. Clinical Oncology* [online]. 18(2), 101–115. ISSN 1759-4782. Dostupné z: doi:10.1038/s41571-020-0422-y

Martino, M., R. 2002. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review. *The Oncologist* [online]. 7(4), 288–323. ISSN 1083-7159. Dostupné z: doi:10.1634/theoncologist.7-4-288

Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., et al. 2017. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. 7(3), 339–348. ISSN 2228-5881. Dostupné z: doi:10.15171/apb.2017.041

Matejka, V., M., Finek, J., Kralickova, M. 2017. Epithelial-mesenchymal Transition in Tumor Tissue and Its Role for Metastatic Spread of Cancer. *Klinická onkologie* [online]. 30(1), 20–27. ISSN 0862495X, 18025307. Dostupné z: doi:10.14735/amko201720

Misra, S., Hascall, V., C. Markwald, R., R., Ghatak, S. 2015. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Frontiers in Immunology* [online]. 6, 201. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00201

Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., et al. 2010. 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. *Cancers* [online]. 2(3), 1717–1730. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers2031717

Miyamoto, Y., Sakamoto, Y., Yoshida, N., Baba, H. 2014. Efficacy of S-1 in colorectal cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy* [online]. 15, 1761–1770. Dostupné z: doi:10.1517/14656566.2014.937706

Nakayama, I., Hirota, T., Shinozaki, E. 2020. BRAF Mutation in Colorectal Cancers: From Prognostic Marker to Targetable Mutation. *Cancers* [online]. 12(11), 3236. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12113236

Nayak, S., R., Harrington, E., Boone, D., et al. 2015. A Role for Histone H2B Variants in Endocrine-Resistant Breast Cancer. *Hormones & Cancer* [online]. 6(5–6), 214–224. ISSN 1868-8497. Dostupné z: doi:10.1007/s12672-015-0230-5

Niederst, M., J., Hu, H., Mulvey, H., et al. 2015. The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* [online]. 21(17), 3924–3933. ISSN 1557-3265. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0560

Oki, E., Ando, E., Nakanishi, R., et al. 2018. Recent advances in treatment for colorectal liver metastasis. *Annals of Gastroenterological Surgery* [online]. 2(3), 167–175. ISSN 2475-0328. Dostupné z: doi:10.1002/ags3.12071

Peeters, M., Cervantes, A., Vera, S., Taieb, J. 2018. Trifluridine/tipiracil: An emerging strategy for the management of gastrointestinal cancers. *Future Oncology* [online]. 14. Dostupné z: doi:10.2217/fon-2018-0147

Qu, Y., He, Y., Ruan, H., et al. 2022. Abnormal downregulation of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase promotes the progression of oral squamous cell carcinoma by activating PI3K/Akt/Rb pathway. *Cancer Medicine* [online]. 12(5), 5781–5797. ISSN 2045-7634. Dostupné z: doi:10.1002/cam4.5327

Rajput, A., Dominguez, I., Rose, R., et al. 2008. Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model. *The Journal of Surgical Research* [online]. 147(2), 276–281. ISSN 0022-4804. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2007.04.021

Ricci, L., Lombardi, D., G., Pillozzi, E., et al. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* [online]. 445(7123), 111–115. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature05384

Rutman, R., J., Cantarow, A., Paschkis, E., K. 1954. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer Research*. 14(2), 119–123. ISSN 0008-5472.

Seely, K., D., Morgan, A., D., Hagenstein, L., D., et al. 2022. Bacterial Involvement in Progression and Metastasis of Colorectal Neoplasia. *Cancers* [online]. 14(4), 1019. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14041019

Schilsky, R., L., Kindler, H., L. 2000. Eniluracil: an irreversible inhibitor of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Expert Opinion on Investigational Drugs* [online]. 9(7), 1635–1649. ISSN 1354-3784. Dostupné z: doi:10.1517/13543784.9.7.1635

Schuller, J., Cassidy, J., Dumont, E., et al. 2000. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 45(4), 291–297. ISSN 0344-5704. Dostupné z: doi:10.1007/s002800050043

Siegel, R., L., Miller, K., D., Goding Saure, A., et al. 2020. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 70(3), 145–164. ISSN 1542-4863. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21601

Sobin, L., H., Wittekind, Ch. 2002. *TNM Klasifikace zhoubných novotvarů* [online]. B.m.: Wiley-Liss. Dostupné z: https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/tnm6_cz.pdf

Song, L., Li, Y. 2015. SEPT9: A Specific Circulating Biomarker for Colorectal Cancer. *Advances in Clinical Chemistry* [online]. 72, 171–204. ISSN 0065-2423. Dostupné z: doi:10.1016/bs.acc.2015.07.004

Svoboda, M., Slaby, M. 2004. Individualizace farmakoterapie inhibitory tymidylát syntázy u nádorů gastrointestinálního traktu [online]. [vid. 2023-08-20]. ISSN 1212-7973. Dostupné z: <https://www.med.muni.cz/veda-a-vyzkum/veda-a-vyzkum/publikacni-cinnost/publikace-1f-mu/569446>

Tanaka, S., Kobayashi, W., Haraguchi, M., et al. 2016. Snail1 expression in human colon cancer DLD-1 cells confers invasive properties without N-cadherin expression. *Biochemistry and Biophysics Reports* [online]. 8, 120–126. ISSN 2405-5808. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrep.2016.08.017

Toide, H., Akiyoshi, H., Minato, Y., et al. 1977. Comparative studies on the metabolism of 2-(tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil and 5-fluorouracil. *Gan.* 68(5), 553–560. ISSN 0016-450X.

Tournigand, Ch., Andre, T., Achille, E., et al. 2004. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* [online]. 22(2), 229–237. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2004.05.113

Venderosch, S., Nagtegaal, I., D., Maughan, T., S., et al. 2014. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* [online]. 20(20), 5322–5330. ISSN 1557-3265. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0332

Vertessy, B., G., Toth, J. 2009. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Accounts of Chemical Research* [online]. 42(1), 97–106. ISSN 1520-4898. Dostupné z: doi:10.1021/ar800114w

Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., et al. 2020. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 206, 107447. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2019.107447

Wang, S., Wang, L., Zhou, Z., et al. 2017. Leucovorin Enhances the Anti-cancer Effect of Bortezomib in Colorectal Cancer Cells. *Scientific Reports* [online]. 7, 682. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-00839-9

Wang, T., Wang, L., Qian, X., et al. 2011. Relationship between gene expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes and 5-fluorouracil sensitivity in primary cancer cells isolated from malignant ascites. *Cancer Investigation* [online]. 29(2), 130–136. ISSN 1532-4192. Dostupné z: doi:10.3109/07357907.2010.535060

Wang, Z., Tang, Y., Xie, L., et al. 2019. The Prognostic and Clinical Value of CD44 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology* [online]. 9, 309. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2019.00309

Xu, H., Tian, Y., Yuan, X., et al. 2015. The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development. *OncoTargets and Therapy* [online]. 8, 3783–3792. ISSN 1178-6930. Dostupné z: doi:10.2147/OTT.S95470

Zarour, L., R., Anand, S., Billingsley, K., G., et al. 2017. Colorectal Cancer Liver Metastasis: Evolving Paradigms and Future Directions. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* [online]. 3(2), 163–173. ISSN 2352-345X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcmgh.2017.01.006

Zeman, M., et al. 2006. *Speciální chirurgie*. 2. vydání. Praha: Galén. ISBN 80-7262-260-9.

Zhu, G., Song, J., Chen, W., Yuan, D., Wang, W., Chen, X., Liu, H., Su, H., Zhu, J. 2021. Expression and Role of Dickkopf-1 (Dkk1) in Tumors: From the Cells to the Patients. *Cancer Management and Research* [online]. 13, 659–675. ISSN 1179-1322. Dostupné z: doi:10.2147/CMAR.S275172