

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Ela Cerovská

Biomarkery prognózy a účinnosti terapie ovariálního karcinomu
Biomarkers of prognosis and therapy efficacy in ovarian carcinoma

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.8.2016

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc., za odborné vedení mé práce, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Elsnerové, Mgr. Viktoru Hlaváčovi, Mgr. Radce Václavíkové, Ph.D. a celému kolektivu Oddělení toxikogenomiky SZÚ za věnovaný čas při zasvěcování do laboratorních metod, cenné rady a vytvoření přátelského prostředí. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině za nekonečnou podporu v průběhu studia.

Tato práce vznikla za podpory grantového projektu AZV č. 15-25884A.

Abstrakt

Ovariální karcinom je závažné nádorové onemocnění s nejvyšší mortalitou mezi gynekologickými malignitami. Doposud nejsou k dispozici optimální metody včasné diagnostiky, určení prognózy ani predikce účinnosti terapie, což vede k odhalení nemoci v pokročilých stadiích a ke značnému omezení účinnosti léčby. Velkým problémem při léčbě pacientek je také vznik rezistence ke konvenčním léčivům a častý návrat onemocnění. Hlavním cílem předkládané práce byla identifikace nových potenciálních prognostických a terapeutických biomarkerů, jejichž zavedení do klinické praxe by mohlo pomoci zlepšit terapeutický přístup k ovariálnímu karcinomu. Diplomová práce poskytuje výsledky analýzy exprese genů, jejichž proteiny se účastní transportu, metabolismu a mechanismu působení platinových derivátů a taxanů, dále regulace buněčného cyklu a signalizace. Hladina exprese byla měřená na úrovni transkriptu v nádorové a kontrolní ovariální tkáni, kde byly vyhodnoceny rozdíly. Expres v nádorech byla dále porovnána s klinickými daty pacientek a ze získaných výsledků byly vybrány kandidátní geny, *ABCA2* a *PRCI*, pro další analýzy. U kandidátních genů bylo stanoveno množství proteinu v nádorové a kontrolní tkáni a byla provedena genotypizační analýza vybraných dědičných jednonukleotidových polymorfizmů v DNA z periferní krve pacientek. Množství proteinu v nádorech a výskyt jednotlivých alel polymorfizmů byl následně srovnán s klinickými daty pacientek. V rámci diplomové práce byly identifikovány nové potenciální biomarkery prognózy a účinnosti terapie ovariálního karcinomu, jak na úrovni hladiny transkriptu v nádorové tkáni, tak (a to především) v oblasti výskytu určitých alel polymorfizmů detekovatelných v DNA periferní krve pacientek. Získané výsledky mohou sloužit jako podklad pro další studie směřující k posouzení možnosti zavedení nalezených biomarkerů do klinické praxe.

Klíčová slova:

ovariální karcinom, biomarker, platinové deriváty, taxany, chemorezistence, prognóza

Abstract

Ovarian carcinoma is a serious illness with the highest mortality rate among all female cancers. No suitable methods for early diagnosis, precise determination of prognosis or prediction of therapy efficacy are currently available, which leads to diagnosis in advanced stages of disease and therapy efficacy limitation. Consequently, the development of chemoresistance to conventional drugs and frequent relapse of the disease pose a fundamental complication too. The main goal of the current study was identification of new putative prognostic and therapeutic biomarkers, whose introduction into clinical practice could help to improve the dismal outcome of ovarian carcinoma patients. The present master thesis provides results of expression analysis of genes whose products take part in the transport, metabolism and mechanism of action of platinum based drugs and taxanes, and also the regulation of cell cycle and signaling. Transcript levels of these genes have been assessed in series of tumor and control ovarian tissue samples and the difference between both tissue types was evaluated. Gene expression level in tumors was then compared with patient's clinical data, and candidate genes, *ABCA2* and *PRCI*, were selected from the obtained results for more detailed analysis. The protein level of candidate genes was determined in tumor and control tissues and genotyping analysis of selected inherited single nucleotide polymorphisms was performed in DNA from peripheral blood. The protein level in tumors and carriage of rare alleles was then compared with patient's clinical data. In conclusion, this master thesis revealed new putative prognostic and predictive biomarkers for ovarian carcinoma among transcripts and genetic alterations of the above candidate genes. Obtained results may serve as leads for subsequent studies aimed at validation and assessment of the clinical utility of these markers.

Keywords:

ovarian carcinoma, biomarker, platinum derivatives, taxanes, chemoresistance, prognosis

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam zkratk | 8 |
| 1 Úvod | 11 |
| 2 Přehled literatury | 12 |
| 2.1 Ovariální karcinom | 12 |
| 2.1.1 Klasifikace ovariálního karcinomu | 13 |
| 2.1.2 Včasná diagnostika a preventivní skrínink | 17 |
| 2.1.3 Genetické pozadí tumorigeneze ovariálního karcinomu | 18 |
| 2.1.4 Terapie ovariálního karcinomu a chemorezistence | 19 |
| 2.2 Platinové deriváty a taxany | 22 |
| 2.2.1 Transport přes buněčné membrány | 23 |
| 2.2.1.1 ABC transportéry a chemorezistence | 23 |
| 2.2.1.2 SLC transportéry a chemorezistence | 27 |
| 2.2.1.3 Měď transportující ATPázy a chemorezistence | 28 |
| 2.2.2 Mechanismus působení platinových derivátů | 28 |
| 2.2.2.1 MMR systém | 30 |
| 2.2.3 Mechanismus působení taxanů | 31 |
| 2.2.3.1 Regulátor cytokineze a polo-like kináza | 32 |
| 2.2.4 Metabolismus a detoxikace platinových derivátů a taxanů | 34 |
| 2.2.4.1 Jaderné receptory | 35 |
| 2.2.4.2 Chaperony | 38 |
| 2.2.5 Proteiny signálních drah ovlivňujících prognózu | 39 |
| 3 Cíle práce | 41 |
| 4 Materiál a metody | 42 |
| 4.1 Příprava biologického materiálu | 45 |
| 4.1.1 Odběr materiálu, informovaný souhlas pacientek, klinická data | 45 |
| 4.1.2 Drcení tkáně, izolace RNA a proteinu | 45 |
| 4.1.3 Izolace DNA ze zmražené periferní krve | 48 |
| 4.1.4 Měření koncentrace RNA | 49 |
| 4.1.5 Měření koncentrace DNA | 50 |
| 4.1.6 Měření koncentrace proteinu | 51 |
| 4.1.7 Kontrola kvality RNA | 51 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.1.8 | Syntéza cDNA | 53 |
| 4.1.8.1 | Kontrola kontaminace a kvality cDNA | 54 |
| 4.2 | Studie genové exprese..... | 57 |
| 4.2.1 | Seznam studovaných genů | 60 |
| 4.2.2 | Statistické vyhodnocení studie genové exprese..... | 63 |
| 4.3 | Sledování hladin proteinu v cílové tkáni..... | 64 |
| 4.3.1 | Protein PRC1 | 65 |
| 4.3.2 | Protein ABCA2..... | 69 |
| 4.3.3 | Statistické vyhodnocení studie hladiny proteinu | 72 |
| 4.4 | Studie genetické variability vybraných genů | 72 |
| 4.4.1 | Alelická diskriminace..... | 74 |
| 4.4.2 | Vysokorozlišující analýza křivek tání..... | 76 |
| 4.4.3 | Vyhodnocení genotypizační studie | 78 |
| 5 | Výsledky | 80 |
| 5.1 | Studie genové exprese..... | 80 |
| 5.1.1 | Srovnání expresní hladiny mezi tumory a kontrolními tkáněmi | 80 |
| 5.1.2 | Srovnání expresní hladiny v nádorové tkáni s klinickými daty..... | 84 |
| 5.2 | Sledování hladin proteinu v cílové tkáni..... | 89 |
| 5.2.1 | Protein PRC1 | 89 |
| 5.2.1.1 | Srovnání hladiny PRC1 mezi tumory a kontrolními tkáněmi, porovnání s hladinou transkriptu | 91 |
| 5.2.1.2 | Srovnání hladiny PRC1 v nádorech s klinickými daty..... | 91 |
| 5.2.2 | Protein ABCA2..... | 91 |
| 5.3 | Studie genetické variability kandidátních genů..... | 92 |
| 5.3.1 | Alelická diskriminace..... | 92 |
| 5.3.2 | Vysokorozlišovací analýza křivek tání | 94 |
| 5.3.3 | Srovnání genotypů vybraných polymorfizmů s klinickými daty | 96 |
| 5.3.4 | Haplotypová analýza studovaných <i>ABCA2</i> polymorfizmů | 102 |
| 5.3.5 | <i>In silico</i> predikce funkčního významu polymorfizmů a srovnání genotypů s hladinou exprese..... | 103 |
| 6 | Diskuze | 104 |
| 6.1 | Studie genové exprese..... | 104 |
| 6.1.1 | Geny transportních proteinů | 105 |
| 6.1.2 | Geny regulačních proteinů buněčného cyklu | 109 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 6.1.3 | Geny proteinů signálních drah..... | 110 |
| 6.1.4 | Geny proteinů buněčného metabolismu a reparačních proteinů | 110 |
| 6.2 | Sledování hladin proteinu v cílové tkáni..... | 112 |
| 6.3 | Studie genetické variability kandidátních genů..... | 113 |
| 7 | Souhrn..... | 116 |
| 8 | Seznam použité literatury | 118 |
| | Příloha I | i |
| | Příloha II | iv |

Seznam zkratek

| | | |
|----------------|---|--|
| ABC | ATP-binding cassette | ATP vazebná kazeta |
| AD | alelic discrimination | alelická diskriminace |
| AKT | rac protein kinase α | rac protein kináza α |
| APC | anaphase promoting complex | komplex spouštící anafázi |
| APS | ammonium persulfate | persíran amonný |
| ATOX1 | antioxidant protein 1 | antioxidační protein 1 |
| BAX | BCL-2 associated X protein | protein X asociovaný s BCL-2 |
| BCA | bicinchoninic acid | kyselina bicinchoninová |
| <i>BCL-2</i> | B-cell lymphoma 2 | gen lymfomu B buněk 2 |
| B-H | Benjamini-Hochberg | - |
| bp | base pairs | páry bazí |
| <i>BRAF</i> | V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 | homolog B1 V-Raf virového onkogenu můřího sarkomu |
| <i>BRCA1/2</i> | breast cancer 1/2 | geny dědičné formy tumoru prsu |
| BSA | bovine serum albumin | hovězí sérový albumin |
| CA-125 | cancer antigen 125 | nádorový antigen 125 |
| CAR | constitutive androstane receptor | konstitutivní androstanový receptor |
| cDNA | complementary DNA | komplementární DNA |
| CI | confidence interval | konfidenční interval |
| Cq | quantification cycle, also known as Ct (treshold cycle) | kvantifikační cyklus, při kterém fluorescence vzroste nad prahovou hodnotu |
| ECL | enhanced chemiluminescent method | metoda zesílené chemiluminescence |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| ER | estrogen receptor | estrogenní receptor |
| ERE | estrogen responsive element | estrogen responzivní element |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase | kináza regulovaná extracelulárními signály |
| FDR | false discovery rate | míra odhalení chybovosti |
| FIGO | International federation of gynecology and obstetrics | Mezinárodní gynekologická a porodnická federace |
| FXR | farnesoid X receptor | farnesoidní receptor X |
| HE4 | human epididymis protein-4 | lidský protein nadvarlat 4 |
| HGSC | high-grade serous carcinoma | serózní karcinom s vysokým stupněm dediferenciace |

| | | |
|--------------------|--|---|
| HIF1 α | hypoxia inducible factor 1 α | hypoxií indukovaný faktor α |
| HRM | high resolution metling | vysokorozlišující analýza křivek tání |
| HSP-70/90 | heat shock protein 70/90 | chaperon HSP-70/90 |
| <i>KRAS</i> | Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog | homolog virového onkogenu krysího sarkomu Kirsten |
| LGSC | low grade serous carcinoma | dobře diferencovaný serózní karcinom |
| LXR α/β | liver X receptor α/β | játerní receptor X α/β |
| MAP | mitogen activated kinase | kináza aktivovaná mitogeny |
| MDR1 | multidrug resistance protein 1 | protein mnohočetné lékové rezistence 1 |
| MMR | mismatch repair | oprava nevhodných spojení |
| MMR | mismatch repair | opravný systém špatného párování bazí |
| mRNA | messenger RNA | mediátorová RNA |
| NBD | nucleotide binding domain | nukleotid vazebná doména |
| NFW | nuclease-free water | voda bez přítomnosti nukleáz |
| NIR | near-infrared detection | detekce v blízké infračervené oblasti |
| ND | not determined | nedeterminovaný |
| NR | nuclear receptor | jaderný receptor |
| NS | non significant | nesignifikantní |
| OBB | Odyssey blocking buffer | Odyssey blokovací pufr |
| PAGE | polyacrylamide gel electrophoresis | polyakrylamidová gelová elektroforéza |
| PBS | phosphate-buffered saline | solný roztok pufovaný fosfátem |
| PBST | PBS + Tween [®] 20 | - |
| PCR | polymerase chain reaction | polymerázová řetězová reakce |
| PKC | protein kinase C | protein kináza C |
| PMS1/2 | postmeiotic segregation increased 1 | protein postmeiotické segregace 1 |
| <i>PTEN</i> | phosphatase and tensin homolog | homolog fosfatázy a tensinu |
| PVDF | polyvinylidene fluoride | polyvinyliden fluorid |
| PXR | pregane X receptor | receptor pregnanu X |
| qPCR | quantitative PCR | kvantitativní PCR |
| <i>RCCD1</i> | RCC domain containing 1 | gen 1 obsahující doménu RCC |
| RIN | RNA integrity number | hodnota integrity RNA |
| ROMA | risk of ovarian malignancy algorithm | algoritmus rizika ovariálních malignit |

| | | |
|-------|---|---|
| RT | room temperature | pokožová teplota |
| RXR | retinoid X receptor | retinoidní receptor X |
| SAC | spindle assembly checkpoint | kontrolní bod utvoření dělicího vřeténka |
| SDS | sodium dodecyl sulfate | dodecylsírán sodný |
| SERM | selective estrogen receptor modulator | selektivní modulátor estrogenových receptorů |
| SHP | small heterodimer partner | malý heterodimerní partner |
| SLB | sample loading buffer | pufr pro nanášení vzorků |
| SLC | solute carrier transporter | transportér rozpuštěných látek |
| SNP | single nucleotide polymorphism | jednonukleotidový polymorfismus |
| STAT | signal transducer and activator of transcription | signální transduktor a aktivátor transkripce |
| TBE | tris-borate-EDTA (buffer) | tris-borát-EDTA (pufr) |
| TBS | tris-buffered saline | solný roztok pufrovaný pomocí tris |
| TBST | TBS + Tween [®] 20 | - |
| TE | tris-EDTA (buffer) | tris-EDTA (pufr) |
| TRAP1 | TNF receptor associated protein 1 | protein 1 asociovaný s TNF receptorem |
| Tris | tris(hydroxymethyle)aminomethane | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TTP | time to progression | doba do progrese, relapsu, nebo úmrtí |
| VDR | vitamin D ₃ receptor | receptor vitamínu D ₃ |
| VEGF | vascular endothelial growth factor | vaskulární endoteliální růstový faktor |
| ZN | malignant neoplasm | zhoubný novotvar |

1 Úvod

Ovariální karcinomy jsou nejčastějším typem maligních nádorů vaječníků. Ačkoliv mají nejnižší incidenci, jedná se o onemocnění s nejvyšší mortalitou mezi majoritními gynekologickými malignitami, a je tedy považováno za nejnebezpečnější. Velkým problémem ovariálního karcinomu je pozdní nástup nespecifických příznaků a nedostatek spolehlivých diagnostických markerů, což je důvodem diagnózy až v pokročilých stadiích nemoci, kdy jsou možnosti a účinnost léčby značně omezeny. Komplikací je také heterogenita ovariálních karcinomů, které mají původ v různých buněčných typech a mohou se mezi sebou zásadně lišit způsobem vzniku, reakcí na léčbu nebo prognózou.

Neopomenutelným důvodem vysoké mortality ovariálního karcinomu je častý vznik rezistence ke konvenční léčbě chemoterapeutiky, která jsou standardně aplikována po chirurgickém odstranění nádoru. Ačkoliv je míra reakce pacientek na první linii léčby na bázi platinových derivátů a taxanů poměrně dobrá, ve většině případů se dříve nebo později chemorezistence rozvine. Doposud bohužel nebyly identifikovány vhodné prognostické a terapeutické markery predikující agresivitu nádoru a jeho citlivost k léčivům. Vhodnými kandidáty pro tyto markery mohou být geny, respektive jejich deregulace, mutace nebo varianty, kódující proteiny účastnící se transportu, metabolismu nebo působení využívaných léčiv, ale také geny proteinů signální transdukce nebo regulace proliferace.

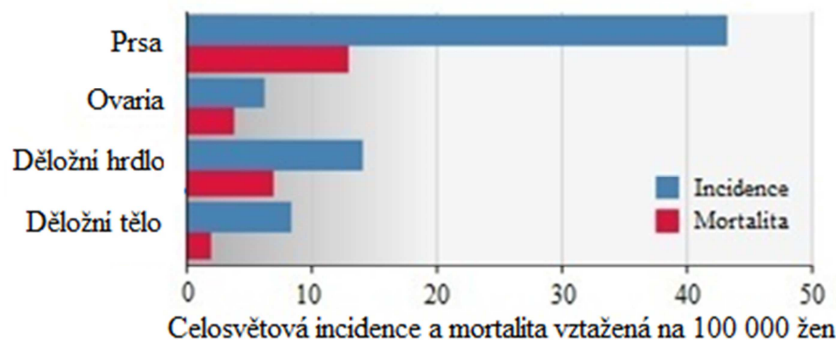
Předmětem předkládané práce je studium těchto genetických faktorů s cílem identifikovat potenciální nové biomarkery prognózy a účinnosti terapie ovariálního karcinomu, které by lékařům umožnily přesněji predikovat postup onemocnění a případně zvážit další možnosti léčby vhodné pro konkrétní pacientky.

2 Přehled literatury

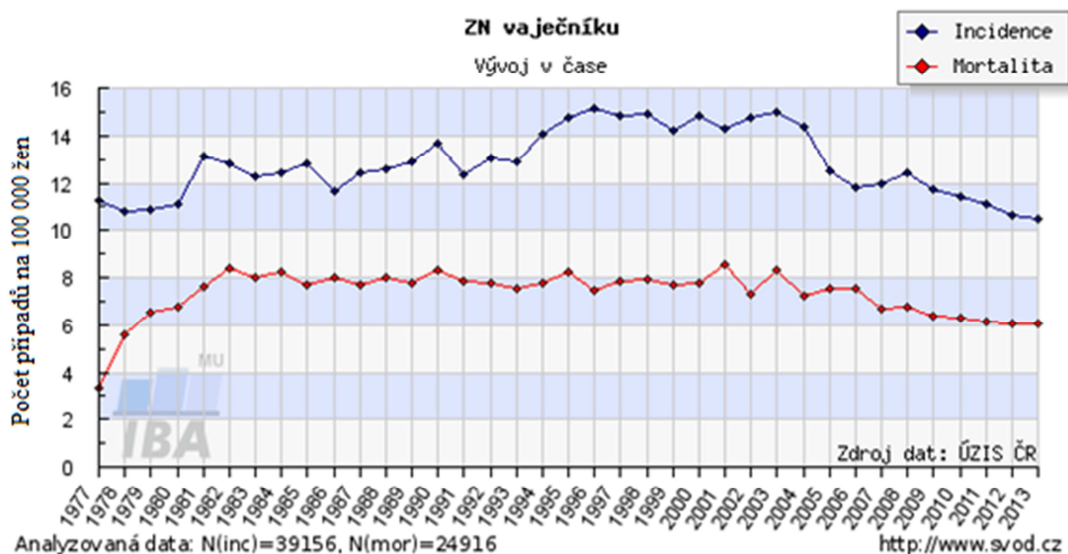
2.1 Ovariální karcinom

Ovariální karcinom je zhoubné nádorové onemocnění vznikající z povrchového epitelu ovaria. Jedná se o nejčastější typ zhoubného nádoru ovarií, který zaujímá přibližně 90 % všech maligních onemocnění vaječníku. Dalšími typy zhoubných nádorů jsou tumory vznikající z germinálních buněk, které jsou nejčastěji se vyskytujícími zhoubnými nádory vaječníku u pacientek mladších 45 let (celkově však zaujímají necelá 3 % ovariálních malignit), a nádory ze zárodečných pruhů a stromatu (Yancik, 1993).

Ačkoliv ovariální karcinom nepatří mezi nejčastěji se vyskytující zhoubné nádory a má nejnižší incidenci mezi ostatními hlavními ženskými malignitami (prsa, děložní hrdlo a děložní tělo), závažnost tohoto onemocnění vyžaduje zvýšenou pozornost, jelikož svou mortalitou převyšuje ostatní gynekologické tumory, viz Obr. 1 (GLOBOCAN 2012, URL1). Hrubá incidence (počet nových případů na 100 000 osob, v tomto případě žen) ovariálních zhoubných novotvarů byla v České republice v roce 2011 více než 6x menší než u maligních novotvarů prsu (20,2 vs. 123,9 případů), které jsou nejčastějším nádorem u žen. Úmrtnost v tomtéž roce byla však u tumorů ovarií ve vztahu k incidenci výrazně vyšší (62,7 % vs. 26,1 %) (ÚZIS ČR, URL2). Vysoká mortalita může být připisována tomu, že je karcinom ovarií oproti ostatním gynekologickým malignitám kvůli svým nespecifickým symptomům, které se objevují až při pokročilém stadiu onemocnění, většinou diagnostikován až ve stadiu III nebo IV, což značně ovlivňuje možnosti léčby a prognózu. Celosvětově je incidence nejvyšší v Evropě a Severní Americe (GLOBOCAN 2012, URL3), v České republice v posledních letech incidence mírně klesá, avšak mortalita s ní neustále koreluje, viz Obr. 2 (SVOD, URL4). Dle databáze Světové zdravotnické organizace je Česká republika s hrubou mortalitou (počet úmrtí na 100 000 osob, v tomto případě žen) na předních příčkách v celosvětové úmrtnosti způsobené tímto onemocněním (<http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>).



Obr. 1: Předpokládaná celosvětová incidence a mortalita nejčastěji se vyskytujících gynekologických malignit pro rok 2012. Graf znázorňuje celosvětovou incidenci a mortalitu přepočtenou na celosvětový věkový standard na 100 000 žen. Nejnižší incidenci, avšak nejvyšší mortalitu, mají zhoubné nádory ovarií. Převzato a upraveno dle GLOBOCAN 2012, URL1.



Obr. 2: Časový vývoj hrubé incidence a mortality zhoubných novotvarů (ZN) ovarií v České republice. Graf znázorňuje incidenci a mortalitu přepočtenou na věkový standard na 100 000 žen. Převzato ze SVOD, URL4.

2.1.1 Klasifikace ovariálního karcinomu

Klasifikace nádorů je velmi důležitá k získání co nejpřesnějších informací o konkrétním onemocnění. Umožňuje lékařům zvolit nejefektivnější léčbu pro daného pacienta, poskytnout určité údaje o prognóze a dalším vývoji onemocnění, napomáhá hodnocení léčebných výsledků a v neposlední řadě také usnadňuje výměnu informací mezi léčebnými centry.

U tumoru se hodnotí jeho histopatologický typ, tedy buněčný původ, dále stupeň diferenciaci neboli grade, stadium a často i exprese proliferativního markeru Ki67.

Dle nejnovější klasifikace tumorů ženských reprodukčních orgánů od Světové zdravotnické organizace (Kurman *et al.*, 2014; citováno podle Berek *et al.*, 2015) se karcinom ovarií podle svého buněčného původu rozděluje do následujících základních kategorií:

- Serózní zhoubné tumory
- Endometroidní zhoubné tumory
- Světlobuněčné zhoubné tumory
- Mucinózní zhoubné tumory
- Brennerovy zhoubné tumory
- Nediferencované zhoubné tumory
- Smíšené zhoubné tumory

Nejčastějším histologickým typem karcinomu ovarií je serózní karcinom, který zaujímá přibližně 70 % všech epiteliálních tumorů a ve většině případů je diagnostikován až v pokročilých stadiích onemocnění. Tento typ nádoru často vykazuje nukleární atypičnost a má vysokou frekvenci mitóz. Na druhém místě v četnosti jsou endometroidní tumory, které tvoří cca 10–20 % a více jak 50 % z nich je diagnostikováno v časných stadiích. Tyto tumory nevykazují výraznou nukleární atypičnost. Přibližně 10 % ovariálních karcinomů tvoří světlobuněčné tumory, které mají v porovnání se serózními horší prognózu (Sugiyama *et al.*, 2000) a spolu s endometroidními nádory jsou asociované s endometriózou (Ness, 2003). Mucinózní tumory zaujímají < 3 % a Brennerovy necelé 1 % všech ovariálních karcinomů (shrnutí v Cho a Shih, 2009).

Tumory řadící se mezi nediferencované mají epiteliální původ, avšak nejsou natolik diferencované, aby bylo možné je zařadit do specifitější kategorie. Smíšené tumory mají naopak buňky diferencované, avšak obsahují 2 nebo více z 5 základních buněčných typů ovariálního karcinomu (Kurman *et al.*, 2014; citováno podle Berek *et al.*, 2015).

Karcinomy ovarií jsou dále subklasifikovány histologickým určením jejich stupně diferenciaci neboli gradu, který koreluje s prognózou. U ovariálních malignit jsou uplatňovány 2 systémy určování gradu, jeden pro serózní karcinomy a druhý pro ostatní typy karcinomů. U serózních karcinomů se grade určuje podle tzv. dvoustupňového systému, kde se tumory dělí na dobře a málo diferencované, respektive „low-grade“ (LGSC) a „high-grade“ (HGSC) serózní karcinomy. Oproti FIGO (International federation of gynecology and obstetrics) třístupňovému systému, který se dnes používá k určování gradu

u nesorózních typů karcinomů ovarií, je dvoustupňový systém založen na přesně definovaných kritériích, kterými se při kategorizaci nádorů lze snadno řídit. Tento systém obsahuje pouze 2 diagnostické skupiny, je tedy i lépe reprodukovatelný. Klasifikace spočívá v míře jaderné atypičnosti a jako sekundární kritérium se používá mitotická frekvence měřená v počtu mitotických buněk viditelných v mikroskopu po nastavení maximálního zvětšení objektivu, což v publikacích reprezentuje zvětšení 400x. LGSC se vyznačují mírnými jadernými změnami a obvykle mají nižší frekvenci mitóz. HGSC mají vysokou nukleární atypičnost s výskytem mnohojaderných buněk a výrazně zvýšenou frekvenci mitóz (Malpica *et al.*, 2004). Oba typy karcinomů jsou velmi odlišné, dobře diferencované nádory mají lepší prognózu než málo diferencované nádory a vyžadují tudíž odlišný klinický přístup (Chen *et al.*, 2014a).

Dvoustupňová klasifikace gradu téměř odpovídá FIGO třístupňovému systému, LGSC odpovídají stupni G1 a HGSC stupni G2 a G3 (Bodurka *et al.*, 2012). Tato klasifikace se používá pro určování gradu u nesorózních karcinomů ovarií. Hlavním kritériem určení gradu dle FIGO systému je architektura rostoucí tkáně, avšak s možností zvýšit hodnotu gradu o 1 kategorii v přítomnosti výrazné nukleární atypičnosti (Denny *et al.*, 2012). Kategorie G1 zahrnuje tumory s dobře diferencovanými buňkami, G2 s částečně diferencovanými buňkami a G3 s málo diferencovanými buňkami. Podobná kritéria hodnocení využívá také Shimizu-Silverberg systém, který se však v dnešní době k hodnocení gradu u ovariálního karcinomu příliš nevyužívá, u jiných tumorů je však stále uplatňován. Nádory s málo diferencovanými buňkami mají obecně horší prognózu, než nádory dobře diferencované (Shimizu *et al.*, 1998).

K popisu anatomického rozsahu onemocnění neboli stadia je nejčastěji používanou klasifikací pro karcinom ovarií FIGO a TNM klasifikace, které si navzájem odpovídají. TNM systém je založen na hodnocení 3 složek, T (rozsah primárního nádoru), N (nepřítomnost či přítomnost a rozsah metastáz v regionálních mízních uzlinách) a M (nepřítomnost či přítomnost vzdálených metastáz). Jejich hodnocení je uvedeno v Tab. 1. Po vyhodnocení TNM klasifikace je možné určit FIGO stadium. Společná kritéria pro FIGO a TNM systémy jsou uvedena v Tab. 2. Správné určení stadia má značný prognostický význam, jelikož se vzrůstajícím stadiem pravděpodobnost pětiletého přežití prudce klesá. U pacientek se stadiem I může být pravděpodobnost přežití 5 let od diagnózy až 84 %, avšak u stadia IV pouze 7 % (Vlasák *et al.*, 2014).

| | | |
|-----------------------------|-------|--|
| T – Primární nádor | TX | primární nádor nelze hodnotit |
| | T0 | bez známek primárního nádoru |
| | T1–T4 | primární nádor a jeho zvětšující se velikost/místní rozsah |
| N – Regionální mízní uzliny | NX | regionální mízní uzliny nelze hodnotit |
| | N0 | regionální mízní uzliny bez metastáz |
| | N1 | metastázy v regionálních mízních uzlinách |
| M – Vzdálené metastázy | MX | vzdálené metastázy nelze hodnotit |
| | M0 | bez vzdálených metastáz |
| | M1 | vzdálené metastázy |

Tab. 1: Kritéria pro TNM klasifikaci zhoubných novotvarů ovaríí. Převzato a upraveno dle Sobin *et al.*, 2009.

| TNM | Nádor ovaria | Stadium |
|------------------------|---|---------|
| T1 N0 M0 | omezen na vaječníc(y) | I |
| T1a N0 M0 | jeden vaječníc, pouzdro intaktní | IA |
| T1b N0 M0 | oba vaječníc, pouzdro intaktní | IB |
| T1c N0 M0 | ruptura pouzdra, maligní buňky v ascitu nebo peritoneálním výplachu | IC |
| T2 N0 M0 | šíření v pánvi | II |
| T2a N0 M0 | děloha, vejcovod(y) | IIA |
| T2b N0 M0 | jiné pánevní tkáň | IIB |
| T2c N0 M0 | 2a nebo 2b, maligní buňky v ascitu nebo peritoneálním výplachu | IIC |
| T3 N0 M0/ T* N1 M0 | peritoneální metastázy mimo pánev a/nebo metastázy v regionálních mízních uzlinách | III |
| T3a N0 M0 | mikroskopické peritoneální metastázy | IIIA |
| T3b N0 M0 | makroskopické peritoneální metastázy ≥ 2 cm | IIIB |
| T3c N0 M0/ T* N1 M0 | peritoneální metastáza(y) > 2 cm a/nebo metastázy v regionálních mízních uzlinách | IIIC |
| T* N* M1 | vzdálené metastázy (mimo peritoneálních) | IV |

Tab. 2: Společná kritéria pro TNM klasifikaci a FIGO stadia. *vyjadřuje jakékoliv T nebo N. Převzato a upraveno dle Odicino, 2009.

Dalším kritériem napomáhajícím určení prognózy je exprese buněčného proliferačního markeru Ki67, stanovená imunohistochemicky v procentech pozitivních buněk jako index proliferační aktivity. Protein Ki67 je v buňce přítomen pouze během aktivních fází buněčného cyklu, tedy v G1, S, G2 a M fázi, během G0 fáze se nevyskytuje, a je tak ideálním markerem proliferace. V mitóze se vyskytuje na povrchu kondenzovaných chromozomů. Funkce Ki67

byla odhalena v poměrně nedávné době. Zjistilo se, že se jedná o strukturální protein důležitý pro vytvoření perichromozomální oblasti kondenzovaných chromozomů, která obsahuje mnoho proteinů pro správný průběh a ukončení dělení. Jeho role v interfázi však stále není plně objasněna (Booth *et al.*, 2014). Index proliferační aktivity pozitivně koreluje s hodnotou gradu, stadia a pravděpodobností relapsu a progresu, negativně pak s délkou přežívání (Garzetti *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2012). Proliferační index u HGSC je vyšší než u LGSC, což zákonitě koreluje s vyšší agresivitou a frekvencí mitóz u HGSC (Sundov *et al.*, 2013). Na druhou stranu bylo zjištěno, že nádory s vyšším proliferačním indexem lépe odpovídají na chemoterapii na bázi platinového derivátu, než nádory s nízkým indexem. Možným vysvětlením je mechanismus účinku chemoterapeutik založený na indukci apoptózy po poškození DNA a následném zastavení buněčného cyklu, větší reakci mají tedy proliferačně aktivnější buňky (Garcia-Velasco *et al.*, 2008; Schmeler *et al.*, 2008). Proliferační marker Ki67 má díky svým prognostickým hodnotám velký význam při klasifikaci ovariálního karcinomu.

2.1.2 Včasná diagnostika a preventivní skrínink

Absence preventivních skríninkových nástrojů pro včasnou diagnostiku se projevuje odhalením onemocnění až v pokročilých stadiích, kdy je kurativní efekt léčby prakticky vyloučený. Mezi základní charakteristiky zhoubných nádorů patří produkce tzv. nádorových markerů, které se využívají k diagnostice, vyšetřování, sledování účinnosti léčby, určení prognózy nebo ke kontrolám, zda u pacienta nedošlo k recidivě. Při snaze o zavedení celoplošného vyšetřování, které by vedlo k včasné diagnostice ovariálního karcinomu, byly vyvinuty metody zahrnující měření hladiny nádorového antigenu CA-125 (cancer antigen 125) a vyšetření vaginálním ultrazvukem. CA-125 je multifunkční transmembránový mucinózní glykoprotein nacházející se na apikální membráně některých epitelů (Blalock *et al.*, 2007). Skríninkové testy by měly dosahovat vysoké prediktivní hodnoty, tudíž musí být velmi senzitivní a specifické. Sledování hladiny glykoproteinu CA-125 však příliš spolehlivé není. Množství CA-125 bývá zvýšené (norma do 35 U/ml) i u jiných onemocnění a zdravotních stavů, než je zhoubný tumor ovaria, jako je například endometrióza nebo časná fáze těhotenství. Další komplikací je, že ne vždy je hladina CA-125 při ovarialních malignitách vyšší, zvýšení bylo zaznamenáno u přibližně 81 % všech případů (Takahashi *et al.*, 1986), avšak u pacientek s onemocněním ve stadiu I pouze u 50 % (Vlasák *et al.*, 2014). Studie zabývající se užitečností skríninku pomocí pravidelného stanovování množství CA-125 a vyšetřování vaginálním ultrazvukem nezaznamenala pokles mortality u testovací

skupiny vzhledem k pacientkám s obvyklou péčí (Buys *et al.*, 2011). CA-125 tedy není nejvhodnějším diagnostickým markerem, může se však využívat pro sledování průběhu terapie.

Dalším markerem využívaným v diagnostice ovariálního karcinomu je glykoprotein nadvarlete HE4 (Human Epididymis Protein-4), jehož normální hladina se pohybuje do 89 pmol/l. Biologická funkce proteinu je doposud neznámá. Oproti glykoproteinu CA-125 vykazuje HE4 menší falešnou pozitivitu a je tudíž specifitější, jako marker má však také své nedostatky (Hellstrom *et al.*, 2003). Ve stadiu I oproti nádorovému antigenu CA-125 vykazuje větší senzitivitu, jeho hladina byla zvýšená u 70 % případů, a pokud se oba markery použily současně, senzitivita se zvýšila na téměř 88 %, což ale stále není dostačující (Vlasák *et al.*, 2014). Další limitací diagnostiky využívající HE4 je, že se jeho hladina navyšuje pouze u karcinomů nemucinózního typu. Nadprodukce HE4 byla detekována u 100 % endometroidních, 93 % serózních a 50 % světlobuněčných karcinomů, u mucinózních ani v jednom případě (Drapkin *et al.*, 2005). Z hodnot CA-125, HE4 a menopauzálního stavu pacientky lze vypočítat tzv. index ROMA (risk of ovarian malignancy algorithm), což je algorismus, který byl vyvinut k odhadu rizika vzniku ovariálního karcinomu a byl prokázán jako vhodná metoda ke zlepšení primární detekce onemocnění (Novotny *et al.*, 2012).

Ačkoliv existují markery spojované se zhoubnými nádory vaječníku, prozatím nebyla vyvinuta vhodná metoda pro jejich celoplošný skrínink. Je tedy zapotřebí nalézt nové markery a zvýšit specifitu a senzitivitu vyšetřování a diagnostiky.

2.1.3 Genetické pozadí tumorigeneze ovariálního karcinomu

Po analýze studií zabývajících se genetickými profily nádorů byly navrženy 2 hlavní dráhy vzniku sporadického ovariálního karcinomu (Shih a Kurman, 2004). Mezi nádory vznikající cestou typu I patří LGSC, dále endometroidní, mucinózní, Brennerovy a světlobuněčné karcinomy. Uvedené tumory jsou charakteristické mutacemi v genech opravného systému DNA a proteinů účastnících se signalizace ovlivňující proliferaci, např. *BRAF* (V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) nebo gen pro β -catenin, ale nevyskytuje se u nich mutace genu *TP53* (tumor protein 53) kódujícího tumor supresorový protein. Tyto nádory pravděpodobně vznikají postupně z dřívějších patologických stavů přes hraniční až k invazivním tumorům (Singer *et al.*, 2003; Geyer *et al.*, 2009; Sundov *et al.*, 2013; Hunter *et al.*, 2015). Vzhledem k jejich tumorigenezi a mutovaným genům mají oproti HGSC

vysokou aktivitu MAP kináz (mitogen activated kinase), které přes další mediátory regulují expresi genů proliferace a buněčného cyklu (Sundov *et al.*, 2013).

HGSC vznikají drahou typu II (k této dráze jsou přiřazeny také nediferencované, smíšené a někdy i endometroidní karcinomy s vysokým gradem) s charakteristickými mutacemi genu *TP53* ve více než 95 % případů, bez výskytu předcházejících patologických stavů a mutací charakteristických pro dráhu typu I. Vzhledem k odlišným drahám vzniku těchto tumorů skrze hnací mutace *TP53* vznikají rychleji než ostatní typy, a proto jsou diagnostikovány až v pozdních stádiích (Geyer *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2010; Sundov *et al.*, 2013).

Přibližně 12 % pacientek s ovariálním karcinomem má dědičnou formu tohoto onemocnění způsobenou mutací v genech souvisejících s tumory prsu *BRCA1* nebo *BRCA2* (breast cancer 1/2). Mutace v uvedených genech mnohokrát zvyšuje riziko vzniku nádoru ovaria. V případě *BRCA1* je pravděpodobnost vzniku onemocnění do 70 let věku 39 %, v případě *BRCA2* 11 % (Antoniou *et al.*, 2003). *BRCA1* mutace také souvisí s propuknutím onemocnění v poměrně brzkém věku (Risch *et al.*, 2001).

2.1.4 Terapie ovariálního karcinomu a chemorezistence

Karcinom ovaria patří mezi takzvané nádory chemosenzitivní, jedná se tedy o tumory reagující na léčbu, ale ne chemokurabilní, což znamená, že onemocnění pomocí cytostatik vyléčit nelze. Proto je nejčastějším primárním terapeutickým krokem léčba chirurgická. Cílem chirurgického zákroku je stanovit rozsah onemocnění pomocí odběru dostatečného množství bioptických vzorků z okolních orgánů a mizních uzlin, provést pokud možno optimální cytoreduktivní výkon a získat histopatologickou diagnózu. Chirurgické určení rozsahu onemocnění je velmi důležité pro zvolení dalšího postupu léčby. Ve většině případů je po primární cytoredukci u pacientů s vyšším stadiem onemocnění nasazeno 6 sérií kombinované adjuvantní chemoterapie (chemoterapie podávaná po chirurgickém zákroku) na bázi platinového derivátu a taxanu, respektive karboplatiny a paklitaxelu v 21denních intervalech. Jako platinový derivát se místo karboplatiny využívá i cisplatina, která má však vyšší míru nežádoucích účinků a u ovariálního karcinomu srovnatelnou účinnost s karboplatinou (Du Bois *et al.*, 2003). Bohužel se u nádorů ve většině případů dříve nebo později rozvine chemorezistence k podávaným léčivům. Podávání paklitaxelu účinnost léčby zvyšuje, především v případech vzniklé rezistence k platinovým derivátům (Thigpen *et al.*, 1994).

U časných stadií onemocnění je adjuvantní léčba indikována pouze u rizikových skupin, tedy u pacientek se stadiem IA a IB s gradem 3, dále s IC a se světlobuněčnými karcinomy. Alternativním postupem v případech, kdy je nádor primárně inoperabilní, je nasazení 3–4 cyklů neoadjuvantní chemoterapie (léčba podávaná před chirurgickým zákrokem) na bázi platinového derivátu a taxanu s cílem zmenšit tumor nebo zlepšit stav pacientky a umožnit operabilitu nádoru. Nevýhodou podávání neoadjuvantní chemoterapie je možnost vzniku chemorezistence nádoru a následné nižší senzitivity buněk k léčbě po chirurgickém zákroku (Kim *et al.*, 2013). Chirurgický zásah je v případě potřeby možné opakovat, lze také provést laparoskopii pro kontrolu stavu v průběhu léčby, nebo paliativní zákrok s cílem ulevit od bolesti pacientům ve finálním stadiu onemocnění s chemorezistentním tumorem (shrnutí v Ramirez *et al.*, 2011; Ševčík, 2012).

Navzdory tomu, že cytostatická léčba u většiny pacientek vede k dosažení dobrých výsledků, bohužel neojediněle dochází k recidivě nemoci. V první skupině pacientek, u kterých je podezření na recidivu, dochází ke zvýšení hladiny tumorového markeru CA-125, aniž by byly přítomny klinické nebo radiologické příznaky relapsu jako je tomu u skupiny druhé. V takovém případě se jedná o tzv. sérologický relaps a může předbíhat relaps klinický a radiologický i o několik měsíců. Studie zabývající se efektem podání cytostatik v asymptomatickém sérologickém relapsu nepotvrdila prodloužení celkového přežívání při časném nasazení léčby, chemoterapie se v tomto případě tedy nedoporučuje (Rustin *et al.*, 2010).

V případě klinického relapsu je důležité stanovit délku intervalu mezi ukončením chemoterapie první linie a objevením recidivy, případně dalšího rozvoje onemocnění. Podle délky intervalu se stanovuje senzitivita tumoru k platinovému derivátu, jako k nejdůležitějšímu chemoterapeutiku první linie. Pokud k progresi nemoci nebo relapsu dojde po více než 12 měsících od ukončení léčby, je tumor označován jako platina-senzitivní a může být opět nasazeno platinové cytostatikum. V případě progresi nebo relapsu do 6 měsíců je nádor označován jako platina-rezistentní, při relapsu do 6–12 měsíců je tumor označován jako intermediární (ONKOLOGYNEKOLOGIE, URL5). Pokud nádor od počátku léčby na platinové chemoterapeutikum nereaguje, nebo dojde k progresi během léčby první linie, je označován jako platina-refrakterní. V případech rezistence k platinovým derivátům se zvažuje alternativní léčba neplatinovými chemoterapeutiky, např. gemcitabinem nebo topotekanem, případně léčba hormonální nebo biologická (shrnutí v Ševčík, 2012).

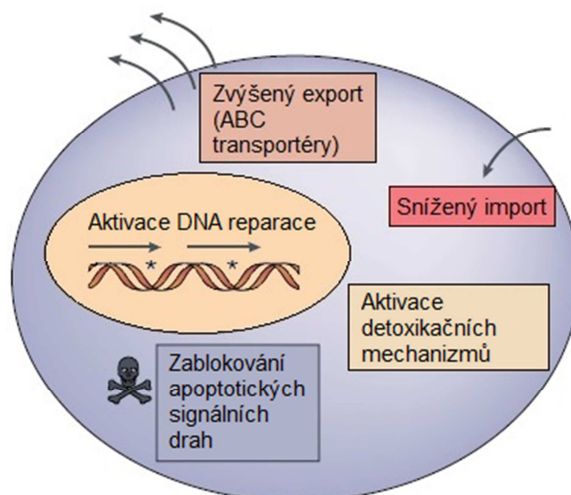
Během biologické léčby se nejčastěji využívá inhibitor angiogeneze bevacizumab, což je monoklonální protilátka vážící se na vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF (vascular

endothelial growth factor), který je sekretovaný tumory. Protilátka zabraňuje vazbě VEGF na receptor, což vyvolá blokadu signální dráhy vedoucí ke vzniku nových cév, které nádor potřebuje ke své výživě. Tím dojde k zastavení růstu nebo zmenšení tumoru (Presta *et al.*, 1997). Mnohé klinické studie prokázaly významný terapeutický potenciál bevacizumabu při léčbě ovariálního karcinomu (Burger *et al.*, 2011; Aghajanian *et al.*, 2012; Pujade-Lauraine *et al.*, 2014).

Ačkoliv není užíván k léčbě ovariálního karcinomu v klinické praxi, byl u platina-rezistentních nádorů s amplifikovaným nebo nadměrně exprimovaným genem *ERBB2* (Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2) kódujícím tyrozinkinázový receptor pro epidermální růstový faktor prokázán pozitivní léčebný účinek monoklonální protilátky Herceptin (trastuzumab) v kombinaci s karboplatinou a paklitaxelem (Ray-Coquard *et al.*, 2008). Protilátka se váže na receptor *ERBB2* a zabraňuje tak přenosu signálu směrem k progresi buněčného cyklu (Cho *et al.*, 2003). Množství pacientek s amplifikací tohoto genu se však v různých studiích liší, jejich zastoupení se pohybuje od 6–40 % (Medl *et al.*, 1995; Ray-Coquard *et al.*, 2008).

Po vyčerpání dalších možností léčby lze nasadit hormonální terapii tamoxifenem, což je selektivní modulátor estrogenních receptorů, tzv. SERM (selective estrogen receptor modulator). Cílem této terapie je rušit předpokládané působení estrogenu skrze estrogenní receptor a tím zablokovat příslušné signální dráhy vedoucí k buněčné proliferaci, motilitě a invazivitě nádoru (Katzenellenbogen *et al.*, 1987; Sanchez *et al.*, 2010). Tamoxifen pravděpodobně inhibuje proliferaci i skrze MAP kinázovou dráhu nezávislou na expresi estrogenních receptorů, jelikož dle některých studií účinnost této terapie s jejich přítomností nekoreluje (Schwartz *et al.*, 1989; Mabuchi *et al.*, 2004).

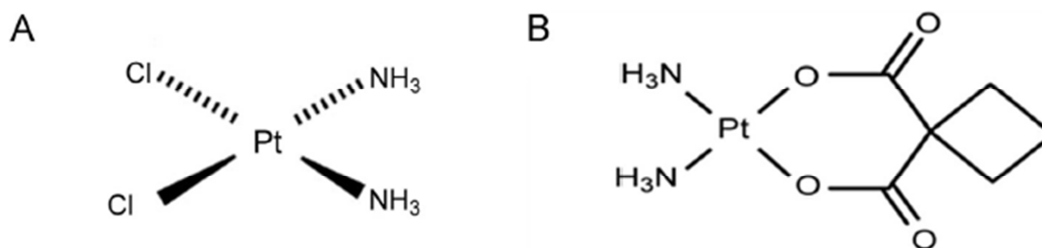
Chemorezistence, jinak také necitlivost k léčbě chemickými látkami je stav, který při léčbě ovariálních i jiných malignit výrazně snižuje účinnost léčby. Rezistence k léčivům může být primární, ta je dána genetickou výbavou pacienta a nádoru, a nebo sekundární (získaná), která je vyvolána až po aplikaci cytostatik. Při rezistenci nádoru ke kombinaci léčiv se hovoří o tzv. mnohočetné lékové rezistenci. Mechanizmy vzniku chemorezistence jsou intenzivně studovány, v současné době existuje několik modelů vzniku chemorezistence, které jsou shrnuty v Obr. 3. Nejčastěji je chemorezistence spojovaná s tzv. ABC transportéry (ATP-binding cassette transporter), které zprostředkovávají export léčiva z buňky a transport v rámci buněčných kompartmentů, což přímo ovlivňuje hladinu léčiv. Určení správného dávkování medikamentu, které je pro účinnou léčbu nezbytné, je tím velmi komplikováno (shrnutí v Gottesman *et al.*, 2002).



Obr. 3: Mechanizmy vzniku chemorezistence. Rezistence k léčivům může být vyvolána zvýšeným exportem léčiv z buňky, především pomocí ABC transportérů. Další problém představuje snížený import léčiv do buňky, aktivace detoxikačních systémů zbavujících buňku cizorodých látek, aktivace DNA reparace po navázání platinových derivátů, nebo zablokování drah vedoucích k apoptóze, například při mutaci p53. Převzato a upraveno dle Gottesman *et al.*, 2002.

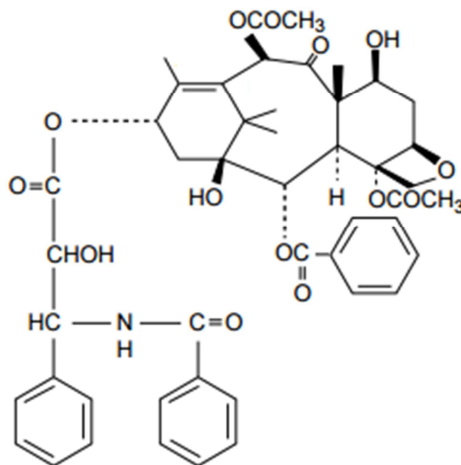
2.2 Platinové deriváty a taxany

Platinové deriváty se využívají jako chemoterapeutika k léčbě široké škály onkologických onemocnění. K léčbě ovariálního karcinomu se využívá karboplatina a cisplatina (viz Obr. 4), avšak další platinové deriváty jsou předmětem mnoha klinických studií.



Obr. 4: Strukturální vzorec cisplatiny (A) a karboplatiny (B). Převzato z Dasari a Tchounwou, 2014.

Jak již bylo zmíněno, při léčbě ovariálního karcinomu se nejčastěji využívá kombinovaná léčba platinovými deriváty spolu s taxany, především paklitaxelem, jehož struktura je znázorněna na Obr. 5.



Obr. 5: Strukturní vzorec paklitaxelu. Převzato z Rowinsky a Donehower, 1995.

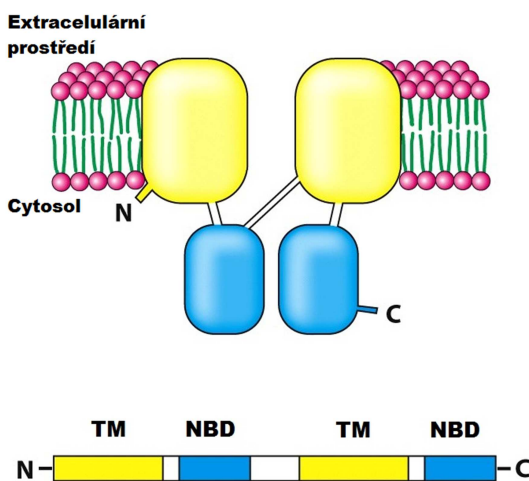
2.2.1 Transport přes buněčné membrány

Bylo identifikováno několik možných cest transportu platinových derivátů a taxanů přes plazmatickou membránu, ať už dovnitř, nebo ven z buňky. Léčiva se mohou dostat do buňky aktivní cestou skrze membránové transportéry, nebo i pasivní difúzí. Mezi proteiny účastnící se transportu platinových derivátů patří transportéry z rodin ABC, SLC (solute carrier) nebo měď transportující ATPázy. ABC a SLC transportéry se účastní i transportu taxanů. Proteiny zprostředkovávající transport jsou pro léčbu zásadní, souvisí s její účinností a jsou nejčastější příčinou vzniku chemorezistence, jelikož přímo ovlivňují akumulaci léčiv v buňce. Důležitý je také transport léčiv mezi buněčnými kompartmenty.

2.2.1.1 ABC transportéry a chemorezistence

ABC transportéry tvoří početnou rodinu membránových transportérů umožňujících přenos látek mezi buňkou a extracelulárním prostředím, nebo mezi buněčnými kompartmenty. Plnohodnotné ABC proteiny obsahují 2 ATP vazebné domény neboli NBD (nucleotide binding domain), které jsou lokalizovány v cytosolu a obsahují charakteristické konzervované Walker A a B motivy potřebné pro vazbu a hydrolýzu ATP (Walker *et al.*, 1982). Mezi těmito motivy byla identifikována další konzervovaná tzv. „signature“ sekvence, nazývaná také jako Walker C motiv (Kaminski *et al.*, 2001). Dále se v transportérech nachází 2 transmembránové domény složené z 6–11 α -helixů, které vytváří membránový kanál a určují substrátovou specifitu. Kromě plnohodnotných ABC transportérů, jejichž schéma je znázorněno na Obr. 6,

existují také tzv. poloviční transportéry obsahující pouze 1 NBD a 1 transmembránovou doménu. Takové proteiny musí formovat homodimery nebo heterodimery, aby vytvořily funkční transportér (Liu *et al.*, 1999). Během transportu se využívá vazby a hydrolyzy ATP, uvolněná energie je v eukaryotních buňkách využita především pro aktivní export nejrozličnějších látek z cytosolu, například cukrů, iontů, vitamínů, lipidů, sterolů nebo léčiv včetně platinových derivátů a taxanů. ABC transportéry jsou exprimovány ve všech lidských tkáních, jednotlivé tkáně se však zastoupením určitých ABC transportérů liší (shrnutí v Dean *et al.*, 2001).



Obr. 6: Struktura typického plnohodnotného ABC transportéru. Žlutě označené oblasti představují transmembránové domény (TM), modře označené NBD domény. Převzato a upraveno dle Berg *et al.*, 2012.

ABC transportéry jsou, dle sekvenční homologie, struktury genu a uspořádání domén, rozdělovány do 7 podrodin, ABCA až ABCG. Rozsáhlé studie zabývající se prognostickým významem všech lidských ABC transportérů u neléčeného kolorektálního karcinomu a u neoadjuvantně léčeného karcinomu prsu potvrdily, že hladiny jejich exprese na úrovni mRNA mohou být v nádorové tkáni oproti kontrolní tkáni významně deregulované, a že mnoho těchto proteinů má prognostický význam (Hlavata *et al.*, 2012; Hlavac *et al.*, 2013).

Nejstudovanějším ABC proteinem v souvislosti s mnohočetnou lékovou rezistencí je ABCB1, jinak nazývaný jako MDR1 (multidrug resistance). Tento transportér byl poprvé identifikován v roce 1976 jako glykoprotein se zvýšeným výskytem v kolchicin rezistentních křeččích ovariálních buněčných liniích CHO oproti identickým standardním liniím (Juliano a Ling, 1976). Zvýšená exprese ABCB1 byla detekována u 47 % neléčených pacientek s ovariálním karcinomem. Tyto pacientky měly nepříznivou prognózu, signifikantně menší

reakci na kombinovanou léčbu s platinovými deriváty a kratší přežívání (Baekelandt *et al.*, 2000). Pacientky ve vyšších stadiích nemoci měly vyšší hladinu transkriptu *ABCB1* a vyšší expresi proliferačního markeru Ki67 ve srovnání s pacientkami s méně pokročilým onemocněním (Ehrlichova *et al.*, 2013). Bylo prokázáno, že podávání platiny může vyvolat i získanou mnohočetnou lékovou rezistenci v buněčných liniích ovariálního karcinomu SKOV3, ve které po expozici k platinovým derivátům došlo k indukci exprese *ABCB1* (Yang a Page, 1995). Podobný jev byl pozorován také při podávání taxanů k primárním buněčným liniím karcinomu prostaty neléčených pacientů. U tohoto onemocnění byl také pozorován postupný rozvoj chemorezistence během progresu nádoru, který koreloval s nárůstem exprese *ABCB1* (Sanchez *et al.*, 2009).

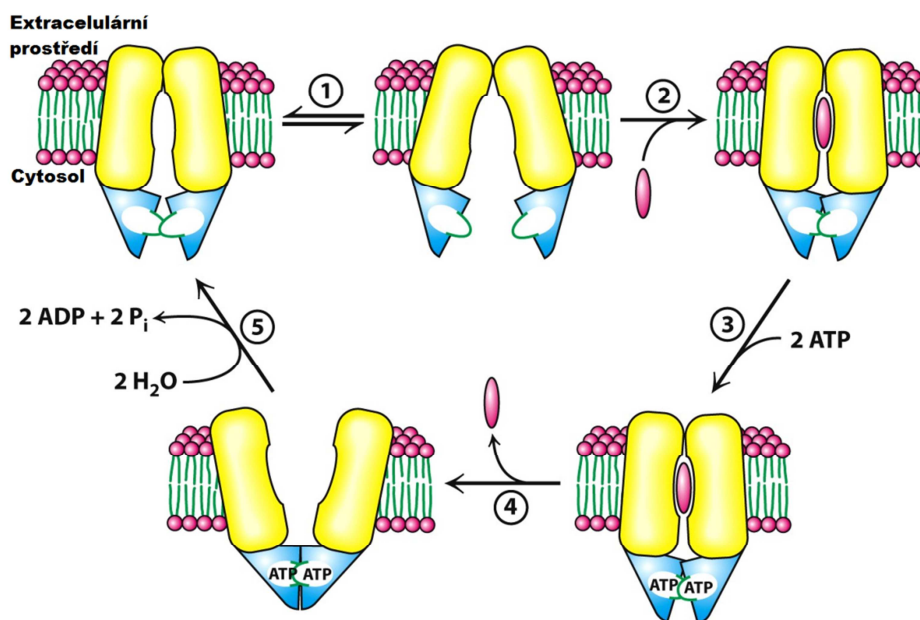
Mezi další transportéry, které jsou v souvislosti s mnohočetnou lékovou rezistencí intenzivně studovány, patří proteiny *ABCC1*, *ABCC2* a *ABCC3*. Studie pacientek s ovariálním karcinomem, u nichž před léčbou nebyla nalezena zvýšená exprese genu ani proteinu *ABCB1*, detekovala vyšší hladiny transkriptů genů *ABCC1* a *ABCC3* u pacientek s horší prognózou. Vysoká exprese *ABCC1* korelovala s kratší dobou bez progresu onemocnění. Během studie byla imunohistochemicky ověřena také exprese *ABCC1* a *ABCC3* na úrovni proteinu. Pacientky poté podstoupily adjuvantní léčbu zahrnující platinové deriváty a taxany, jejichž účinnost byla negativně ovlivněna expresí daných transportérů (Ohishi *et al.*, 2002). Vyšší hladina *ABCC2* u pacientek korelovala s kratší dobou bez progresu, kratším přežíváním, rezistencí k platinovým derivátům a vyšším gradem (Surowiak *et al.*, 2006). U mnoha dalších nádorových onemocnění, např. kolorektálního, plicního nebo hepatocelulárního karcinomu byla identifikována korelace mezi vyšší hladinou *ABCC* transportérů a rezistencí k platinovým derivátům a taxanům (Hinoshita *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001; Korita *et al.*, 2010).

Důležitým proteinem souvisejícím s rezistencí k léčivům u karcinomu prsu je *ABCG2*, jehož zvýšená genová exprese v MCF-7 liniích koreluje s mnohočetnou lékovou rezistencí (Doyle *et al.*, 1998). Zvýšené hladiny tohoto proteinu u pacientek s prsním karcinomem také korelují s vyšším stadiem onemocnění, přítomností metastáz v lymfatických uzlinách a tedy i s horší prognózou (Xiang *et al.*, 2011). U několika buněčných linií ovariálního karcinomu snížení exprese *ABCG2* vedlo ke zvýšení senzitivity k léčivům zahrnující platinové deriváty (Chen *et al.*, 2014b).

Z dalších zástupců rodiny ABC transportérů, u kterého byl prokázán prognostický význam u nádorových onemocnění, je protein *ABCA2*. Při jeho zvýšené expresi byla u buněčných linií embryonálních fibroblastů HEK-293, karcinomu prostaty DU145

a karcinomu ovarií SKEM identifikována rezistence k estradiolu a estramustinu (Ile *et al.*, 2004), a při vyšší hladině transkriptu rezistence k mitoxantronu u buněčné linie malobuněčného karcinomu plic GLC4 (Boonstra *et al.*, 2004). U pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií byl prokázán vztah mezi vyšší hladinou transkriptu *ABCA2* a mnohočetnou lékovou rezistencí (Rahgozar *et al.*, 2014). U buněčné linie ovariálního karcinomu SKEM rezistentní k estramustinu došlo po antisense terapii proti mRNA genu *ABCA2* k reverzi rezistence (Laing *et al.*, 1998). Vztah k platinovým derivátům a taxanům zatím nebyl identifikován.

Korelace zvýšené exprese uvedených genů s chemorezistencí podporuje funkci těchto transportérů jako exportérů léčiv, schéma mechanismu tohoto děje je znázorněno na Obr. 7. Zmíněné proteiny představují nejvíce studované ABC transportéry ve spojitosti s lékovou rezistencí, avšak mnoho dalších se účastní transportu léčiv a mohou tedy s tímto jevem souviset.



Obr. 7: Mechanismus funkce ABC exportérů. Během transportu ligandu přes membránu se využívá vazby a hydrolýzy ATP. Při nenavázaném ATP v NBD doménách je transportér otevřen směrem do buňky a je schopen navázat ligand v cytosolu. Po navázání ATP dojde k dimerizaci NBD domén, která vyvolá změnu konformace transmembránových domén a otevření transportéru směrem ven z buňky. V této fázi dochází k vlastnímu transportu ligandu. Po hydrolýze ATP a odstranění ADP a fosfátů dojde ke změně konformace a navrácení transportéru do původního stavu, kdy je schopen vázat ligand v cytosolu. Převzato a upraveno dle Berg *et al.*, 2012.

2.2.1.2 SLC transportéry a chemorezistence

Membránové transportéry z rodiny SLC představují další početnou skupinu proteinů zprostředkovávajících import a export přes plazmatickou membránu i vnitřní buněčné membrány. Jedná se o funkční rodinu transportérů, jelikož jednotlivé podrodiny mezi sebou sdílí pouze malou sekvenční homologii (Hoglund *et al.*, 2011). Podskupiny SLC transportérů mají odlišnou stavbu, která však vždy zahrnuje různý počet α -helixů v membráně. Tyto transportéry přenáší nejrůznější látky, například ionty, cukry, aminokyseliny, mastné kyseliny nebo léčiva. Přenos probíhá skrze pasivní transport po směru elektrochemického gradientu, nebo skrze sekundární aktivní transport proti směru elektrochemického gradientu pomocí symportu nebo antiportu s jinou molekulou, která se pohybuje po směru svého gradientu (shrnuje v He *et al.*, 2009).

Některé podrodiny SLC transportérů hrají důležitou roli v akumulaci léčiv v buňce. Podrodiny SLC31 a SLC22 jsou důležitými importéry platinových derivátů do buněk, SLC47 jsou naopak exportéry. Proteiny SLC31 neboli CTR (copper transporter) obsahují 2 transportéry se 3 transmembránovými doménami a jsou důležité pro udržení správné intracelulární koncentrace mědi. Bylo prokázáno, že SLC31A1 zprostředkovává import platinových derivátů do buněk a jeho ztráta vede ke snížené akumulaci léčiva a vzniku chemorezistence u myších fibroblastů (Larson *et al.*, 2009). U pacientek s ovariálním karcinomem byla prokázána zvýšená senzitivita k platinovým derivátům při zvýšené expresi *SLC31A1*. Nízká exprese naopak znamenala kratší dobu bez progresu onemocnění a kratší přežívání. Při vysoké expresi *SLC31A2* a nízké expresi *SLC31A1* pacientky vykazovaly signifikantně kratší dobu bez progresu a rezistenci k léčivům, což naznačuje mechanismus funkce SLC31A2 skrze SLC31A1. Poměr exprese těchto genů by mohl sloužit jako prognostický faktor (Lee *et al.*, 2011).

Dalšími proteiny regulujícími příjem léčiv jsou SLC22 se 23 zástupci, do nichž patří transportéry organických kationtů OCT (organic cation transporter), aniontů OAT (organic anion transporter) a kationtů nebo zwitterionů OCTN (organic zwitterion/cation transporter). SLC22 obsahují 22 transmembránových domén a mezi jejich substráty patří kromě iontů aminokyseliny, neurotransmitery a různá léčiva, včetně platinových derivátů. Nejvyšší afinita transportérů SLC22A1 a SLC22A2 byla u různých buněčných linií prokázána k oxaplatině, mírná k cisplatině a téměř žádná ke karboplatině. Indukce exprese genů pro SLC22 v buněčných liniích HEK-293 výrazně zvýšila akumulaci oxaplatiny v buňkách, mírně zvýšila akumulaci cisplatinu, a jejich množství tedy může ovlivnit citlivost nádorů k této léčbě

(Zhang *et al.*, 2006; Burger *et al.*, 2010). Genotypizační studie *SLC22A4* a *SLC22A5* odhalila varianty genů souvisejících s délkou doby dogrese (Angelini *et al.*, 2013), v několika nádorových liniích byla také snížena hladina proteinu *SLC22A5* oproti kontrolám, což naznačuje roli tohoto transportéru při vzniku nádorů (Scalise *et al.*, 2012).

Důležitými exportéry léčiv jsou proteiny z podrodiny *SLC47* neboli *MATE* (multidrug and toxin extrusion). Tato rodina obsahuje 2 zástupce s 13 transmembránovými doménami, zásadní pro extruzi metabolického odpadu a xenobiotik. Bylo prokázáno, že mezi jejich substráty patří také platinové deriváty (Yonezawa *et al.*, 2006).

V buněčných liniích ovariálního karcinomu A2780 byla identifikována řada deregulovaných genů pro *SLC* transportéry, naznačující jejich možnou úlohu v nádorovém metabolismu (Januchowski *et al.*, 2014).

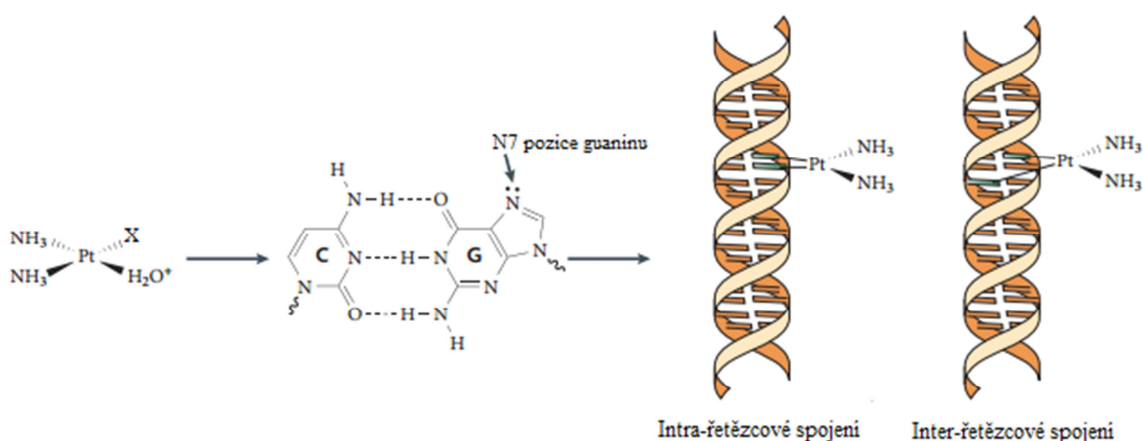
2.2.1.3 Měď transportující ATPázy a chemorezistence

Měď transportující ATPázy *ATP7A* a *ATP7B* jsou intracelulární transportéry účastníci se udržení správné koncentrace mědi v buňce. Zprostředkovávají její aktivní export skrze transport z cytosolu do *trans*-Golgiho aparátu, ze kterého je následně vezikulární sekretorickou dráhou exportována z buňky. Kromě kationtů mědi tyto transportéry pravděpodobně zprostředkovávají také export platinových derivátů, jelikož jejich přítomnost mění senzitivitu buněk k těmto léčivům (Samimi *et al.*, 2004). Studie prokázaly, že vyšší exprese *ATP7B* u pacientek s ovariálním karcinomem souvisí s horší prognózou a chemorezistencí k platinovým derivátům (Nakayama *et al.*, 2004). Podobný výsledek u pacientek s tímto onemocněním byl získán v případě *ATP7A*, jehož vyšší exprese koreluje s kratším přežíváním při léčbě platinovými deriváty (Samimi *et al.*, 2003).

2.2.2 Mechanismus působení platinových derivátů

Po průchodu platinových derivátů do cytosolu dojde k jejich aktivaci pomocí hydrolýzy. V případě cisplatiny dochází k výměně atomu chlóru za molekulu vody, u karboplatiny dojde k rozštěpení vazby platiny s 1,1-cyklobutandikarboxylátem a k připojení molekuly vody. Oba deriváty tedy následně reagují stejně. Vzniklé skupiny jsou silně elektrofilní a interagují s nukleofily v buňce, například s atomy dusíku v nukleových kyselinách nebo s atomy síry cysteinu a methioninu v proteinech. Aktivované platinové deriváty tak mohou vytvářet kovalentní DNA adukty za odstranění navázané molekuly vody a spojovat řetězce DNA, případně řetězec DNA a protein. Během aktivace může dojít k 1 nebo 2 hydrolýzám, platinový derivát pak tvoří buď monoadukty, nebo diadukty (shrnutí v Kelland, 2007;

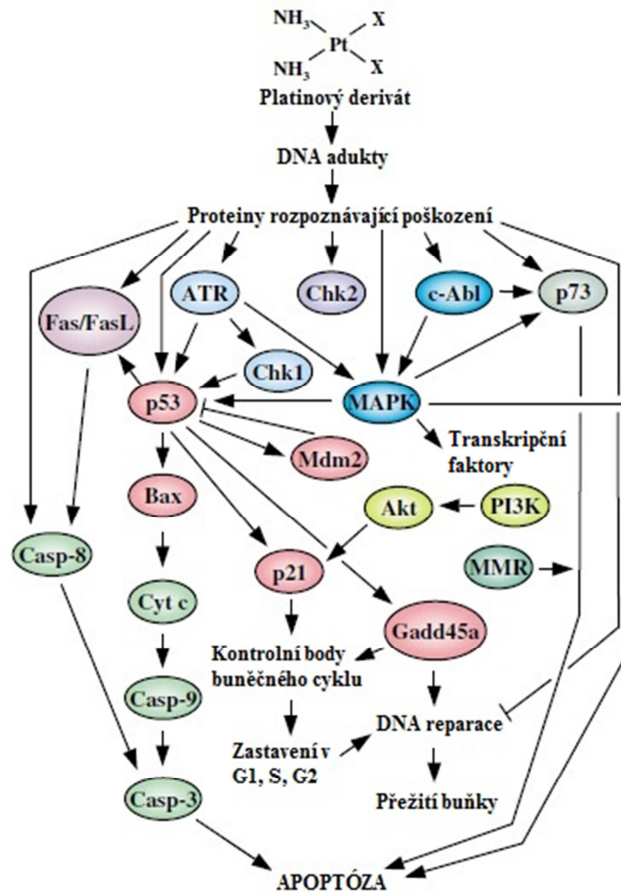
De Sousa *et al.*, 2014). Bylo dokázáno, že cisplatina vytváří adukty kovalentním navázáním na N7 pozici purinových bazí, především guaninu. Nejčastěji dochází k formování diaduktu a intra-řetězcového propojení sousedících bazí, především GpG 1,2 intra-řetězcovému spojení (60–65 %), méně pak k ApG 1,2 intra-řetězcovému spojení (20–25 %). Méně často může docházet k intra-řetězcovým spojům 2 guaninů separovaných 1 neplatínanou bazí, ke vzniku monoaduktu s guaninem, nebo k inter-řetězcovým spojení guaninů, viz Obr. 8 (Fichtinger-Schepman *et al.*, 1985; citováno podle (Kelland, 2007). Podobné výsledky tvorby DNA aduktů byly pozorovány *in vitro* také u karboplatiny, což potvrzuje stejný mechanismus účinku s cisplatinou (Blommaert *et al.*, 1995).



Obr. 8: Tvorba platinových DNA aduktů. Aktivovaný platinový derivát svou elektrofilní skupinou atakuje nukleofilní N7 pozici guaninu za vzniku kovalentní vazby a uvolnění molekuly vody. Následně dochází ke druhé hydrolyze a platinový derivát vytváří intra-řetězcový nebo inter-řetězcový DNA adukt. Převzato a upraveno dle Kelland, 2007.

DNA adukty mění konformaci DNA a zabraňují správnému průběhu replikace. Poškození je rozpoznáno řadou proteinů, které následně spouští různé mechanismy vedoucí k apoptóze, které jsou shrnuty v Obr. 9. Centrálním proteinem, který se účastní mnoha signálních drah souvisejících s reparací DNA a apoptózou je tumor supresorový protein p53. Mutace *TP53* jsou častými genetickými změnami ovariálních karcinomů, které mnohdy vedou ke zvýšené expresi proteinu (Havrilesky *et al.*, 2003). Zvýšená exprese p53 (exprese ve více než 10 % buněk tumoru) byla detekována až u 63 % pacientek (Garcia-Velasco *et al.*, 2008), přičemž v některých studiích vysoká hladina exprese korelovala s kratším přežíváním (Vanderzee *et al.*, 1995), vyšším gradem a větší pravděpodobností vzniku rezistence k platinovému derivátu, jedná se tedy o protein se ztrátou funkce (Nakayama *et al.*, 2003). U buněčných linií ovariálního karcinomu IGROV-1 s indukovanou rezistencí k cisplatině byla

zaznaménána nižší frekvence apoptózy a větší výskyt mutací *TP53* než u původní linie bez navožené rezistence. Mutace tohoto genu vede k syntéze proteinu se ztrátou funkce, což vyústí zablokováním signálních drah vedoucích k apoptóze (Perego *et al.*, 1996).



Obr. 9: Mechanismus indukce apoptózy platinovými deriváty. Přítomnost DNA aduktů je rozpoznána řadou proteinů, které aktivují signální dráhy vedoucí buňku do apoptózy při nemožnosti opravy DNA. Deregulace proteinů účastnících se daných drah může vést ke vzniku chemorezistence. Převzato a upraveno dle Siddik, 2003.

2.2.2.1 MMR systém

Do oblasti poškození DNA se váží například proteiny tzv. MMR (mismatch repair) systému zajišťující integritu genomu opravou krátkých inzercí, delecí nebo misinkorporací bází. Mezi lidské MMR proteiny patří MSH2–MSH6 (MutS homolog 2–6), MLH1, MLH3 (MutL homolog 1 a 3), PMS1 a PMS2 (PMS1 homolog 1, mismatch repair system component a PMS2 homolog 2, mismatch repair system component). Tyto proteiny spolu vytváří heterodimery a rozpoznávají poškozenou oblast nově vzniklého DNA vlákna, do které se váží

a atrahují další opravné mechanismy (shrnuto v Schofield a Hsieh, 2003). Ačkoliv se tento systém neúčastní oprav DNA aduktů, rozpoznává poškozené místo a je důležitý pro senzitivitu k platinovým derivátům (Drotschmann *et al.*, 2004). Předpokladem je, že po rozpoznání poškozeného místa MMR systém aktivuje dráhy vedoucí k apoptóze. Studie využívající buněčné linie tlustého střeva s deficiencí MLH1 a buněčné linie endometriálního karcinomu HEC59 s deficiencí MSH2 tuto teorii podpořila zjištěním, že MMR deficientní buňky jsou rezistentnější ke karbolatině a cisplatině, než buňky s funkčním MMR systémem (Fink *et al.*, 1996). Rezistence k cisplatině byla zjištěna také u buněčných linií kolorektálního karcinomu HHUA s deficientním MSH6 (Vaisman *et al.*, 1998). Na modelu lidských xenograftů (obvykle imunodeficientní myši s transplantovaným lidským nádorem nebo nádorovou linií) s methylovaným promotorem *MLH1*, které jsou rezistentní k platinovým derivátům, bylo zjištěno, že po aplikaci demethylačních látek dojde k opětovné expresi *MLH1* a k senzitivizaci k léčbě (Plumb *et al.*, 2000). MMR systém je tedy důležitý pro spuštění proapoptotických drah a vznik chemorezistence ke karbolatině a cisplatině.

Defekty MMR systému jsou spojovány se vznikem a prognózou mnoha nádorových onemocnění, nejčastěji s dědičným Lynchovým syndromem, ale i s některými sporadickými nádory. Pacienti s Lynchovým syndromem mají nejčastěji defekt v MLH1, MSH2 nebo MSH6 proteinu, což způsobuje vysoké riziko vzniku nádorových onemocnění, především hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu, ale i ovariálních nádorů. Defekty v MMR systému, přesněji MLH1, MSH2 a MSH6 nejsou častým jevem u pacientek s ovariálním karcinomem, avšak pacientky s tímto defektem mají lepší prognózu (Pal *et al.*, 2012). Na rozdíl od nádorů bez MMR defektů jsou v 80 % diagnostikovány v raných stadiích a pravděpodobnost přežití 10 let od diagnózy dosahuje 80 % (Grindedal *et al.*, 2010). U pacientek s MMR deficiencí dochází k rozvoji onemocnění v nižším věku a jedná se především o nesorózní tumory (Ketabi *et al.*, 2011). Během analýzy zahrnující pouze světlobuněčné a endometroidní ovariální karcinomy bylo necelých 8 % deficientních v MMR proteinech (Vierkoetter *et al.*, 2014).

2.2.3 Mechanismus působení taxanů

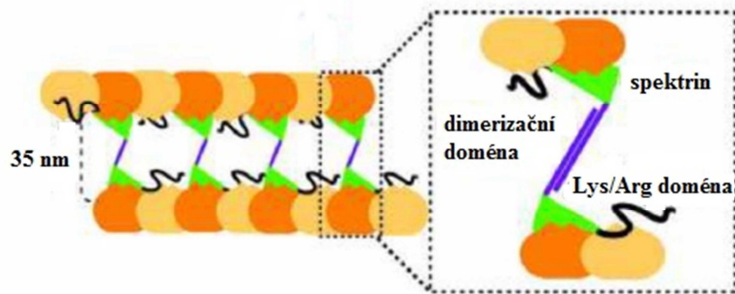
Paklitaxel je molekula vážící se na 31 N-koncových aminokyselin β -tubulinů, indukující polymeraci tubulinů, stabilizaci mikrotubulů a inhibici jejich rozpadu (Rao *et al.*, 1994). K tomu dochází i v případě, že není přítomný GTP a proteiny asociované s mikrotubuly, které jsou k polymeraci při fyziologických podmínkách zapotřebí. Taxany mají 2 hlavní mechanismy účinku, jeden je uplatňován v průběhu mitózy buněčného dělení, druhý

v interfázi. V případě dělení není buňka vzhledem ke stabilizaci mikrotubulů schopna správného sestavení dělicího vřeténka a metafázní roviny, což neumožní vypnutí kontrolního bodu SAC (spindle assembly checkpoint) zajišťujícího správné vytvoření dělicího vřeténka, následnou aktivaci APC komplexu (anaphase promoting complex) spouštěcího anafázi, destrukci příslušných molekul a vstup do anafáze. Taxany tedy působí zablokováním mitózy, které nakonec končí apoptózou (Jordan *et al.*, 1996; Ling *et al.*, 1998). V interfázi narušení dynamiky mikrotubulového cytoskeletu taxany vede k poškození buněčného metabolismu a apoptóze (shrnutí v Murray *et al.*, 2012).

Paklitaxel pravděpodobně cytostaticky účinkuje i dalšími mechanismy, například na mikrotubulech nezávislou inhibicí angiogeneze při velmi nízkých dávkách (Wang *et al.*, 2003), zastavením buněčného cyklu v S fázi (Lieu *et al.*, 1997) nebo přímou vazbou antiapoptotického proteinu BCL-2 (B-cell lymphoma 2) umožňující vytvoření pórů v mitochondriální membráně a uvolnění cytochromu C a dalších komponent pro průběh apoptózy (Ferlini *et al.*, 2009). Mechanismus účinku paklitaxelu a jeho schopnost indukovat apoptózu je hodně komplexní, a vyžaduje další studium.

2.2.3.1 Regulátor cytokineze a polo-like kináza

Jedním z proteinů účastnících se vytvoření střední oblasti dělicího vřeténka a cytokineze je regulátor cytokineze PRC1 (protein regulator of cytokinesis 1). Jedná se o nemotorový protein vážící heterodimer α a β tubulinů, který funguje jako homodimer a zajišťuje propojení antiparalelních konců polárních mikrotubulů dělicího vřeténka (viz Obr. 10). Transkripce *PRC1* je negativně regulována proteinem p53 (Li *et al.*, 2004). Pro správnou funkci PRC1 jsou nezbytné kineziny, motorové proteiny pohybující se po mikrotubulech pomocí vazby a hydrolyzy ATP, které zajišťují translokaci PRC1 během mitózy z pólů dělicího vřeténka k plus koncům polárních mikrotubulů (Zhu a Jiang, 2005; Gruneberg *et al.*, 2006). Narušení dynamiky mikrotubulů taxany inhibuje tento proces, což naruší funkci PRC1 a zamezí cytokinezi (Jiang *et al.*, 1998).



Obr. 10: Propojení antiparalelních mikrotubulů pomocí proteinu PRC1. PRC1 propojuje mikrotubuly ve vzdálenosti cca 35 nm. Proteiny jsou spojené dimerizační doménou, ve vazbě k mikrotubulům hraje roli také spektrinová a lysin/argininová doména na C konci proteinu. Převzato a upraveno dle Subramanian *et al.*, 2010.

Funkce PRC1 je během rané mitózy inhibována také jeho fosforylací pomocí komplexu cyklin dependentní kinázy s cykliny, pravděpodobně CDK1 (cyclin dependent kinase 1) s cyklinem B. Fosforylace ruší afinitu PRC1 k mikrotubulům z důvodu redukce pozitivního náboje na C koncové doméně bohaté na lysin a arginin, na které se nachází fosforylační místa a která slouží k vazbě tubulinů. Ve fosforylovaném stavu PRC1 také ztrácí schopnost vazby s kineziny. Afinita PRC1 k mikrotubulům a schopnost interakce s kineziny se navrátí opět po defosforylaci proteinu způsobenou degradací cyklinu B APC komplexem a inaktivací CDK1 (Mollinari *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2006; Subramanian *et al.*, 2010). Při působení taxanů však APC komplex není aktivován a PRC1 zůstává inhibován. Taxany tedy působí i inhibicí cytokineze skrze PRC1. I u interfázních HeLa buněk bylo po aplikaci paklitaxelu pozorováno intenzivní propojování mikrotubulů pomocí PRC1 (Mollinari *et al.*, 2002).

V nádorové ovariální tkáni byla detekována signifikantně vyšší exprese genu *PRC1* v porovnání s kontrolní tkání (Ehrlichova *et al.*, 2013), u karcinomu prsu vyšší hladina transkriptu korelovala s dobou bez progresu (Mustacchi *et al.*, 2013).

Další funkcí PRC1 je rekrutovat protoonkogenní kinázu PLK1 (polo-like kinase 1) do oblasti dělení, což je nezbytné pro správné rozdělení buňky. PLK1 fosforylací specifických aminokyselin na C konci PRC1 vytváří na tomto proteinu své vazebné místo. V anafázi se přes tzv. polo box doménu váže na protein PRC1, což slouží jako primární kotva pro udržení PLK1 v oblasti dělicího vřeténka (Neef *et al.*, 2007). PLK1 je důležitý regulátor buněčného cyklu, usnadňuje vstup do mitózy, účastní se aktivace APC komplexu a stojí na počátku aktivace malé GTPázy RhoA, která je důležitá pro vytvoření kontraktálního prstence (Burkard *et al.*, 2007). Množství PLK1 je výrazně vyšší u ovariálního karcinomu než u kontrolní ovariální tkáně. Jeho exprese také pozitivně koreluje se stadiem onemocnění, hodnotou gradu

a kratším přežíváním pacientek. Inhibicí PLK1 v ovariálních SKOV-3 liniích bylo dosaženo nižší proliferální aktivity, zvýšení hladiny proteinu p53 a zvýšení frekvence apoptózy (Weichert *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2015a). Snížená hladina transkriptu genu tumor supresorové izoformy PLK2, jejíž exprese je aktivována p53, v různých ovariálních buněčných liniích znamenala rezistenci k paklitaxelu a platinovým derivátům. Inhibice transkripce byla způsobená především methylocemi promotoru genu *PLK2* (Syed *et al.*, 2011).

2.2.4 Metabolismus a detoxikace platinových derivátů a taxanů

Důležitou roli v působení platinových derivátů hraje redoxní metabolismus buňky zajišťující rovnováhu mezi vznikem volných radikálů a jejich eliminací antioxidantním systémem. Oxidační stres charakteristický nerovnováhou těchto dějů je důležitým mechanismem funkce těchto léčiv. Působení platinových derivátů vede ke vzniku reaktivních forem kyslíku, jejichž nadměrné množství způsobuje poškození DNA, proteinů a lipidů a vede ke spuštění mechanismů vedoucích k apoptóze (Li *et al.*, 2015). Zvýšená produkce antioxidantních proteinů redukujících vzniklé radikály, v tomto případě glutathionu (GSH) v nádorové linii močového měchýře KU7, tak může vyvolávat rezistenci k platinovým derivátům tím, že buňku účinně radikálů zbavují (Miyajima *et al.*, 1997). K eliminaci reaktivních forem kyslíku však přispívají i další proteiny redoxního systému buňky, například glutaredoxin, glutathion peroxidáza nebo superoxid dismutáza, které také mohou přispívat k chemorezistenci. Zvýšená exprese jejich genů, respektive *GLRX*, *GPX3* a *SOD2* byla zaznamenána u světlobuněčných ovariálních karcinomů, které mají horší prognózu, než ostatní typy tohoto onemocnění, což koreluje s tvrzením o úloze těchto genů (Schwartz *et al.*, 2002). Exprese *SOD2* v CHO liniích vyvolala mnohočetnou lékovou rezistenci (Hirose *et al.*, 1993). Zvýšená exprese antioxidantních genů v nádorech může být způsobená faktem, že jejich buňky vykazují větší oxidační stres než zdravé buňky z důvodu onkogenní transformace, vyšší metabolické aktivity a disfunkci mitochondrií. Nadměrná exprese může být také vyvolána až po působení léčiv s cílem přežít (shrnutí v Ozben, 2007).

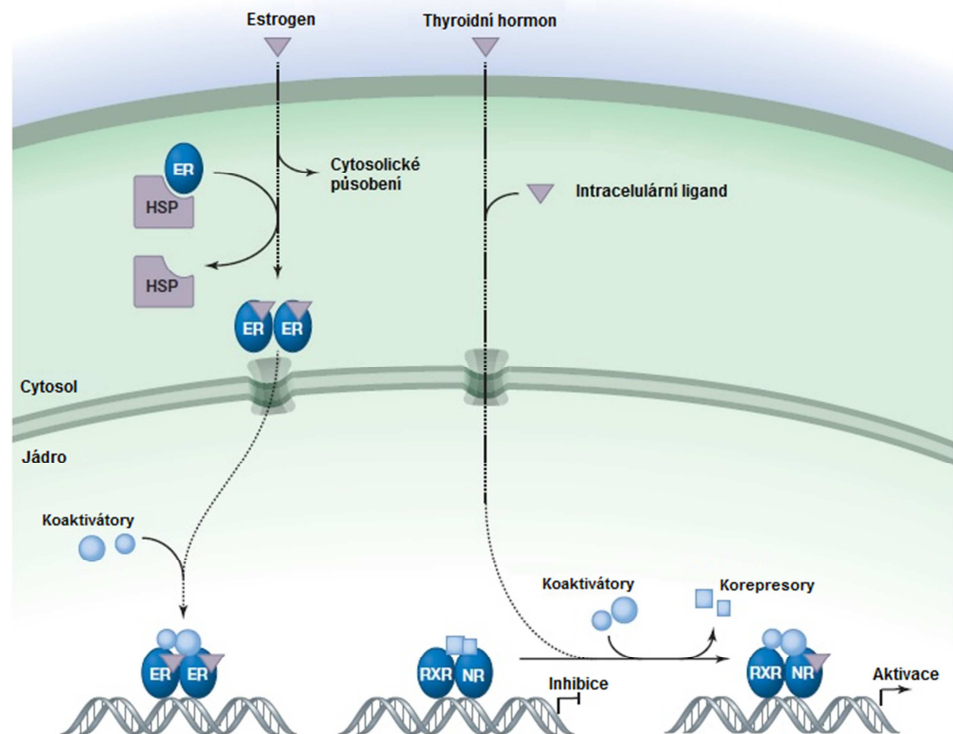
Dalším mechanismem vzniku rezistence je detoxikace. Detoxikace je děj, během kterého se buňka zbavuje cizorodých látek, což může vést ke snížení účinnosti léčby. Aktivované platinové deriváty jako elektrofilů interagují kromě DNA i s jinými nukleofily, například s některými proteiny. Mezi ty patří GSH, antioxidant s redukční thiolovou skupinou zabraňující poškození buňky reaktivními formami kyslíku nebo xenobiotiky. K aktivovaným derivátům platiny se konjuguje spontánně nebo pomocí enzymu glutathion-S-transferázy

a zvyšuje tak rozpustnost léčiva ve vodě. Tento komplex s GSH je transportován z buňky pomocí ABCC transportérů (Jedlitschky *et al.*, 1994). Bylo zjištěno, že zvýšená syntéza GSH v buněčných liniích ovariálního karcinomu A2780 a A1847 koreluje se zvýšenou rezistencí k cisplatině (Godwin *et al.*, 1992), stejně jako zvýšená hladina mRNA proteinu GST v ovariálních liniích KFr (Sakamoto *et al.*, 2001). Tyto proteiny tedy přispívají k rezistenci prostřednictvím detoxikace samotných platinových derivátů nebo prostřednictvím eliminace reaktivních forem kyslíku produkovaných jejich působením.

Důležitými proteiny účastnicími se metabolismu cizorodých látek jsou cytochromy P450 (CYP). Tyto proteiny zprostředkovávají tzv. biotransformaci xenobiotik, což může vést k jejich aktivaci, nebo inaktivaci a následnému exportu z buňky. Svou aktivitou mohou také indukovat vznik reaktivních forem kyslíku. Cytochromy P450 se tedy podílejí na aktivaci prokarcinogenů a vzniku nádoru, aktivaci nebo inaktivaci léčiv skrze oxidaci zvýšením polaritativy a rozpustnosti léčiv v cytosolu, což následně umožní jejich snazší export. Tyto proteiny se podílejí na metabolismu 75 % známých léčiv a výrazně ovlivňují jejich účinnost (Guengerich, 2008). Nejvýznamnějšími cytochromy P450 podílejícími se na metabolismu paklitaxelu jsou CYP2C8 a CYP3A4. CYP2C8 metabolizuje paklitaxel na 6 α -hydroxypaklitaxel, který je *in vitro* u lidských promyeloidních leukemických buněk HL-60 téměř 14x méně účinný při zablokování mitózy a 4x méně účinný při indukci apoptózy, než paklitaxel (Kumar *et al.*, 1995). CYP3A4 metabolizuje paklitaxel na 3'-p-hydroxypaklitaxel a oba enzymy na dihydroxypaklitaxel (Monsarrat *et al.*, 1998). U nádorů prsu byla zjištěna korelace mezi vyšší expresí genu *CYP3A4* a menší reakcí na léčbu taxany (Miyoshi *et al.*, 2002). Exprese genů *CYP2C8* a *CYP3A4* byla zjištěna také u ovariálního karcinomu (DeLoia *et al.*, 2008).

2.2.4.1 Jaderné receptory

Jaderné receptory jsou ligandem regulované transkripční faktory, které jsou schopné vázat DNA a regulovat expresi cílových genů. Jejich ligandy jsou extracelulární látky volně prostupující membránou, například steroidní a thyroïdní hormony, nebo intracelulární ligandy, například oxysteroly nebo žlučové kyseliny. Typické jaderné receptory vytváří heterodimery s RXR (retinoid X receptor) α , β nebo γ , vzniklý komplex je tedy regulován také kyselinou retinovou. Mezi jaderné receptory lze řadit také estrogení receptory ER α a ER β (estrogen receptor α/β). Mechanismus funkce jaderných receptorů je znázorněn na Obr. 11 (shrnuto v Sever a Glass, 2013).



Obr. 11: Mechanismus funkce jaderných receptorů. Estrogenní receptory (ER) jsou lokalizovány v cytoplazmě a kotveny pomocí chaperonů (např. HSP). Po navázání příslušného ligandu (např. estrogeneru) dojde k uvolnění receptoru, homodimerizaci a lokalizaci do jádra, kde spolu s koaktivátory aktivují expresi cílových genů. U NR (nuclear receptor) dimerizujících s RXR dojde po navázání příslušného ligandu (např. thyroïdního hormonu) k výměně korepresorů za koaktivátory komplexu a aktivaci exprese cílových genů. Převzato a upraveno dle Sever a Glass, 2013.

Do podrodiny NR1I (nuclear receptor 1I) patří receptory CAR (constitutive androstane receptor) kódované genem *NR1I3*, VDR (vitamin D₃ receptor) kódované *NR1I1* a PXR (pregane X receptor) kódované *NR1I2*. Mezi cílové geny těchto faktorů patří několik cytochromů P450, mimo jiné *CYP3A4*, jehož exprese je aktivována všemi uvedenými faktory (Sueyoshi *et al.*, 1999; Thummel *et al.*, 2001; Sivertsson *et al.*, 2013), a *CYP2C8*, který je aktivován PXR (Synold *et al.*, 2001). Dalšími cílovými geny jsou například *ABCB1* a *ABCC2* aktivované PXR a CAR (Maglich *et al.*, 2002) nebo *SLCO1B3* aktivovaný PXR (Staudinger *et al.*, 2001). Mezi ligandy interagující s NR1I receptory patří mimo jiné také paklitaxel (Synold *et al.*, 2001). Tyto proteiny se tedy nepřímo mohou podílet na účinnosti léčby. Exprese genu *NR1I2* byla prokázána v buněčných liniích ovariálního karcinomu OVCAR-8 a SKOV-3. U SKOV-3 linie ligandem indukovaná aktivace transkripčního faktoru PXR vedla

ke vzniku mnohočetné lékové rezistence zahrnující paklitaxel a k vyšší proliferativní aktivitě nádorových buněk (Gupta *et al.*, 2008).

Do podrodiny NR1H patří 3 jaderné receptory – LXR α a β (liver X receptor α/β) kódované geny *NR1H2* a *NR1H3*, a FXR (farnesoid X receptor) kódované genem *NR1H4*. LXR faktory udržují homeostázu cholesterolu, FXR homeostázu žlučových kyselin. Mezi cílové geny LXR faktorů patří mimo jiné geny transportérů ABCA1, ABCG1, ABCG5 a ABCG8 (Venkateswaran *et al.*, 2000; Repa *et al.*, 2002), dále gen pro CYP7A1 nebo VEGFA (Peet *et al.*, 1998; Walczak *et al.*, 2004). Mezi cílové geny FXR patří například geny transportérů ABCB11 nebo ABCG2 (Zollner *et al.*, 2003; Herraes *et al.*, 2012), dále gen pro CYP3A4 (Gnerre *et al.*, 2004) nebo SHP (small heterodimer partner), což je důležitý represor transkripce kódovaný genem *NROB2* (Goodwin *et al.*, 2000). SHP je malý jaderný receptor, kterému chybí DNA vazebná doména. Tvoří heterodimery s ostatními jadernými receptory, včetně ER α a ER β , a blokuje tak jejich transkripční aktivitu. Funguje tedy jako negativní regulátor signální transdukce (Seol *et al.*, 1996; Johansson *et al.*, 1999).

U pacientek s karcinomem prsu byla zjištěna vyšší exprese FXR receptoru u ER pozitivních nádorů, množství proteinu také pozitivně korelovalo s expresí proliferativního markeru Ki67 a přítomností metastáz v okolních mízních uzlinách u postmenopauzálních pacientek (Journe *et al.*, 2009). U jaterních nádorů byla zjištěna snížená exprese genu *NROB2* v porovnání se zdravými játry. Nízká exprese *NROB2* souvisela s horší prognózou a vyšší proliferativní aktivitou nádorových buněk (Park *et al.*, 2010). Buněčná linie prsního karcinomu HTB26 po indukci exprese SHP vykazovala až 3x nižší proliferativní aktivitu (Wu *et al.*, 2003). Tyto studie podporují úlohu SHP proteinu jako tumor supresoru.

Estrogenní receptory ER α a ER β kódované geny *ESR1* a *ESR2* (estrogen receptor 1/2) jsou transkripční faktory vážící se do estrogen-responsivní oblasti ERE (estrogen-responsive element) v promotorech cílových genů, čímž regulují jejich expresi. Ve zdravé ovariální tkáni dominuje exprese *ESR2*, s progresí nádoru jeho množství klesá a převažuje *ESR1*, jehož hladina se mezi zdravou a nádorovou tkání neliší. ER α u buněčných linií ovariálního karcinomu mimo jiné zvyšuje expresi cyklinu D1, který spouští dělení buňky, ER β jeho expresi naopak snižuje. ER α tedy pravděpodobně indukuje růst a invazivitu nádoru, zatímco ER β má protektivní charakter a jeho ztráta nebo inhibice může být důležitým faktorem při vzniku a progresi ovariálního karcinomu (Bardin *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2005). Na rozdíl od těchto výsledků, jiná studie, zabývající se pouze expresí ER α u pacientek s ovariálním karcinomem, odhalila souvislost mezi jeho expresí a delším přežíváním pacientek (Aust *et al.*, 2012).

2.2.4.2 Chaperony

Důležitou roli v buněčné signalizaci hrají chaperony, které vyvazují estrogenní receptory i jiné proteiny a zajišťují jejich správnou konformaci, stabilitu nebo lokalizaci. Mezi chaperony vyskytující se v cytosolu patří například HSP-70 nebo HSP-90 (heat shock protein 70/90). U ovariálního karcinomu bylo prokázáno, že indukce exprese HSP-70 u chemosenzitivních linií OV2008 inhibuje apoptózu spouštěnou platinovými deriváty. V rámci studie bylo také zjištěno, že HSP-70 brání apoptóze vyvazováním proteinu BAX (Bcl-2 associated X protein), který tak nevytváří kanály v mitochondriální membráně. V buňce následně nedochází k uvolnění cytochromu C a dalších proteinů důležitých pro indukci apoptózy (Yang *et al.*, 2012). Inhibitory HSP-90 prokázaly zvýšení senzitivity různých ovariálních buněčných linií k platinovým derivátům i paklitaxelu (Sain *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015b).

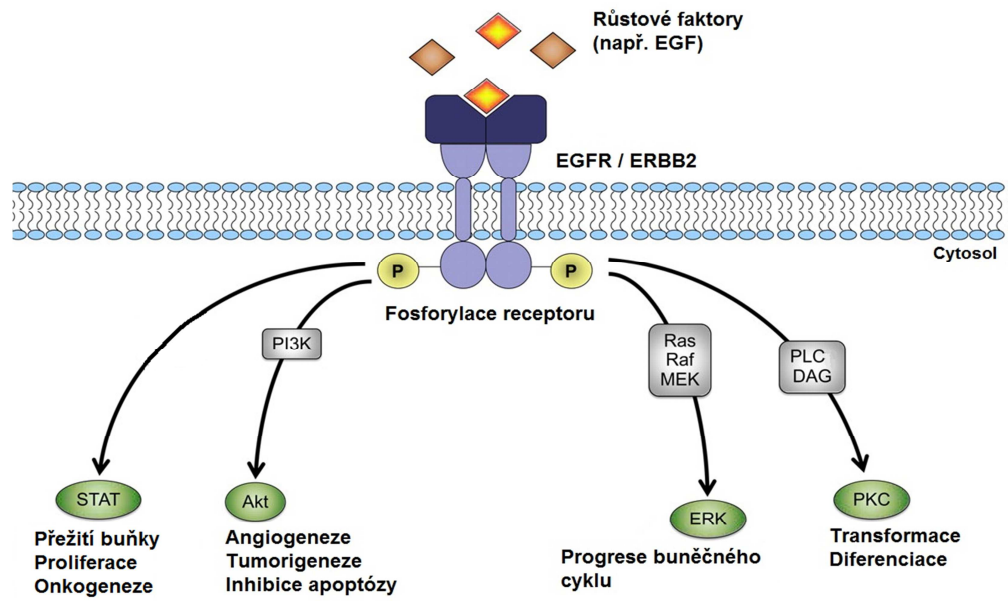
Dalším chaperonem ovlivňujícím karcinogenezi a účinnost léčby je mitochondriální TRAP1 (TNF receptor associated protein 1). Tento chaperon inhibuje enzymatickou funkci sukcinát dehydrogenázy v mitochondriálním respiračním komplexu II. Hromadění sukcinátu stabilizuje transkripční faktor indukovaný hypoxií HIF1 α (hypoxia inducible factor 1 α) a podporuje růst tumoru (Sciacovelli *et al.*, 2013). Inhibice sukcinát dehydrogenázy také zabraňuje vzniku reaktivních kyslíkových radikálů, TRAP1 má tedy antioksidanční a antiapoptotické účinky (Guzzo *et al.*, 2014). Na rozdíl od nepříznivého vlivu TRAP1 a výsledkům u jiných typů nádorů byla jeho zvýšená exprese u pacientek s ovariálním karcinomem asociována s delším přežíváním a také s vyšší expresí ER α (Aust *et al.*, 2012), který expresi TRAP1 aktivuje (O'Donnell *et al.*, 2005). Jeho funkce v ovariálních nádorech musí být dále specifikována.

ATOX1 (antioxidant protein 1) je chaperonový protein transportující měď a jiné kovy k membránovým transportérům ATP7A a ATP7B, čímž zajišťuje detoxikaci buňky a ochranu před vznikem reaktivních radikálů. Bylo dokázáno, že ATOX1 váže také platinové deriváty (Arnesano *et al.*, 2011). Studie na myších fibroblastech odhalila nižší akumulaci platinových derivátů u buněk s deletovaným *ATOX1*, což vedlo k mírné rezistenci k těmto léčivům a menší míře tvorby DNA aduktů (Safaei *et al.*, 2009). Další studie na embryonálních myších fibroblastech naznačila funkci ATOX1 jako transkripčního faktoru aktivovaného mědí, který spouští transkripci genů vyvolávajících proliferaci (Itoh *et al.*, 2008).

2.2.5 Proteiny signálních drah ovlivňujících prognózu

Dalším proteinem souvisejícím s prognózou ovariálního karcinomu je transmembránový tyrozinkinázový receptor EGFR (epidermal growth factor receptor). Tento receptor váže epidermální růstové faktory a skrze signální dráhy a aktivaci ERK (extracellular signal-regulated kinase), AKT (rac protein kinase α) a PKC (protein kinase C) kináz nebo STAT (signal transducer and activator of transcription) transkripčních faktorů vede k buněčné proliferaci, invazivitě, transformaci, angiogenezi a inhibici apoptózy (viz Obr. 12). Amplifikace genu EGFR byla identifikována u 12 % pacientek s ovariálním karcinomem a zvýšená hladina proteinu oproti zdravé tkáni u 17 % pacientek. Amplifikace i zvýšená exprese korelovala s vyšším gradem, velkým reziduem po chirurgickém zákroku a vysokou expresí proliferčního markeru Ki67 (Lassus *et al.*, 2006). Inhibice proteinu PKC, kinázy signální dráhy vedoucí od EGFR, vede k potlačení chemorezistence k platinových derivátům a taxanům u buněčných linií ovariálního karcinomu OV1228 rezistentních k těmto léčivům (Zhao *et al.*, 2012).

Tyrozinkinázovým receptorem pro epidermální růstové faktory je i protein ERBB2, který stejně jako EGFR vede k aktivaci signálních drah vedoucích k proliferaci, inhibici apoptózy, invazivitě a angiogenezi. Gen *ERBB2* je amplifikován u různého podílu pacientek s ovariálním karcinomem (viz kapitola 2.1.4 Terapie ovariálního karcinomu a chemorezistence). Amplifikace i zvýšená exprese *ERBB2* dle některých studií koreluje s kratším přežíváním (Slamon *et al.*, 1989).



Obr. 12: Signální dráhy receptorů pro epidermální růstové faktory a jejich funkce při vzniku a progresi nádoru. Převzato a upraveno dle Lee a Moon, 2011.

3 Cíle práce

- I. Studie genové exprese s cílem identifikovat nové prognosticky a terapeuticky významné geny ovariálního karcinomu
 - Studium hladiny genové exprese na úrovni transkriptu kandidátních genů v nádorové a kontrolní ovariální tkáni
 - Statistické vyhodnocení

- II. Stanovení hladiny proteinu s cílem posoudit vztah mezi množstvím proteinu a hladinou transkriptu, porovnat množství proteinu v kontrolní a nádorové tkáni, eventuálně posoudit vztah ke klinickým datům pacientek u vybraných prognostických genů ovariálního karcinomu
 - Stanovení množství proteinu v nádorové a kontrolní ovariální tkáni
 - Statistické vyhodnocení

- III. Studie genetické variability vybraných genů s cílem identifikovat nové dědičné prognosticky a terapeuticky významné jednonukleotidové polymorfizmy ovariálního karcinomu
 - Alelická diskriminace
 - Vysokorozlišující analýza křivek tání
 - Statistické vyhodnocení

- IV. Charakterizace ovariálního karcinomu na molekulární úrovni

4 Materiál a metody

Komerčně dodané chemikálie a roztoky jsou uvedeny v Tab. 3, připravované roztoky a jejich složení se nachází v Tab. 4. Seznam TaqMan[®] Gene Expression a TaqMan[®] SNP Genotyping Assays jsou uvedeny v Tab. 7 a Tab. 10, společně se zkratkami studovaných genů. Úprava pH se prováděla pomocí koncentrované HCl na pH metru WTW inoLab Level 1.

| Komerčně dodané chemikálie a roztoky | Výrobce |
|--|---------------------------------|
| 10x Reaction Buffer (Mg ²⁺ free) | Solis BioDyne |
| 10x Solution S | Solis BioDyne |
| 10x Taq buffer without Mg ²⁺ | Top-Bio |
| 25 mM MgCl ₂ | Top-Bio |
| 25 mM MgCl ₂ | Solis BioDyne |
| 5x HOT FIREPol [®] Probe qPCR Mix Plus (ROX) | Solis BioDyne |
| 6x Loading Dye Solution | Fermentas |
| ABCA2 Antibody | Proteintech [™] |
| Acrylamide 2X | Serva |
| Agarose (for molecular biology) | Sigma-Aldrich |
| Agilent RNA 6000 Nano Kit | Agilent Technologies |
| All Prep [®] DNA/RNA/Protein Mini Kit | QIAGEN |
| Amido Black 10B | Sigma-Aldrich |
| Ammonium Persulfate | Sigma-Aldrich |
| Anti-Rabbit IgG | Sigma-Aldrich |
| BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems |
| Blocker [™] BLOTTO in TBS | Thermo Fisher Scientific |
| Boric acid | Sigma-Aldrich |
| Bromophenol blue | Bio-Rad Laboratories |
| Butan-1-ol | Lach:ner |
| Casein Blocking Buffer | LI-COR [®] Biosciences |
| Chloroform p.a. | Lach:ner |
| Coomassie Blue R-250 | Bio-Rad Laboratories |
| dNTP Mix (20 mM of each, total 80 mM) | Solis BioDyne |
| EDTA | Sigma-Aldrich |
| Ethidium bromide solution | Sigma-Aldrich |
| Ethanol 96% | Lach:ner |
| Ethanol absolutní p.a. | Penta |
| ExoSAP-iT | Affymetrix |
| FirePol [®] DNA polymerase (5U/μl) | Solis BioDyne |
| Glycerin bezvodý p.a. | Lach:ner |
| Glycine | Sigma-Aldrich |
| Hi-Di [™] Formamide | Applied Biosystems |
| Hydroxid sodný mikroperly p.a. | Lach:ner |

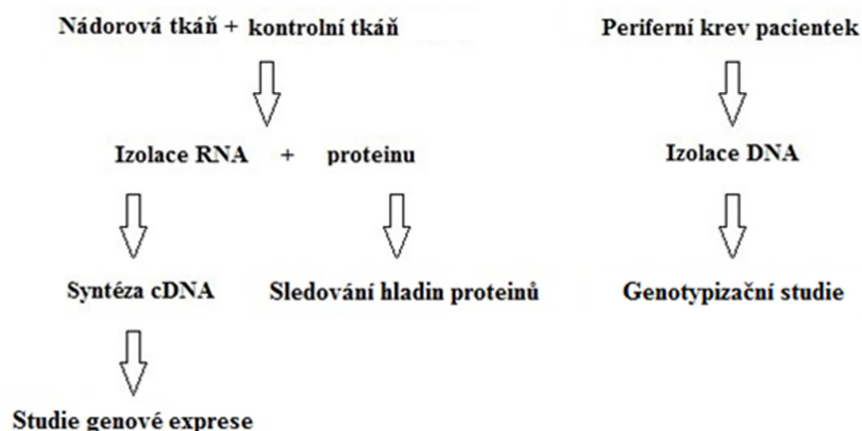
| | |
|---|---------------------------|
| IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit | LI-COR® |
| Kyselina chlorovodíková p.a. 35% | Lach:ner |
| Kyselina octová p.a. 99,8% | Lach:ner |
| Magnesium chloride dextrahydrate | Sigma-Aldrich |
| Methanol 100% | Sigma-Aldrich |
| N,N'-Methylene bisacrylamide | Serva |
| Nuclease-Free Water (Not DEPC Treated) | Ambion® |
| Odyssey® Blocking Buffer (PBS) | LI-COR® Biosciences |
| Odyssey® Blocking Buffer (TBS) | LI-COR® Biosciences |
| PCR dNTP mix (10 mM) | Top-Bio |
| Phenol solution, pH 8 | Sigma-Aldrich |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific |
| Ponceau S solution | Sigma-Aldrich |
| PRC1 Antibody | Novus Biologicals |
| Primery pro gen <i>ABCA2</i> | Sigma-Aldrich |
| Primery pro gen <i>PRC1</i> | Sigma-Aldrich |
| Primery pro gen <i>UBC</i> | Invitrogen™ |
| Proteinase K (≥ 30 U/mg) | Sigma-Aldrich |
| Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kit | Invitrogen™ |
| Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit | Invitrogen™ |
| RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit | Thermo Fisher Scientific |
| RNaseZap® RNase Decontamination Solution | Ambion® |
| Saccharose | Sigma-Aldrich |
| SEA BLOCK Blocking Buffer | Thermo Fisher Scientific |
| Sodium chloride | Sigma-Aldrich |
| Sodium Dodecyl Sulfate | Sigma |
| SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate | Thermo Fisher Scientific |
| Taq DNA Polymerase (5U/μl) | Top-Bio |
| Taq Purple polymerase (1 U/μl) | Top-Bio |
| TaqMan® Gene Expression Assay | Applied Biosystems |
| TaqMan® Genotyping Master Mix | Applied Biosystems |
| TaqMan® SNP Genotyping Assay | Applied Biosystems |
| Temed (min. 98,5%) | Serva |
| Tergitol® Type NP-9 (=Triton) | Fluka |
| Trizma® Base (Tris Base) | Sigma-Aldrich |
| TWEEN®20 | Sigma-Aldrich |
| HRM PCR Master Mix | QIAGEN |
| β-Actin Rabbit mAb | Cell Signaling Technology |
| β-mercaptoethanol 99% | Sigma-Aldrich |
| ΦX174 DNA-HaeIII Digest marker | New England Biolabs |

Tab. 3: Tabulka komerčně dodaných chemikálií a roztoků.

| Připravované roztoky | Složení |
|--------------------------------|---|
| 0,5 M EDTA; pH 8,0 | - |
| 10% APS (w/v) | - |
| 10% a 5% SDS (w/v) | - |
| 125 mM EDTA | - |
| 1 M Tris; pH 7,5 | - |
| 30% akrylamid | 29,2% akrylamid (w/v); 0,8% bis-akrylamid (w/v) |
| 3 M octan sodný | - |
| 5 M chlorid sodný | - |
| 70% ethanol (v/v) | - |
| Barvicí roztok Amido Black | 0,1% Amido Black 10B (w/v), 10% kyselina octová (v/v), 40% methanol (v/v) |
| Blotovací pufr | 25 mM Tris; 192 mM glycin + 10/20% methanol (v/v) |
| Coomassie Blue barvicí roztok | 0,1% Coomassie Blue R-250 (w/v); 40% methanol (v/v); 10% kys. octová (v/v) |
| Extrakční směs | fenol:chloroform = 1:1 |
| "Lower" pufr | 1,5 M Tris; pH 8,8 |
| Lyzační roztok | 0,32 M sacharóza; 50 mM MgCl ₂ .6H ₂ O; 12 mM Tris (pH 7,5); 1% Triton (v/v) |
| Marker ΦX174 DNA-HaeIII Digest | 1x Loading Dye Solution, 1x ΦX174 DNA-HaeIII Digest marker |
| Odbarvovací roztok | 25% methanol (v/v); 10% kys. octová (v/v) |
| PBS pufr | 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 |
| PBST pufr | PBS + 0,1% TWEEN [®] 20 (v/v) |
| Pufr pro nanášení vzorků (SLB) | 62,5 mM Tris (pH 6,8); 10% glycerol (v/v); 4% β-erkaptoethanol (v/v); 2% SDS (w/v); 2% bromfenolová modř (w/v) |
| Pufr pro proteinázu K | 375 mM NaCl; 0,12M EDTA (pH 8) |
| "Running" pufr | 25 mM Tris; 192 mM glycin; 1% SDS (w/v) |
| TBE pufr | 89 mM Tris; 89 mM kys. boritá; 2 mM EDTA |
| TBS pufr | 25 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,4–7,5 |
| TBST pufr | TBS + 0,1% TWEEN [®] 20 (v/v) |
| "Upper" pufr | 0,5 M Tris; pH 6,8 |

Tab. 4: Tabulka připravovaných roztoků.

Pro lepší přehlednost postupu práce slouží schéma znázorněné na Obr. 13.



Obr. 13: Zjednodušené schéma posloupnosti práce.

4.1 Příprava biologického materiálu

4.1.1 Odběr materiálu, informovaný souhlas pacientek, klinická data

Ve studii byl použit biologický materiál celkem od 112 pacientek odebraný během let 2009–2013. Jednalo se o 57 vzorků nádorové tkáně a 98 vzorků periferní krve pacientek s ovariálním karcinomem. Ve studii bylo využito také 14 vzorků kontrolní ovariální tkáně od pacientek, které podstoupily chirurgický zákrok z jiného důvodu, než je ovariální karcinom. Všechny pacientky byly operovány v pražské Fakultní nemocnici Motol na onkogynekologickém oddělení Prof. MUDr. Lukáše Roba, CSc, a po zákroku podstoupily léčbu adjuvantní chemoterapií na bázi platinového derivátu a paklitaxelu. Jejich stav byl nadále sledován. Zamražené vzorky tkáně a krve byly po odebrání a histopatologické analýze transportovány na Oddělení toxikogenimoky SZÚ a uloženy při -80 °C (tkáň) a -20 °C (krev). Spolu s biologickým materiálem byla získána také klinická data pacientek pro statistickou analýzu. Od všech žen, s jejichž materiálem se po odběru dále pracovalo, byl získán informovaný souhlas o zařazení do studie.

4.1.2 Drcení tkáně, izolace RNA a proteinu

Veškerá práce s tkáněmi a RNA byla prováděna v laminárním boxu (CleanAir Biohazard, Gemini^{BV}, Apeldoorn-Nizozemí) za použití sterilních nástrojů a certifikovaného plastu bez RNáz a DNáz, aby se předešlo možným kontaminacím a degradaci nukleových kyselin. Kovové nástroje a porcelánové misky s tloučky byly předem zabaleny do alobalu

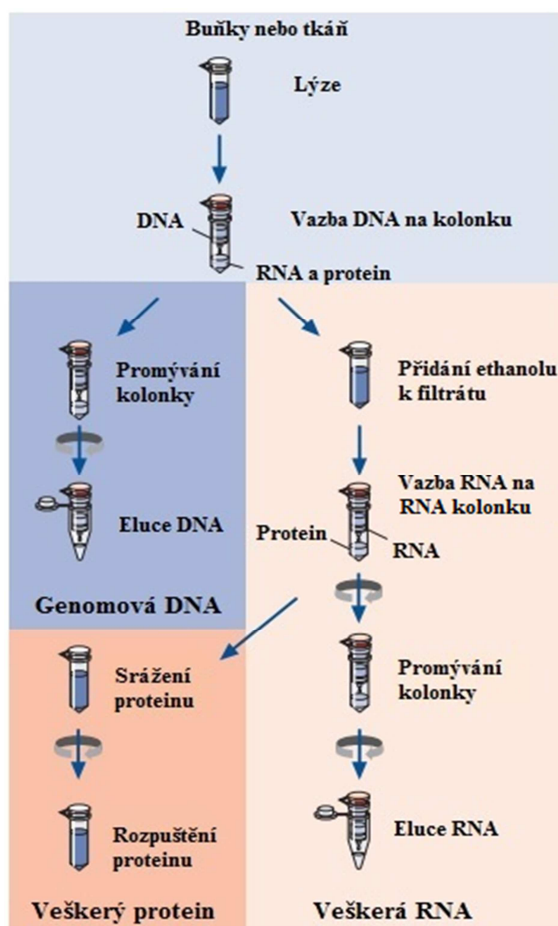
a sterilizovány 2 hodiny při 180 °C v horkovzdušné sušárně. Plastové zkumavky byly sterilizovány 5 hodin při 120 °C. Při práci byly použity sterilní špičky s filtry z důvodu důkladnější eliminace možnosti kontaminace.

Izolace RNA a proteinu se prováděla pomocí komerčně dodaného AllPrep[®] DNA/RNA/Protein Mini Kitu od QIAGEN, který umožňuje simultánní purifikaci genomové DNA, celkové RNA (delší než 200 nk) a proteinu na principu vazby nukleových kyselin na silikátové filtry.

Pro izolaci z nádorové a kontrolní ovariální tkáně bylo použito přibližně 20–30 mg vzorku, který byl v porcelánové misce, za přítomnosti kapalného dusíku (aby nedošlo k rozmrazení tkáně a poškození RNA), pomocí tlučku podrcen na jemný prášek. Podrcená tkáň byla přenesena do 600 µl lyzačního RLT pufru s přidaným β-merkptoethanolem (10 µl β-merkptoethanolu na 1 ml RLT pufru) pro efektivní inaktivaci RNáz, a poté byl jemný prášek v pufru homogenizován špičkou. RTL pufr obsahuje vysokou koncentraci chaotropních solí sloužících k lýzi buněk a denaturaci proteinů, včetně nukleáz a proteáz. Lyzát byl dále uchován při –80 °C (lze ho takto uchovávat až 30 dní), nebo okamžitě zpracován.

Následující postup se prováděl při pokojové teplotě (room temperature, RT) a jeho zjednodušené schéma je znázorněno na Obr. 14. Nejprve byl lyzát centrifugován 3 minuty při 21 382 g, poté byl supernatant přenesen do AllPrep DNA kolonky se silikátovým filtrem umístěné ve 2 ml sběrné zkumavce a centrifugován 1 minutu při 13 684 g. DNA kolonka s navázanou DNA se v nové sběrné zkumavce uschovala do 4 °C pro pozdější purifikaci genomové DNA, která však pro účely této studie nebyla využita. K filtrátu bylo přidáno 430 µl absolutního ethanolu, který spolu s vysokým obsahem chaotropních solí v RLT pufru vytváří vhodné podmínky pro navázání RNA na silikátový filtr kolonky. Po promíchání filtrátu s ethanolem byla odebrána část roztoku, která se přenesla do RNA kolonky ve sběrné zkumavce a byla centrifugována 30 sekund při 13 684 g. Tento krok se opakoval dokud se nepřefiltroval veškerý filtrát s přidaným ethanolem. Vzniklý filtrát byl přenesen do 2 ml zkumavky a uschován pro pozdější purifikaci proteinu. Do RNA kolonky s navázanou RNA bylo přidáno 700 µl RW1 pufru, který obsahuje ethanol a guanidinové soli a funguje jako silný odmyvací pufr zbavující filtr nespecificky navázaných biomolekul, jako jsou karbohydráty, mastné kyseliny nebo proteiny. Zároveň však zanechává na filtru navázanou RNA větší než 200 nk. RNA kolonka s RW1 pufrům vložená do sběrné zkumavky byla centrifugována 30 sekund při 13 684 g. Filtrát s nečistotami se odstranil a do kolonky vložené

ve sběrné zkumavce bylo přidáno 500 µl RPE pufru s přidáním ethanolu (11 ml ethanolu na 44 ml RPE pufru). RPE pufr je slabý odmývací pufr sloužící k odstranění zbytku solí na kolonce po použitých pufrch. Kolonka s RPE pufr byla centrifugována 30 sekund při 13 684 g. Nepotřebný filtrát se odstranil a opět bylo do kolonky se sběrnou zkumavkou přidáno 500 µl RPE pufru a centrifugováno 2 minuty při 13 684 g. Filtrát byl vylit a kolonka se sběrnou zkumavkou se centrifugovala 1 minutu při 21 382 g pro úplné odstranění odmývacího pufru. RNA kolonka byla vložena do nové sběrné zkumavky, přímo na filtr bylo přidáno 30 µl ultračisté vody bez nukleáz (nuclease-free water, NFW), která uvolní navázanou RNA ze silikátového filtru, a centrifugovalo se 1 minutu při 13 684 g. Na filtr bylo opět přidáno 30 µl NFW, kolonka se inkubovala 1 minutu při RT a byla centrifugována 1 minutu při 13 684 g. RNA obsažená v 60 µl filtrátu byla zamrzena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 14: Zjednodušené schéma purifikace DNA, RNA a proteinu pomocí AllPrep[®] DNA/RNA/Protein Mini Kitu od firmy QIAGEN. Převzato a upraveno dle QIAGEN – AllPrep[®] DNA/RNA/Protein Mini Handbook.

Precipitace celkového proteinu se prováděla při pokojové teplotě v pre-PCR laboratoři z filtrátu uschovaného pro purifikaci proteinu. Nejprve byl k filtrátu přidán 1 ml precipitačního APP pufru, roztok byl důkladně promíchán a inkubován 10 minut při RT. Následně se roztok centrifugoval 10 minut při 21 382 g a supernatant byl odstraněn. K peletě bylo přidáno 500 μ l 70% ethanolu pro odstranění solí a následnou rehydrataci, centrifugovalo se 1 minutu při 21 382 g a supernatant byl opět odstraněn. Následně se peleta vysušila v pokojové teplotě (5–10 minut). K peletě bylo dle její velikosti přidáno 100–200 μ l 5% dodecylsírany sodného (sodium dodecyl sulfate, SDS). Za pomoci mechanického rozbíjení pipetou a následné inkubace po dobu 5 minut při 95 °C v termobloku byla peleta rozpuštěna. Obsah zkumavky byl centrifugován 1 minutu při 21 382 g, aby se usadily nerozpuštěné zbytky proteinu. Supernatant obsahující rozpuštěné proteiny byl zamrazen na -20 °C.

4.1.3 Izolace DNA ze zmražené periferní krve

Pro genotypizační analýzu bylo izolováno 98 vzorků DNA ze zmražené periferní krve pacientek s ovariálním karcinomem. Izolace DNA probíhala pomocí fenol-chloroformové metody, která je založená na denuraci a srážení proteinu v hydrofóbní organické fázi a disociaci DNA ve vodné fázi. Rozpuštěná DNA se poté precipituje a promývá (Topic a Gluhak, 1991). Izolaci touto metodou prováděl pan Stanislav Horský.

Nejprve bylo 5 ml rozmražené a dobře promíchané krve přeneseno do sterilní plastové zkumavky na ledové lázni, ke které se přidalo 8 ml lyzačního roztoku pro destrukci buněk. Zkumavky byly umístěny na 10 minut na rotátor a poté ponechány 30 minut při 4 °C, kde byly každých 10 minut promíchány. Lyzát se následně centrifugoval 15 minut při 3 421 g a 4 °C, supernatant se odstranil, přidaly se 4 ml sterilní vychlazené destilované vody, peleta byla promícháním uvolněna a opět centrifugována 15 minut při 3 421 g a 4 °C. Tento krok se opakoval, dokud se peleta nepromyla natolik, že byla bílá a roztok bezbarvý. Další postup se již prováděl při RT. Supernatant byl odstraněn a k peletě se přidalo 800 μ l pufru pro proteinázu K, ve kterém byla peleta rozmělněna. Následně se přidalo 25 μ l roztoku proteinázy K (20 mg/ml), obsah zkumavky byl promíchán, přidalo se 100 μ l 10% SDS, 1 ml 5M NaCl a 2,4 ml sterilní destilované vody a zkumavka byla na 10 minut ponechána na rotátoru. V tomto prostředí má proteináza K vysokou aktivitu a může tak účinně štěpit proteiny včetně nukleáz přítomných v lyzátu (Ebeling *et al.*, 1974). Po promíchávání bylo přidáno 2,5 ml extrakčního roztoku (fenol:chloroform, 1:1), který se připravuje před použitím, a zkumavka se

umístila na 15 minut na rotátor. Extrakční roztok je nemísitelný s vodou, ve zkumavce se tedy vytvoří 2 fáze, horní vodná a spodní organická hydrofobní. Na rotátoru dochází k mísení fází, fenol sráží proteiny, které přecházejí do organické fáze, a nukleové kyseliny zůstávají ve vodné fázi (při zásaditém pH roztoku). Po odejmutí z rotátoru byla zkumavka centrifugována 15 minut při 3 421 g a 4 °C, aby došlo k úplnému oddělení fází. Ze zkumavky byla odebrána horní čirá vodná fáze do nové sterilní zkumavky se 4 ml vychlazeného 96% ethanolu pro dehydrataci, a bylo s ní otáčeno do vytvoření viditelných vláken nukleové kyseliny. Zkumavky byly ponechány přes noc při -20 °C, aby došlo k důkladnému vysrážení DNA.

Následující den byl obsah zkumavky promíchán a centrifugován 15 minut při 3 421 g a 4 °C. Supernatant se opatrně odstranil, přidaly se 2 ml vychlazeného 70% ethanolu pro odstranění solí (a následnou rehydrataci) a obsah zkumavky se krátce rozmíchal na vortexu. Poté byl obsah opět centrifugován 15 minut při 3 421 g a 4 °C, supernatant odstraněn a peleta se nechala sušit několik hodin při RT, dokud neměla průhlednou gelovou konzistenci. Následně se peleta ve zkumavce rozpustila v 0,5 ml sterilní destilované vody, ponechala se na rotátoru do rozpuštění vláken DNA a přes noc byla uschována ve 4 °C. Následující den byl obsah zkumavky centrifugován 1 minutu při 3 421 g a 4 °C, roztok se přepipetoval do zásobních štoků a skladoval se při -20 °C.

4.1.4 Měření koncentrace RNA

Ke kvantifikaci RNA byl využit komerčně dodaný Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent Kit, který umožňuje měření koncentrace RNA na principu vazby fluorescenčního reagentia k nukleovým kyselinám. Tato metoda je mnohonásobně citlivější a specifitější, než kvantifikace měřením absorbance, jelikož se eliminuje absorbance kontaminant, jako jsou proteiny a nukleotidy běžně obsažené ve vzorcích. Součástí sady je také 20x koncentrovaný TE pufr (Tris-EDTA) bez RNáz a ribozomální RNA standard (16S a 23S rRNA z *E.coli*). Při měření byla využita tzv. „high-range assay“, která kvantifikuje množství RNA v rozmezí 20 ng/ml–1 µg/ml.

Příprava pracovních roztoků a práce s RNA se prováděla v laminárním boxu se sterilními nástroji a plastem ve vychlazených stojácích. Pracovní roztoky byly připraveny několik hodin před měřením, 20x TE pufr se 20x ředil v NFW a RiboGreen barva 200x v 1x TE pufru. Barvu bylo nutné chránit před světlem, aby se zabránilo její fotodegradaci. RNA standard (100 µg/ml) byl ředěn 50x v 1x TE pufru pro dosažení koncentrace pracovního

roztoku 2 µg/ml. Nejprve byla na tmavou měřicí destičku napipetována ředící řada pracovního roztoku RNA standardu dle následující Tab. 5.

| Pozice na destičce | 1x TE (µl) | RNA standard, 2 µg/ml (µl) | Pracovní roztok RiboGreen barvy (µl) | RNA koncentrace (ng/ml) |
|--------------------|------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| A1 | 0 | 100 | 100 | 1000 |
| A2 | 50 | 50 | 100 | 500 |
| A3 | 90 | 10 | 100 | 100 |
| A4 | 98 | 2 | 100 | 20 |
| A5 | 100 | 0 | 100 | 0 („blank“) |

Tab. 5: Ředící řada ribozomálního RNA standardu.

Do jamek pro měřené vzorky bylo napipetováno 90 µl 1x TE pufru, 10 µl 200x ředěné RNA v 1x TE pufru a 100 µl pracovního roztoku RiboGreen barvy (konečné ředění vzorků bylo 4000x). Barva byla pipetována do všech jamek na destičce jako poslední, aby se zabránilo její fotodegradaci. Všechny vzorky včetně RNA standardu byly připraveny v duplikátech pro zpřesnění měření.

Před vlastním měřením byla destička ponechána 10 minut ve tmě na třepačce, aby se všechny komponenty v jamkách promíchaly. Poté byla změřena intenzita fluorescence na spektrofluorometru Infinite M200 (Tecan, Grodig-Rakousko) při excitační vlnové délce 480 nm a emisní vlnové délce 520 nm. Ze změřených intenzit se odečetla hodnota pozadí („blank“) a z ředící řady RNA standardu byla vytvořena standardní regresní přímka s rovnicí, ze které byly vypočítány koncentrace jednotlivých vzorků.

4.1.5 Měření koncentrace DNA

Kvantifikace DNA se prováděla pomocí komerčně dodaného Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent Kit, obsahujícího 20x TE pufr, PicoGreen dsDNA barvu a Lambda DNA standard (100 µg/ml). Používaná fluorescenční barva se váže pouze na dvouvláknovou DNA, metoda tedy eliminuje příspěvek kontaminant, včetně RNA či jednovláknové DNA. Uvedená sada funguje na stejném principu jako Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent Kit (viz kapitola 4.1.4 Měření koncentrace RNA). Pro měření se využila tzv. „high range assay“ a postup byl stejný jako v případě měření koncentrace RNA, vzorky DNA se však ředily 100x a finální

ředění vzorků bylo tedy 2000x. Kvantifikaci DNA z periferní krve prováděl pan Stanislav Horský.

4.1.6 Měření koncentrace proteinu

Koncentrace celkového proteinu z nádorové a kontrolní tkáně, purifikovaného pomocí AllPrep Kit, byla měřena pomocí komerčně dodaného Pierce™ BCA Protein Assay Kit od Thermo Fisher Scientific. Tato sada umožňuje kolorimetrickou detekci a kvantifikaci proteinu založenou na reakci kyseliny bicinchoninové (bicinchoninic acid, BCA) s jednomocnými kationty mědi. V alkalickém prostředí dochází působením proteinů k redukci Cu^{2+} na Cu^+ , množství redukovaných iontů mědi tedy pozitivně koreluje s množstvím proteinu v roztoku. Následně molekuly BCA vychytávají v roztoku Cu^+ (vždy 2 molekuly BCA na 1 molekulu Cu^+) za tvorby fialového rozpustného komplexu s absorbcí při 562 nm. Množství fialového komplexu koreluje s množstvím proteinu (Smith *et al.*, 1985).

Nejprve byla připravena ředící řada standardu o známé koncentraci v destilované vodě. Jako standard se použil hovězí sérový albumin (bovine serum albumin, BSA), který je součástí použité sady, ředěný geometrickou řadou s kvocientem 2 do 8 zkumavek tak, aby v každé na konci zbylo 25 μl roztoku. 9. zkumavka obsahovala pouze vodu a sloužila jako „blank“. Dále bylo připraveno 25 μl 10x ředěného vzorku v NFW. Pracovní roztok se připravil smísením BCA Reagent A (obsahuje BCA) a B (obsahuje síran měďnatý) v poměru 50:1. Ke standardům i vzorkům bylo přidáno 200 μl pracovního roztoku (celkové ředění vzorků 90x), vše bylo promícháno a po 95 μl rozpipetováno na průhlednou destičku s 96 jamkami. Destička byla následně inkubována 30 minut při 37 °C, jelikož redukce Cu^{2+} lépe probíhá za zvýšené teploty, a kvantifikace je tedy senzitivnější. Po inkubaci se destička do 10 minut změřila na přístroji Infinite M200 při absorbcanci 562 nm. Ze změřených hodnot se odečetlo pozadí, z ředící řady standardu byla vytvořena kalibrační přímka s regresní rovnicí a z ní byly vypočítané koncentrace vzorků.

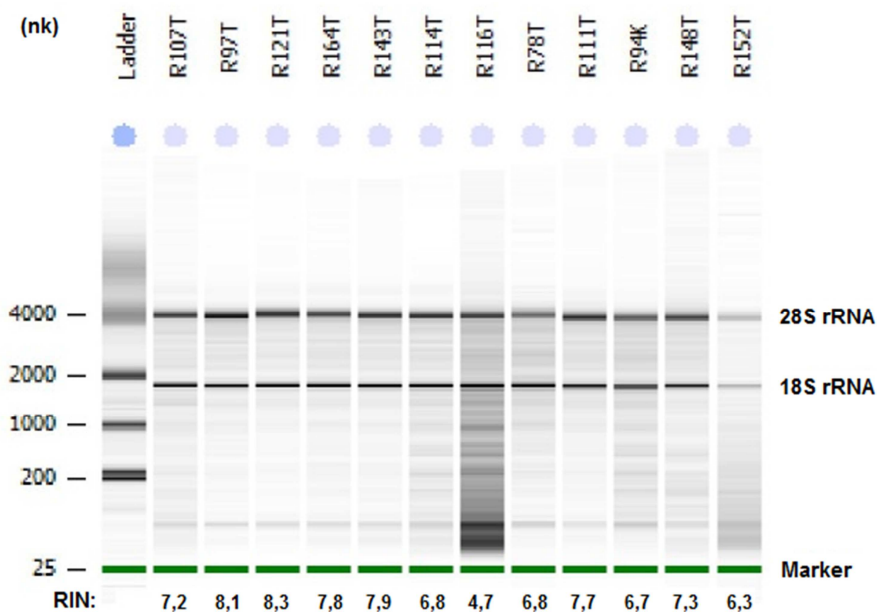
4.1.7 Kontrola kvality RNA

Během manipulace s RNA může dojít k jejímu poškození RNázami, což může značně znehodocovat výsledky analýz, proto byla kvalita RNA kontrolována měřením hodnoty RIN (RNA integrity number) pomocí komerčně dodaného Agilent RNA 6000 Nano Kit na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie-USA). Použitý přístroj funguje na principu mikrokapilární elektroforézy a fluorescenční detekce, tedy na

základě separace fluorescenčně značené RNA v gelu podle molekulové hmotnosti fragmentů a následné detekci laserem navozené fluorescence, jejíž intenzita koreluje s množstvím RNA o dané velikosti. Hodnota RIN čísla je vypočítána pomocí algoritmu zahrnujícího intenzity fluorescence 28S rRNA a 18S rRNA. RIN číslo se pohybuje mezi 1–10 (úplně degradovaná RNA–intaktní RNA) (Schroeder *et al.*, 2006).

Práce se vzorky a RNA standardem/žebříčkem se do vytvoření pracovních alikvótů prováděla v laminárním boxu na chladicím stojánku. Nejprve byly RNA vzorky upraveny ředěním v NFW na koncentraci 25–500 ng/μl, následně byly i se standardem denaturovány 2 minuty při 70 °C a poté ihned zchlazeny. Sada se nechala vytemperovat na pokojovou teplotu a poté byl připraven gel. Potřebné množství gelu bylo nanášeno na zkumavku s filtrem a centrifugováno 10 minut při 1 520 g a RT. RNA barva byla promíchána na vortexu a zcentrifugována na stolní minicentrifuze. K přefiltrovanému gelu bylo přidáno příslušné množství barvy (1 μl barvy na 65 μl gelu), poté byl gel promíchán na vortexu, centrifugován 10 minut při 18 626 g a RT a ponechán ve tmě, aby se zabránilo fotodegradaci barvy. Pro měření byly využity RNA Nano čipy dodané firmou Agilent Technologies. Na čip bylo dle pokynů výrobce nanášeno 27 μl gelu s barvou, do jamek pro vzorky a RNA žebříček 5 μl markeru pro kalibraci a 1 μl každého vzorku a standardu. Obsah čipu byl 1 minutu míchán na vortexu a poté byl do 5 minut změřen. Před vlastním měřením byly elektrody bioanalyzáru vyčištěny pomocí RNaseZap a NFW v elektrody-čisticím čipu. Mezi jednotlivými měřeními se elektrody vždy očistily NFW.

Kvalita RNA byla zkontrolována u 32 náhodně vybraných vzorků (příklad výsledku analýzy je uveden na Obr. 15). Všechny měřené vzorky měly $RIN \geq 4$ (průměr 7,1), byly tedy ve studii ponechány.



Obr. 15: Příklad výsledku měření RIN z přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer. RNA byla elektroforeticky separována dle velikosti, nejprve byla detekována fluorescence markeru (25 nk), malých RNA a poté 18S rRNA (2000 nk) a 28S rRNA (4000 nk). Pro určení velikosti jednotlivých RNA fragmentů slouží RNA žebříček. Pod jednotlivými vzorky jsou uvedeny RIN hodnoty.

4.1.8 Syntéza cDNA

Komplementární DNA neboli cDNA (complementary DNA) je DNA syntetizovaná dle RNA templátu (je k němu tedy komplementární), za využití RNA dependentní DNA polymerázy v reakci nazývané reverzní transkripce. Pro syntézu cDNA byl využit komerčně dodaný RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit umožňující syntézu jednovláknové cDNA o velikosti až 13 kb.

Práce s RNA a reagensii sady se prováděla v laminárním boxu na chladicím stojánku. Pro syntézu cDNA bylo použito 0,5 µg RNA. Do zkumavky bylo napipetováno příslušné množství RNA, 1 µl Random Hexamer Primer (100 µM) a objem roztoku byl doplněn do objemu 14 µl pomocí NFW. Byla vytvořena také negativní kontrola bez templátu za účelem odhalení případné kontaminace používaných reagensii, s touto kontrolou bylo zacházeno jako s ostatními vzorky. Obsah zkumavek byl promíchán, zcentrifugován na stolní minicentrifuze a inkubován 5 minut při 70 °C, aby došlo k rozvolnění sekundárních struktur RNA. Zkumavky se po inkubaci ihned ochladily na chladicím stojánku, zcentrifugovaly se na minicentrifuze a bylo do nich přidáno 7 µl reakční směsi o následujícím složení:

| | |
|-----------|--|
| 4 μ l | 5x Reaction Buffer |
| 2 μ l | 10 mM dNTP Mix |
| 1 μ l | RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ l) |

Obsah zkumavek byl promíchán, zcentrifugován na minicentrifuze a inkubován 5 minut při RT. Poté se zkumavky ihned ochladily na chladicím stojánku a znovu zcentrifugovaly. Z každé zkumavky se odebraly 2 μ l jako negativní kontrola DNA kontaminace, do kterých nebyla přidána reverzní transkriptáza RevertAid (200 U/ μ l), jinak se s nimi zacházelo jako s ostatními vzorky. Do ostatních zkumavek byl k 19 μ l vzorku a ostatních komponent přidán 1 μ l reverzní transkriptázy. Finální složení 20 μ l reakční směsi bylo následovné:

| | finální koncentrace |
|--|------------------------|
| NFW | - |
| 100 μ M Random Hexamer Primer | 50 μ M |
| 5x Reaction Buffer | 1x |
| 10 mM dNTP Mix | 1 mM |
| RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ l) | 20 U |
| RevertAid (200 U/ μ l) | 200 U |
| RNA | 0,025 μ g/ μ l |

Zkumavky byly následně inkubovány 10 minut při RT a poté 60 minut při 42 °C, což je optimální teplota pro aktivitu RevertAid reverzní transkriptázy působící také jako RNáza H specificky degradující RNA ve vzniklých RNA-cDNA hybridních řetězcích. Reakce byla ukončena inkubací 10 minut při 70 °C a vzorky byly zamrazeny na -20 °C.

4.1.8.1 Kontrola kontaminace a kvality cDNA

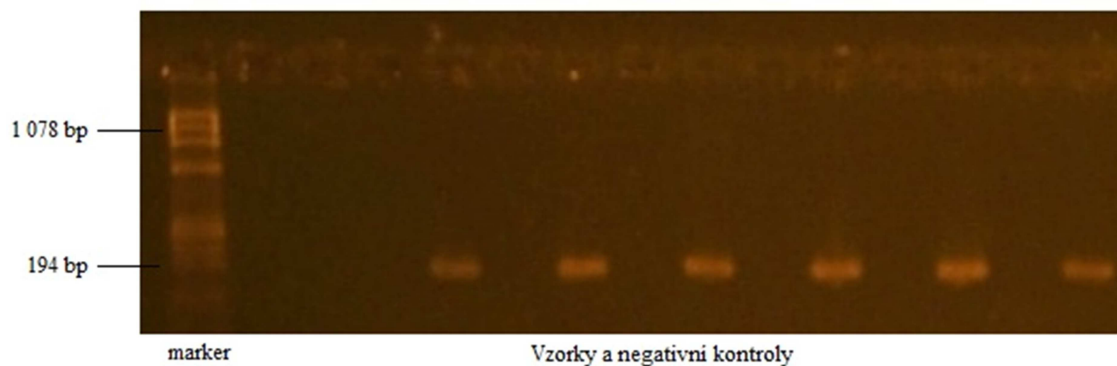
Kontrola přítomnosti cDNA a kontaminace genomovou DNA byla provedena amplifikováním úseku kontrolního, tzv. housekeepingového genu *UBC* pro ubiquitin C, který je exprimován ve všech tělních tkáních (PROTEIN ATLAS, URL6), a následnou separací PCR produktů na gelové elektroforóze. Primery byly navrženy tak, aby amplifikovaný úsek zahrnoval intron genu *UBC*, přední (forward) primer byl umístěn do exonu 1, zpětný (reverse) primer do exonu 2. Produkt genomové DNA měl délku 1 009 párů bazí (base pair, bp) zahrnující intron, v případě čisté cDNA došlo pouze k amplifikaci reverzně transkribované mRNA, tedy 2 exonů, a délka produktu byla 190 bp (Soucek *et al.*, 2005). Kontrolou kontaminace prošly všechny nově syntetizované vzorky cDNA a kontroly.

Práce s cDNA se prováděla v čisté pre-PCR laboratoři se sterilními nástroji a plastem, vzorky byly během práce umístěné na chladicím stojánku. Pro reakci byly použity chemikálie od firmy Top-Bio a primery od Invitrogen (přední 5'-ATTTGGGTCGCAGTTCTTGT-3'; zpětný 5'-TCCAGCAAAGATCAGCCTCT-3'). PCR reakce probíhala v destičce s 96 jamkami, do kterých bylo napipetováno 9,5 µl reakční směsi a 0,5 µl cDNA. Konečné složení 10 µl reakční směsi bylo následovné:

| | | finální koncentrace |
|------------|-----------------------------------|---------------------|
| 6,9 µl | NFW | - |
| 1 µl | 10x Taq pufr bez Mg ²⁺ | 1x |
| 0,4 µl | 25 mM MgCl ₂ | 1 mM |
| 0,2 µl | PCR dNTP mix (10 mM) | 0,2 mM |
| 2x 0,25 µl | primery F+R (10 µM) | 2x 0,25 µM |
| 0,5 µl | Taq Purple polymeráza (1 U/ µl) | 0,5 U |
| 0,5 µl | cDNA | - |

Reakce byla provedena v PCR cykleru GeneAmp[®] PCR System 9700 od Applied Biosystems s nastaveným programem: 5 minut při 94 °C; 38x 30 sekund při 94 °C, 30 sekund při 64 °C a 30 sekund při 72 °C; 5 minut při 72 °C a 10 °C do vypnutí přístroje.

Po dokončení amplifikace byly PCR produkty elektroforeticky separovány na 3% agarózovém gelu v 0,5x koncentrovaném TBE pufru (tris-borát-EDTA). Jako marker bylo použito 8 µl roztoku 6x koncentrovaného ΦX174 DNA – Hae III Digest a 6x Loading Dye Solution v NFW. Vzorky byly elektroforeticky separovány necelou hodinu při napětí 120 V a proudu cca 100 mA. Poté byl gel 15 minut barven v roztoku ethidium bromidu, opláchnut v destilované vodě a vyfotografován fotoaparátem. Příklad vyfotografovaného gelu je na Obr. 16. U kontrolních vzorků absence DNA produktu signalizuje, že během izolace RNA nedošlo ke kontaminaci vzorku DNA. Přítomnost produktu odpovídajícího velikosti 190 bp u cDNA vzorků ukazuje na správně provedenou syntézu cDNA. V případě kontaminace genomovou DNA (tj. výskytu pruhu o velikost 1 009 bp), nebo při nepřítomnosti 190 bp pruhu by tyto vzorky musely být ze studie vyřazeny.



Obr. 16: Vyfotografovaný gel s PCR produkty a negativními kontrolami obarvený ethidium bromidem. Na gelu jsou viditelné pruhy o velikosti 190 bp, odpovídající požadovaným produktům. V případě kontaminace by byly viditelné i pruhy o velikosti 1 009 bp. U negativních kontrol se žádné pruhy nevyskytují.

Kvalita cDNA pro qPCR (quantitative PCR) byla dále kontrolována amplifikací kontrolního genu *PPIA* pro protein peptidylprolyl izomerázu A. Tento gen je stejně jako *UBC* exprimován ve všech tělních tkáních (PROTEIN ATLAS, URL7). qPCR se prováděla za použití TaqMan Gene Expression Assay, která obsahuje pár neznáčených primerů a sondu s reportérovou značkou a zhášedčem (viz kapitola 4.2 Studie genové exprese). Pro reakci byl použit HOT FIREPol[®] Probe qPCR Mix Plus (ROX) od firmy Solis BioDyne, který obsahuje všechny zbývající komponenty nutné pro qPCR reakci. Reakce probíhala v 0,1 ml zkumavkách, do kterých bylo napipetováno 2,5 μ l 2,5x ředěné cDNA v NFW a 7,5 μ l reakční směsi. Konečné složení 10 μ l reakční směsi bylo následovné:

| | | finální koncentrace |
|-------------|---|---------------------|
| 5 μ l | NFW | - |
| 0,5 μ l | TaqMan Gene Expression Assay (20x) pro <i>PPIA</i> | 1x |
| 2 μ l | 5x HOT FIREPol [®] Probe qPCR Mix Plus (ROX) | 1x |
| 2,5 μ l | 2,5x ředěná cDNA | - |

Všechny vzorky byly vytvořeny v duplikátu pro větší přesnost. Byla vytvořena také kontrola bez cDNA pro případné odhalení kontaminace, která místo vzorku obsahovala 2,5 μ l NFW, a kalibrační vzorek o známé expresi pro kontrolu správně proběhlé reakce. qPCR byla provedena na přístroji RotorGene 600 (Corbett Life Science, Sydney-Austrálie) s nastaveným programem: 2 minuty při 58 °C; 10 minut při 95 °C; 50x 15 sekund při 95 °C a 1 minutu při 58 °C.

Výstupem z qPCR jsou hodnoty kvantifikačního cyklu C_q (quantification cycle), které odpovídají cyklu reakce, ve kterém fluorescenční signál stoupl nad prahovou hodnotu.

Hodnota C_q negativně koreluje s množstvím vstupního materiálu reakce. Po dokončení qPCR se odečetly hodnoty C_q a v případě, že by vzorky měly průměr C_q vyšší než 25, byla by opakována analýza kvantity a kvality, případně by tyto vzorky ze studie byly vyřazeny.

4.2 Studie genové exprese

Pro pilotní studii provedenou na Oddělení toxikogenomiky SZÚ Mgr. Kateřinou Elsnerovou v letech 2013–2014 bylo na základě literatury vybráno 94 genů (jejich seznam je uveden v Příloze I), jejichž produkty se účastní transportu, metabolismu nebo mechanismu funkce platinových derivátů a taxanů, buněčného cyklu a signalizace, a mohou souviset nebo souvisí s progresí nádorů a mnohočetnou lékovou rezistencí. U vybraných genů byla změřena hladina exprese na úrovni mRNA v nádorové a kontrolní ovariální tkáni na souboru 60 pacientek a 14 žen bez maligního onemocnění vaječníku. Výsledky byly následně statisticky vyhodnoceny v softwaru REST 2009 (QIAGEN, Hilden-Německo), kde byla porovnána hladina exprese v kontrolní a nádorové tkáni, a v softwaru SPSS v16.0 (Inc., Chicago, IL-USA), kde byla exprese porovnána s klinickými daty pacientek. Kandidátní geny pro validační studii provedenou na nezávislém souboru 57 pacientek byly vybrány na základě signifikantní korelace genové exprese s klinickými daty (souhrn signifikantních výsledků pilotní studie je uveden v Tab. 6).

V pilotní studii byly hodnoceny vztahy genové exprese k následujícím klinickým údajům: histologický typ ovariálního karcinomu, grade, stadium onemocnění, exprese proteinového markeru Ki67 (%) a jeho hodnoty rozdělené podle hranice 15 % („cut off“) na 2 skupiny pacientek a doba do progresu. Doba do progresu (time to progression, TTP) byla definována jako doba od operace do progresu, relapsu nebo úmrtí v měsících. Faktoriální data se hodnotila Kruskal-Wallis a jednofaktorovým ANOVA testem pro zjištění směru vztahu. Spojitá data byla hodnocena Spearman testem a TTP pomocí Kaplan-Meier testu a signifikance metodou Log Rank.

| SPSS | | | | REST 2009* | |
|----------------------------------|-----------------|-----------|--|--|-----------|
| Klinická data | Gen | p-hodnota | Pozitivní/negativní korelace exprese s klinickými daty | Změna exprese v nádorové vs. kontrolní tkáni | p-hodnota |
| HGSC vs. ostatní typy | <i>ABCA12</i> | 0,008 | + | zvýšená exprese | 0,038 |
| | <i>ABCC3</i> | 0,015 | + | zvýšená exprese | < 0,001 |
| | <i>ABCC6</i> | 0,015 | + | bez změny | - |
| | <i>ABCD3</i> | 0,007 | + | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>ABCG1</i> | 0,038 | + | bez změny | - |
| | <i>ESR2</i> | 0,021 | + | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>ERBB2</i> | 0,050 | + | bez změny | - |
| | <i>MLH3</i> | 0,044 | + | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>NR0B2</i> | 0,001 | + | bez změny | - |
| | <i>NR1H4</i> | 0,004 | + | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>PLK1</i> | 0,036 | - | zvýšená exprese | < 0,001 |
| | <i>SLC22A5</i> | 0,004 | + | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>SOD1</i> | 0,037 | + | snížená exprese | < 0,001 |
| <i>SOD3</i> | 0,007 | + | bez změny | - | |
| Stadium III + IV vs. I + II | <i>ABCA3</i> | 0,018 | + | bez změny | - |
| | <i>ABCA12</i> | 0,045 | - | zvýšená exprese | 0,038 |
| | <i>ATP7A</i> | 0,047 | + | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>ATP7B</i> | 0,034 | + | bez změny | - |
| Grade 3 vs. 1 + 2 | <i>ABCA2</i> | 0,038 | - | bez změny | - |
| | <i>MSH2</i> | 0,033 | - | bez změny | - |
| | <i>NR1I2</i> | 0,014 | - | bez změny | - |
| | <i>SOD2</i> | 0,009 | + | bez změny | - |
| | <i>TP53</i> | 0,011 | - | bez změny | - |
| Expresse Ki67 („cut off“ = 15 %) | <i>ABCA10</i> | 0,049 | - | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>ABCB1</i> | 0,049 | - | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>ABCC3</i> | 0,025 | - | zvýšená exprese | < 0,001 |
| | <i>ABCD2</i> | 0,028 | - | bez změny | - |
| | <i>ABCG1</i> | 0,039 | - | bez změny | - |
| | <i>ABCG2</i> | 0,049 | - | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>SLC16A14</i> | 0,044 | - | snížená exprese | < 0,001 |
| Expresse Ki67 (%) | <i>ABCA8</i> | 0,007 | - | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>ABCA9</i> | 0,044 | - | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>ABCB1</i> | 0,005 | - | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>ABCC3</i> | 0,009 | - | zvýšená exprese | < 0,001 |
| | <i>ABCD2</i> | 0,010 | - | bez změny | - |
| | <i>ABCG1</i> | 0,047 | - | bez změny | - |
| | <i>EGFR</i> | 0,021 | - | snížená exprese | < 0,001 |
| | <i>GLRX</i> | 0,018 | - | bez změny | - |
| <i>MKI67</i> | 0,002 | + | zvýšená exprese | < 0,001 | |

| | | | | | |
|-------------------------|--------------|-------|---|-----------------|---------|
| Expresí Ki67 (%) | <i>MLH1</i> | 0,033 | - | snížená expresí | < 0,001 |
| | <i>NR1H4</i> | 0,032 | - | snížená expresí | < 0,001 |
| | <i>PLK1</i> | 0,000 | + | zvýšená expresí | < 0,001 |
| TTP | <i>ABCC9</i> | 0,012 | - | snížená expresí | < 0,001 |
| | <i>MSH2</i> | 0,043 | + | bez změny | - |

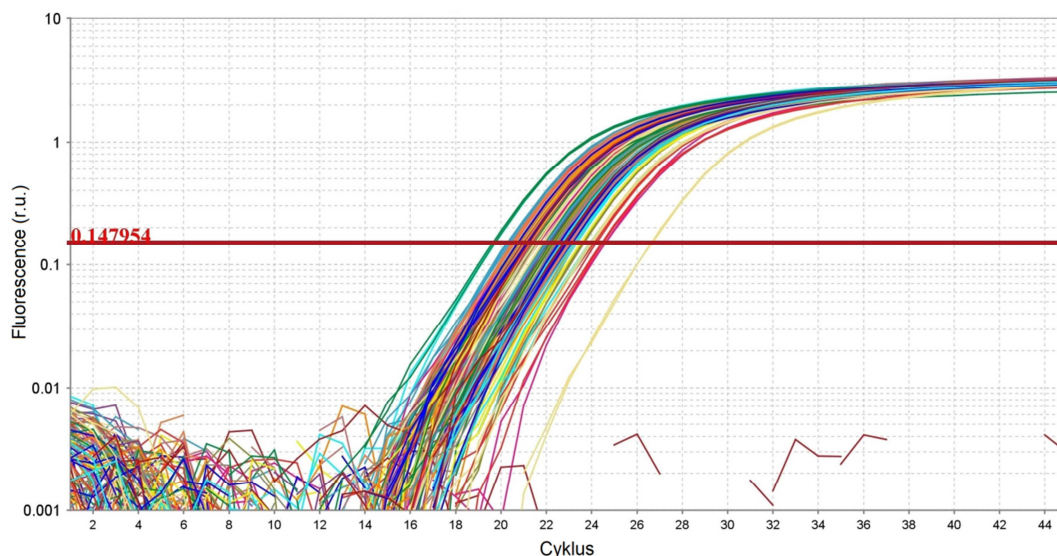
Tab. 6: Souhrn signifikantních výsledků pilotní studie. V tabulce jsou uvedeny signifikantní výsledky statistické analýzy korelace genové expresí a klinických dat v programu SPSS v16.0, na základě čehož byly vybrány kandidátní geny pro validační studii. Pozitivní korelace označuje stav, kdy vyšší expresí daného genu koreluje s vyšším stadiem, gradem, expresí Ki67 nebo s výskytem HGSC typu karcinomu. Negativní korelace naopak označuje vztah mezi vyšší expresí a nižším stadiem, gradem, expresí Ki67 nebo výskytem ostatních typů ovariálního karcinomu. Pro vybrané geny jsou uvedeny také výsledky srovnání genové expresí u nádorové a kontrolní tkáně v programu REST 2009. TTP označuje délku doby od operace do progresí, relapsu nebo úmrtí v měsících.*Pro geny korelující s více klinickými údaji jsou výsledky z REST 2009 uvedeny vícekrát, tyto geny jsou označeny tučným písmem.

Pro měření hladiny genové expresí na úrovni transkriptu byla využita qPCR za použití HOT FIREPol[®] Probe qPCR Mix Plus (ROX) a TaqMan Gene Expression Assays, které obsahují pár neznačených primerů a sondu s fluorescenční reportérovou značkou (FAM[™] nebo VIC[®]) na 5' konci a zhášecem na 3' konci. Sonda je fragment DNA komplementární k sekvenci transkriptu měřeného genu. V přítomnosti zhášeče nelze detekovat fluorescenční signál, během amplifikace úseku cDNA s navázanou sondou však dochází k její degradaci vlivem 5' → 3' exonukleázové aktivity HOT FIREPol[®] DNA polymerázy obsažené v reakční směsi. Jakmile se reportérová značka dostane z dosahu zhášeče, lze detekovat fluorescenční signál. Množství amplifikované cDNA koreluje s intenzitou signálu a průběh reakce lze sledovat v reálném čase (viz Obr. 17).

Vzorky cDNA byly 8x ředěny v NFW a pro každý gen zvlášť bylo připraveno příslušné množství reakční směsi (seznam použitých TaqMan Assays je uveden v Tab. 7). Reakce probíhala na destičce s 384 jamkami, do kterých byly napipetovány 2 µl ředěné cDNA a 3 µl směsi. Konečné složení 5 µl reakční směsi bylo následovné:

| | | finální koncentrace |
|---------|---|---------------------|
| 1,75 µl | NFW | - |
| 1 µl | 5x HOT FIREPol [®] Probe qPCR Mix Plus (ROX) | 1x |
| 0,25 µl | TaqMan Gene Expression Assay (20x) | 1x |
| 2 µl | 8x ředěná cDNA | - |

Destička byla přelepena fólií, utěsněna a centrifugována 2 minuty na PCR Plate Spinner (VWR) 1 minutu při 500 g. Expres byla měřena na přístroji ViiA7 (Applied Biosystems, Waltham, MA-USA) s následujícím programem: 2 minuty při 50 °C; 10 minut při 95 °C; 45x 15 sekund při 95 °C a 1 minutu při 60 °C.



Obr. 17: Amplifikační křivka qPCR. Na ose X jsou uvedené PCR cykly, na ose Y měřená intenzita fluorescence v relativních jednotkách (r.u.). Hodnota C_q odpovídá cyklu reakce, ve kterém intenzita fluorescence stoupne nad prahovou hodnotu určenou softwarem ViiA7.

Všechny vzorky byly stanoveny v duplikátech pro větší přesnost, v případě rozdílu hodnot duplikátů o více než 0,5 C_q bylo měření opakováno. Spolu se vzorky byl vždy měřen také kalibrátor (8x ředěná ekvimolární směs 10 cDNA z kontrolních tkání) pro kontrolu průběhu reakce. Před vlastním měřením vzorků byla z ředící řady kalibrátoru pro každý studovaný gen vytvořena kalibrační křivka a vypočtena účinnost reakce. V případě nevyhovující účinnosti byla optimalizována teplota nasedání primerů tak, aby se účinnost qPCR reakce u všech studovaných genů pohybovala v rozmezí 90–110 % (geny se změnou teploty nasedání primerů jsou uvedeny v Tab. 7).

4.2.1 Seznam studovaných genů

Dle výsledků pilotní studie bylo vybráno 34 kandidátních genů pro další analýzu (viz Tab. 7). K těmto genům byl přidán také *PRCI*, který nebyl zahrnut do pilotní studie, jelikož jiné studie na Oddělení toxikogenomiky SZÚ již potvrdily jeho významnost u ovariálního karcinomu (Ehrlichova *et al.*, 2013) a další studie potvrzující jeho významnost probíhají. K vybraným

genům byly přiřazeny také 3 referenční, tzv. housekeepingové geny (*PPIA*, *UBC*, *YWHAZ*), které následně posloužily k normalizaci získaných dat. Výběr těchto genů proběhl na základě předešlých studií na Oddělení toxikogenomiky SZÚ (Ehrlichova *et al.*, 2013). Během pilotní studie byla stanovena jejich stabilita v ovariální tkáni pomocí softwaru NormFinder (verze 19) a geNorm (verze 3.5). Celkově bylo tedy studováno 35 kandidátních a 3 referenční geny, jejichž seznam je uveden v Tab.7.

Genová exprese byla změřena na nezávislém souboru 57 pacientek a 14 žen bez maligního onemocnění ovarií z pilotní studie.

| Gen | Číslo TaqMan Assay | Anglický název genu | Délka amplikonu (bp) | Transkript RefSeq* |
|---------------------------|--------------------|---|----------------------|--------------------|
| Transport | | | | |
| <i>ABCA2</i> | Hs00242232_m1 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2 | 58 | NM_212533.2 |
| <i>ABCA3</i> | Hs00184543_m1 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3 | 77 | NM_001089.2 |
| <i>ABCA8</i> | Hs00992371_m1 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8 | 85 | NM_007168.2 |
| <i>ABCA9</i> | Hs00329320_m1 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9 | 145 | NM_080283.3 |
| <i>ABCA10^e</i> | Hs00365268_m1 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 10 | 127 | NM_080282.3 |
| <i>ABCA12</i> | Hs00292421_m1 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12 | 77 | NR_103740.1 |
| <i>ABCB1</i> | Hs00184491_m1 | ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 | 110 | NM_000927.4 |
| <i>ABCC3</i> | Hs00358656_m1 | ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3 | 98 | NM_003786.3 |
| <i>ABCC6</i> | Hs00184566_m1 | ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6 | 56 | NM_001171.5 |
| <i>ABCC9</i> | Hs00245832_m1 | ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9 | 70 | NM_020297.2 |
| <i>ABCD2</i> | Hs00193054_m1 | ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2 | 109 | NM_005164.3 |
| <i>ABCD3</i> | Hs00161065_m1 | ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3 | 91 | NM_002858.3 |
| <i>ABCG1</i> | Hs00245154_m1 | ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1 | 58 | NM_207629.1 |
| <i>ABCG2</i> | Hs00184979_m1 | ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 | 92 | NM_004827.2 |
| <i>ATP7A</i> | Hs00163707_m1 | ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, α polypeptide | 88 | NM_000052.6 |
| <i>ATP7B</i> | Hs00163739_m1 | ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, β polypeptide | 83 | NM_000053.3 |
| <i>SLC16A14</i> | Hs00541300_m1 | solute carrier family 16, member 14 | 106 | NM_152527.4 |

| | | | | |
|-------------------------|---------------|---|-----|----------------|
| <i>SLC22A5</i> | Hs00929869_m1 | solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5 | 65 | NM_003060.3 |
| MMR | | | | |
| <i>MLH1</i> | Hs00179866_m1 | mutL protein homolog 1 | 103 | NM_000249.3 |
| <i>MLH3</i> | Hs00271778_m1 | mutL protein homolog 3 | 75 | NM_001040108.1 |
| <i>MSH2</i> | Hs00953523_m1 | mutS protein homolog 2 | 86 | NM_000251.2 |
| Buněčný cyklus | | | | |
| <i>MKI67</i> | Hs01032443_m1 | marker of proliferation Ki-67 | 66 | NM_002417.4 |
| <i>PLK1^a</i> | Hs00153444_m1 | polo-like kinase 1 | 91 | NM_005030.3 |
| <i>PRC1</i> | Hs00187740_m1 | protein regulator of cytokinesis 1 | 112 | NM_001267580.1 |
| <i>TP53</i> | Hs01034249_m1 | tumor protein p53 | 108 | NM_000546.5 |
| Metabolizmus | | | | |
| <i>GLRX^a</i> | Hs00829752_g1 | glutaredoxin | 133 | NM_001118890.1 |
| <i>SOD1</i> | Hs00533490_m1 | superoxide dismutase 1, soluble | 60 | NM_000454.4 |
| <i>SOD2</i> | Hs00167309_m1 | superoxide dismutase 2, mitochondrial | 67 | NM_000636.2 |
| <i>SOD3</i> | Hs00162090_m1 | superoxide dismutase 3, extracellular | 99 | NM_003102.2 |
| Signalizace | | | | |
| <i>EGFR</i> | Hs01076078_m1 | epidermal growth factor receptor | 60 | NM_005228.3 |
| <i>ERBB2</i> | Hs01001580_m1 | v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 | 60 | NM_004448.2 |
| <i>ESR2</i> | Hs01100357_m1 | estrogen receptor 2 (ER β) | 93 | NM_001040275.1 |
| <i>NR0B2</i> | Hs00222677_m1 | nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 | 87 | NM_021969.2 |
| <i>NRIH4</i> | Hs00231968_m1 | nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4 | 85 | NM_001206977.1 |
| <i>NRII2</i> | Hs01114267_m1 | nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2 | 103 | NM_003889.3 |
| Referenční | | | | |
| <i>PPIA</i> | Hs99999904_m1 | peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) | 98 | NM_021130.3 |
| <i>UBC</i> | Hs00824723_m1 | ubiquitin C | 71 | NM_021009.5 |
| <i>YWHAZ</i> | Hs03044281_g1 | tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, ζ polypeptide | 106 | NM_001135700.1 |

Tab. 7: Seznam studovaných kandidátních genů a použitých TaqMan Assays. Geny jsou v tabulce rozděleny dle buněčných procesů, které regulují. ^aV tabulce je vždy uvedena pouze 1 referenční sekvence transkriptu. ^uO označených genů byla z důvodu nízké účinnosti qPCR změněna teplota nasedání primerů na 62 °C.

4.2.2 Statistické vyhodnocení studie genové exprese

Změřené hodnoty hladiny genové exprese kandidátních genů byly před statistickou analýzou nejprve normalizovány pomocí hladin referenčních genů dle následujícího vzorce:

$$Cq \text{ (normalizované)} = Cq \text{ (vzorek)} / Cq \text{ (průměr referenčních genů)}$$

Čím menší je vypočítaný poměr, tím vyšší je relativní exprese cílového genu. Normalizace dat byla provedena pro minimalizaci vlivu eventuálních rozdílů v kvalitě a kvantitě RNA, chyb při přípravě vzorků a rozdílů v účinnosti syntézy cDNA a qPCR (Mohelnikova-Duchonova *et al.*, 2012). Normalizované Cq bylo použito pro statistické vyhodnocení.

Pro srovnání exprese v kontrolní a nádorové tkáni byl použit software REST 2009 (Pfaffl *et al.*, 2002). Vstupem do tohoto softwaru jsou pouze normalizované Cq hodnoty cílových a referenčních genů a účinnosti jednotlivých reakcí, které slouží ke korekci při výpočtu rozdílu genové exprese u porovnávaných skupin (Pfaffl, 2001).

Spolu s biologickým materiálem byla získána také klinická data pacientek, která byla využita pro statistické vyhodnocení. Z lékařských záznamů byly získány následující informace: věk pacientky v době diagnózy, histologický typ ovariálního karcinomu, stadium onemocnění, grade, exprese markeru Ki67 (%) a TTP v měsících. Během všech statistických analýz zahrnutých do diplomové práce se hodnotil histologický typ jako HGSC vs. ostatní typy nádorů, grade jako G3 vs. G1 nebo G2 a stadium jako I nebo II vs. III nebo IV. Dále byla hodnocena exprese Ki67 stanovená histology pomocí imunohistochemických metod jako procento buněk s jadernou expresí Ki67. TTP se hodnotila jako doba od operace do progresu, relapsu, nebo úmrtí pacientek v měsících. Klinická data a normalizované hodnoty genových expresí byly vyhodnoceny v programu SPSS v16.0.

Nejprve byla provedena analýza rozložení dat pomocí Kolmogorov-Smirnov testu. Díky odchýlkám v rozložení většiny sledovaných dat od normálního rozložení byly k vyhodnocení použity neparametrické testy. Analýza vztahu genové exprese s typem, gradem a stadiem onemocnění se provedla pomocí Kruskal-Wallis testu pro faktoriální veličiny. Následně se pro zjištění směru vztahu použil jednofaktorový ANOVA test. Pro testování korelace exprese se spojitými daty, tedy s expresí markeru Ki67 (%), byl použit Spearman test. TTP byla hodnocena metodou Kaplan-Meier a Log Rank testem, jejichž vstupem byly hodnoty expresí, rozdělené na 2 skupiny dle mediánu, a TTP v měsících. Významnost všech statistických analýz v předkládané práci byla hodnocena na hladině 0,05, výsledky s $p < 0,05$ byly tedy považovány za významné.

Výsledky statistických analýz ze softwaru REST 2009 a SPSS v16.0 (dle získaných výsledků grade a exprese Ki67) byly podrobeny tzv. FDR (false discovery rate) korekci podle Benjamini a Hochberg (1995) (B-H korekce). Tato a jiné další korekce, např. Bonferroniho korekce, se používají v případě mnohonásobného testování hypotéz ke kontrole statistické chyby typu I. B-H korekce má za úkol pravděpodobnost výskytu této chyby snížit.

Pro B-H korekci jsou zapotřebí všechny p-hodnoty pro daný typ analýz seřazené vzestupně dle velikosti a významnost stanovená jako $q = 0,05$. Vlastní korekce je provedena s použitím následujícího vzorce:

$$P_i \leq (i/m) \times q$$

Hodnota m představuje celkový počet hypotéz a i pořadí hypotézy v tabulce. Pokud je p-hodnota rovna nebo menší než výsledná hodnota, je statistický výsledek i po korekci považován za signifikantní (Benjamini a Hochberg, 1995).

Signifikantní výsledky statistické analýzy TTP byly podrobeny multiparametrické analýze pomocí Cox regrese (Cox, 1972) adjustované na stadium, grade a výskyt vzdálených metastáz. Tyto faktory modifikují prognózu pacientek a multiparametrická analýza tak může odhalit spolupůsobení těchto faktorů. V rámci Cox regrese v softwaru SPSS v16.0 je počítáno také tzv. hazard ratio (HR) vyjadřující pravděpodobnost, že ke sledované události (v tomto případě progresi, relapsu, nebo úmrtí pacientky) dojde rychleji, nebo pomaleji v jedné testované skupině oproti druhé (shrnutí v Spruance *et al.*, 2004).

4.3 Sledování hladin proteinu v cílové tkáni

Dle výsledků studií genové exprese byly pro analýzu hladiny proteinu vybrány 2 geny, *PRCI* a *ABCA2* (viz kapitola 5.1.2 Srovnání expresní hladiny v nádorové tkáni s klinickými daty). Studium hladiny proteinů je nedílnou součástí charakterizace nádorů, jelikož právě proteiny jsou funkčními produkty genů.

Imunoblotování je metoda detekce specifického proteinu o určité velikosti ve směsi dalších proteinů. Využívá se při ní separace denaturovaného vzorku dle molekulové hmotnosti na SDS polyakrylamidové gelové elektroforéze (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE), následný přenos proteinů z gelu na membránu, tzv. Western přenos, a imunologická detekce cílového proteinu pomocí vazby specifické protilátky (Towbin *et al.*, 1979). Metody vizualizace jsou různé, stejně jako protokoly pro konkrétní proteiny.

4.3.1 Protein PRC1

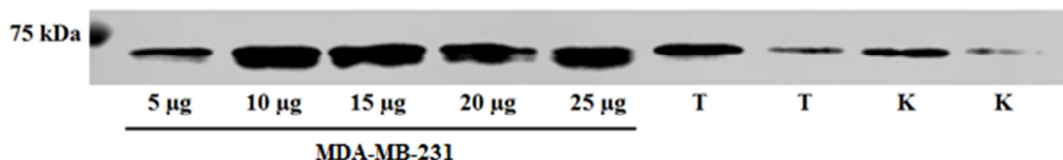
Gen *PRC1* má 19 transkripčních variant, z nichž 9 kóduje protein. Jako kanonická je brána izoforma proteinu obsahující 620 aminokyselin (transkript ENST00000394249/NM_003981.3, protein NP_003972.1) o velikosti 72 kDa. Tato izoforma byla detekována pomocí imunoblotování u 57 vzorků nádorové tkáně pacientek a 9 kontrolních tkání zařazených do validační studie.

Pro přípravu gelů a SDS-PAGE bylo použito příslušenství Mini-PROTEAN[®] od Bio-Rad. Vzhledem k velikosti detekovaného proteinu byl z příslušných připravovaných roztoků uvedených v Tab. 4 připraven 8% separační polyakrylamidový gel (8% akrylamid, 375 mM „lower“ pufr, 0,1% SDS, 0,1% APS a 0,03% TEMED (v/v)) o tloušťce 0,75 mm a výšce přibližně 5 cm (odpovídá cca 3,5 ml gelu). Polymerace akrylamidu a bis-akrylamidu je iniciovaná persíranem amonným (ammonium persulfate, APS) a TEMEDem. APS se přirozeně rozpadá, vytváří volné radikály, které TEMED stabilizuje a zároveň urychluje jejich vznik, což umožňuje iniciaci polymerační řetězové reakce akrylamidu a bis-akrylamidu. Vzniká tak typická pórovitá struktura gelu. Po nalití do aparatury byl gel převrstven tenkou vrstvou butanolu, aby nedocházelo k inhibici polymerační reakce kyslíkem. Z důvodu nestálosti APS je nutné jeho roztok připravovat přímo před použitím, nebo ho zamrazovat po malých alikvótech, které se po rozmrazení ihned využijí.

Po 1 hodině tuhnutí se butanol odstraní, rozhraní gelu se promyje destilovanou vodou a vysušílo filtračním papírem. Na rozhraní separačního gelu bylo nalito cca 1,5 ml zaostřovacího 4% polyakrylamidového gelu (4% akrylamid, 125 mM „upper“ pufr, 0,1% SDS, 0,01% APS a 0,1% TEMED (v/v)) a byl do něj vsazen hřebínek. Zaostřovací gel tuhne 30 minut a během PAGE slouží k zaostření a srovnání separovaných vzorků, což je umožněno odlišným pH a koncentrací „upper“ a „lower“ pufru. Pro PAGE bylo připraveno takové množství vzorku, které odpovídalo 15 µg proteinu. Vzorky byly ředěny do objemu 10 µl pomocí NFW a 2x SLB pufru (sample loading buffer) pro nanášení vzorků, u málo koncentrovaných vzorků se použil 5x SLB. SLB pufr je nezbytný pro separaci proteinů dle jejich molekulové hmotnosti, jelikož obsahuje SDS, amfipatický detergent vážící proteiny a rušící jejich terciální struktury. SDS také dodává proteinům záporný náboj odpovídající jejich molekulové hmotnosti, mobilita proteinů v gelu se tím pádem stává pouze funkcí molekulové hmotnosti. Složkou SLB je také bromfenolová modř pro vizualizaci vzorků v gelu a glycerol, jehož hustota udržuje vzorky na dně jamek gelu. Před použitím se do 2x SLB přidává β-merkapt ethanol (4% v roztoku (v/v)), který ruší disulfidické můstky

v proteinu a zabraňuje oxidaci cysteinů. Před nanesením na gel byly ředěné vzorky s SLB inkubovány 10 minut při 95 °C, během nichž došlo k linearizaci proteinu. Po denuraci se vzorky centrifugovaly 5 minut při 21 382 g a RT.

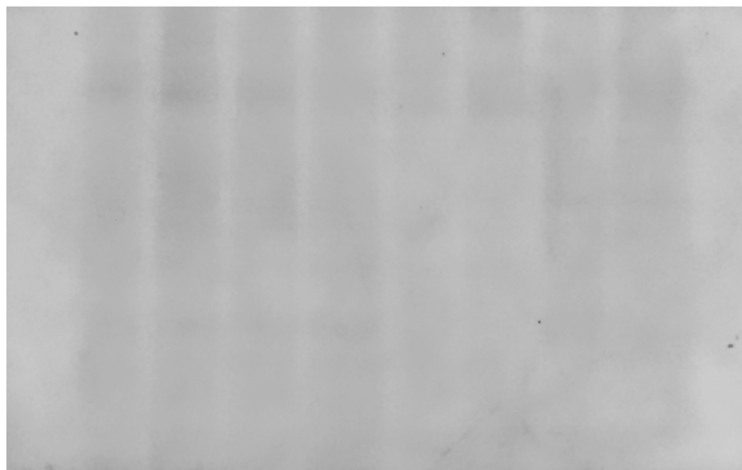
Gely se vložily do PAGE aparatury s 1x „running“ pufrem, hřebínek byl z gelu odstraněn a připravené vzorky se pomocí ultratenké špičky pipetovaly do vzniklých jamek. K testovaným vzorkům byl přidán i jeden kontrolní, a sice protein z buněčné linie nádoru prsu MDA-MB-231, který sloužil jako pozitivní kontrola a později byl použit jako kalibrátor k normalizaci získaných hodnot z různých membrán. Bylo použito 5 µg tohoto proteinu, množství bylo zvoleno po provedení testovacího imunoblotu s různou nanáškou MDA-MB-231 (viz Obr. 18). Vedle vzorků bylo napipetováno 5 µl Precision Plus Protein™ Dual Color Standards markeru. PAGE aparatura byla zapojena a spuštěna nejprve na 80 V při proudu maximálně 100 mA, po přesunutí vzorků do separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V. Proteiny se kvůli svému zápornému náboji přesunují v gelu směrem k anodě.



Obr. 18: Výsledek imunoblotu (PRC1) za účelem volby vhodného množství kontrolního vzorku MDA-MB-231 pro sledovaný protein v ovariálních vzorcích. Na gel bylo naneseno různé množství MDA-MB-231 (5–25 µg), 15 µg vzorku tumoru s velkou expresí PRC1, nízkou expresí a 2 vzorky kontrolní tkáně (zleva). Dle intenzity pruhů byla pro využívání kontrolní linie vybrána nanáška 5 µg, která svou intenzitou byla nejbližší tkáňovým vzorkům.

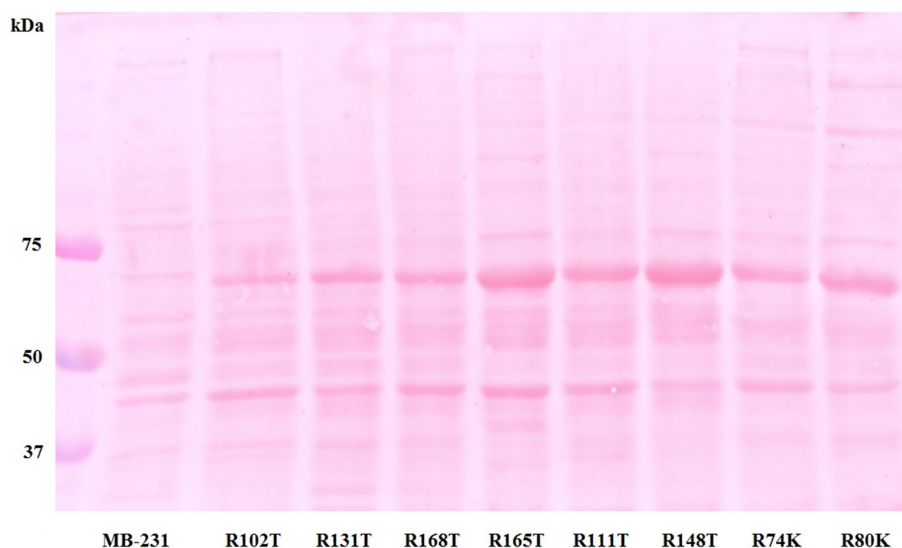
Po cca 2 hodinách se PAGE vypnula a gel byl namočen do 1x blotovacího pufru s 20% methanolem, aby se z něj odstranil „running“ pufr. Pro Western přenos byla použita nitrocelulósová membrána Amersham Protran 0.2 NC od GE Healthcare Life Sciences, která byla před použitím na 10 minut namočena v blotovacím pufru, stejně jako filtrační papír. Pro přenos proteinů z gelu na membránu se použilo příslušenství Criterion™ Blotter od Bio-Rad. Připravená blotovací kazeta byla vložena do aparatury tak, aby se proteiny pohybovaly směrem z gelu na membránu, tedy od katody k anodě. Do aparatury bylo umístěno také magnetické míchadlo a chladicí destička. Pro blotování s Amersham Protran 0.2 NC bylo zapotřebí použít blotovací pufr s 20% obsahem methanolu, který napomáhá odstranění SDS z proteinu a jejich lepší vazbě na membránu. Aparatura se zapojila na 1 hodinu při 100 V a maximálním proudem 500 mA.

Po dokončení přenosu byl gel obarven v Coomassie blue barvicím roztoku (Meyer a Lamberts, 1965) pro vizuální kontrolu účinnosti přenosu proteinů na membránu. Gel byl za třepání barven 20 minut a poté 2x 30 minut proplachován v odbarvovacím roztoku (25% methanol, 10% kyselina octová). Obarvené gely byly vyfotografovány na přístroji Odyssey[®]Fc (LI-COR[®] Biosciences, Lincoln, NE-USA) 2 minuty při 700 nm (viz Obr. 19).

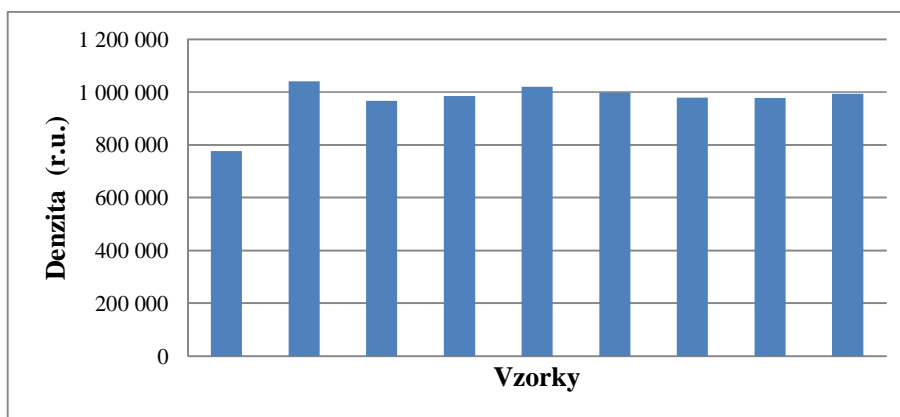


Obr. 19: Barvení polyakrylamidového gelu na protein pomocí Coomassie blue. Barvení gelu po Western přenosu slouží ke kontrole přenosu proteinů na membránu. Na gelu nejsou viditelné jasně obarvené pruhy proteinů, přenos na membránu byl tedy důkladný.

Membrána byla po ukončení Western přenosu opláchnuta v TBS pufru (Tris-buffered saline) a reverzibilně obarvena na protein v Ponceau S Solution (Sigma-Aldrich) pro kontrolu přenosu (viz Obr. 20). Membrána se barvila 5 minut bez třepání, opláchnula se v destilované vodě, byla vložena do průhledné fólie a naskenována pro kontrolní denzitometrii v programu ImageJ 1.50i (viz Obr. 21). Tato denzitometrie sloužila k porovnání přeneseného množství proteinu (Romero-Calvo *et al.*, 2010). Po obarvení byla membrána seříznuta dle velikosti detekovaného proteinu. Mimo PRC1 bylo zapotřebí detekovat i referenční protein, v tomto případě β -aktin (45 kDa), který později sloužil k normalizaci získaných dat. Seříznutá membrána byla za třepání 2x 5 minut opláchnuta v TBS + 0,1% Tween[®]20 (TBST), aby došlo k odstranění Ponceau. Tween[®]20 je detergent přidávaný do promývacích pufřů, blokovacích činidel nebo ředěných protilátek, za účelem důkladnějšího promývání od nenavázaných imunoreagencií, zamezení nespecifické vazby protilátek a snížení nespecifického pozadí.



Obr. 20: Barvení membrány na protein pomocí Ponceau S Solution. Po obarvení jsou vizualizované přebloťované proteiny.



Obr. 21: Kontrolní denzitometrie celkového proteinu po obarvení Ponceau S provedená v programu ImageJ. Na ose X jsou jednotlivé vzorky, na ose Y denzita v relativních jednotkách (r.u.). Tato denzitometrie slouží k porovnání celkového množství přebloťovaného proteinu mezi vzorky. Jelikož nanáška proteinu byla u všech vzorků identická (kromě MDA-MB-231), denzita přeneseného proteinu by měla být přibližně stejná.

Jelikož membrány používané pro Western přenos váží všechny proteiny, včetně protilátek, bylo před inkubací s primární protilátkou nutné na membráně zablokovat místa bez navázaných proteinů, aby se zabránilo nespecifické vazbě protilátky. Toho se docílilo inkubací membrány s Blocker™ BLOTTO in TBS + 0,1% Tween®20, obsahujícím 5% (w/v) odtučněné sušené mléko (dále 5% blokovací činidlo). Membrána byla za třepání inkubována 30 minut při RT. Proteiny v mléce vyvázaly volná místa na membráně, čímž se docílilo následné specifické vazby protilátek na cílové proteiny.

Po ukončení blokování byla membrána za třepání propláchnuta od blokovacího činidla 2x 5 minut v TBST a následně inkubována s primární protilátkou. Pro detekci PRC1 byla použita monoklonální králičí IgG primární protilátka PRC1 Antibody (EP1513Y), NB110-57434 od Novus Biologicals ředěná 1:1 000 v 1% blokovacím činidle. Pro detekci β -aktinu byla použita monoklonální králičí IgG primární protilátka β -Actin (13E5) Rabbit mAb #4970 od Cell Signaling Technology ředěná 1:2 000 v 5% blokovacím činidle. Membrány byly za jemného třepání inkubované s protilátkami přes noc, cca 16 hodin při 4 °C. Po inkubaci se membrány za třepání 3x 10 minut promyly od zbylé protilátky v TBST a poté se za jemného třepání společně inkubovaly se sekundární protilátkou 2 hodiny při RT. Jako sekundární protilátka byla použita kozí sekundární protilátka proti králičímu IgG Anti-Rabbit s konjugovanou peroxidázou od Sigma-Aldrich ředěná 1:10 000 v TBST. Peroxidázou značená sekundární protilátka se specificky váže na primární protilátku a umožňuje tak větší specifitu, než při používání značené primární protilátky.

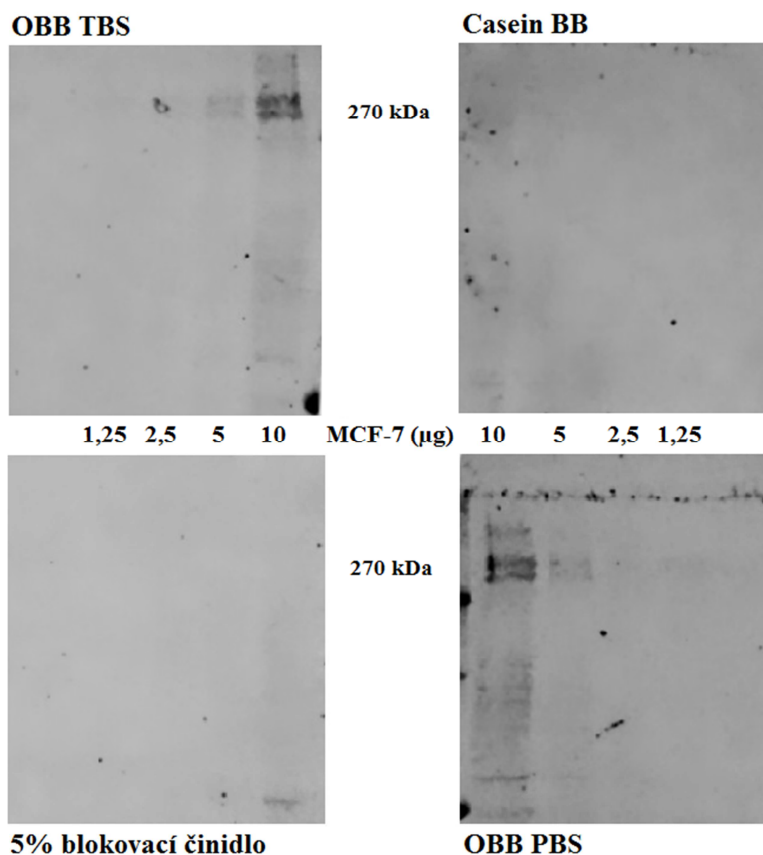
Po inkubaci byly membrány za třepání propláchnuty 3x 10 minut v TBST a následně vizualizovány pomocí metody zesílené chemiluminescence (enhanced chemiluminescent, ECL) za použití SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate reagensií od Thermo Fisher Scientific. Dostatečné množství ECL pracovního roztoku se připravilo smísením Luminol/Enhancer Solution se Stable Peroxide Buffer v poměru 1:1. Roztok byl následně nanesen na membrány umístěné ve tmavé krabici, kde byly inkubované bez třepání 5 minut. ECL vizualizace spočívá v reakci luminolu s oxidantem, peroxidem vodíku, katalyzované peroxidázou konjugovanou se sekundární protilátkou. Během této reakce vzniká excitovaný meziprodukt, který během snižování své energetické hladiny emituje světlo při 450 nm. K luminolu se přidává také tzv. enhancer, který umožňuje delší trvání reakce bez ztráty intenzity emitovaného světla. Membrány byly po inkubaci vloženy do průhledné fólie a vyfotografovány na přístroji Odyssey 30 sekund při 600 nm a 30 sekund při 450 nm. Při 600 nm byl vizualizován marker. Denzitometrie se prováděla v softwaru Image Studio™ 4.0.21 (LI-COR® Biosciences), změřená denzita pozitivně koreluje s množstvím proteinu.

4.3.2 Protein ABCA2

Gen *ABCA2* má 24 transkripčních variant, z nichž 10 kóduje nějakou formu proteinu, 4 z nich pak plnohodnotný ABC transportér (ENSEMBL, URL8). Kanonická izoforma proteinu *ABCA2* se nazývá 1A (transkript ENST00000341511/ NM_001606.4, protein NP_001597.2), je složená z 2436 aminokyselin a má velikost 270 kDa. Jedná se o izoformu exprimovanou

v různé míře ve všech tkáních, silná exprese byla zjištěna v ovarích (Ile *et al.*, 2004). Izoforma 1A byla cílem detekce pomocí imunoblotování.

Vzhledem k zavádění metodiky imunoblotování pro protein ABCA2 byla nejprve provedena optimalizace protokolu dle Odyssey Western Blot Blocker Optimization for Near-Infrared (NIR) Detection, během které se otestovaly 4 různá blokační činidla, Odyssey Blocking Buffer (TBS), Odyssey Blocking Buffer (PBS), Casein Blocking buffer a 5% blokovací činidlo. Dle výsledků (viz Obr. 22) a dostupných chemikálií bylo jako blokovací činidlo vybráno Odyssey Blocking Buffer v PBS (phosphate-buffered saline) (OBB PBS), respektive jeho analog SEA BLOCK Blocking Buffer (PBS), který byl uznán pro použití při NIR detekci na přístroji Odyssey a stejně jako OBB PBS neobsahuje savčí proteiny.



Obr. 22: Optimalizace blokování pro ABCA2 dle Odyssey Western Blot Blocker Optimization for NIR Detection. Během optimalizace byla testována 4 blokovací činidla, OBB TBS, OBB PBS, Casein blocking buffer a 5% blokovací činidlo. V těchto roztocích byly také ředěné protilátky a promývání probíhalo v TBST/PBST. Na gely se nanoslo různé množství proteinu z buněčné nádorové linie MCF-7. Dle výsledků optimalizace bylo pro imunoblotování ABCA2 zvoleno činidlo OBB PBS, které bylo nahrazeno analogickým SEA BLOCK blokovacím pufrem v PBS.

Jelikož se prvně na Oddělení toxikogenomiky SZÚ zaváděla metodika pro určení hladiny ABCA2, byly podmínky experimentu mnohokrát upravovány. Uveden je nejrecentnější protokol, jehož výsledky jsou v práci zveřejněny. Imunoblotování probíhalo stejně jako u PRC1, avšak s následujícími změnami. Vzhledem k velikosti proteinu byl připraven 6% separační polyakrylamidový gel (6% akrylamid, 375 mM „lower“ pufr, 0,1% SDS, 0,1% APS a 0,03% TEMED (v/v)). Pro PAGE bylo připraveno množství ovariálního vzorku odpovídající 20 nebo 50 µg proteinu, u kterých bylo pomocí β-aktinu již dříve prokázáno, že nejsou degradované. Jako kontrolní vzorek se použilo 20 µg buněčné nádorové prsní linie MCF-7 (na základě výsledků optimalizace). Vzorky se ředily v 2x SLB s 4% β-merkapt ethanolom a denaturace probíhala 10 minut při 37 °C. Množství použitého markeru bylo z důvodu senzitivní IR (infrared) vizualizaci pouze 1 µl. Pro Western přenos byla pro vyšší vazebnou kapacitu použita PVDF (polyvinylidene difluoride) membrána Immobilon R-FL PVDF (0,45 µm) od Sigma-Aldrich. Před blotováním se hydrofobní membrána na 1 minutu namočila do 100% methanolu, aby došlo k její aktivaci, poté se opláchla v destilované vodě a byla ponořena do blotovacího pufru. Pro Western přenos s Immobilon membránou se použil blotovací pufr s 10% obsahem methanolu. Blokace probíhala 1 hodinu při RT v SEA BLOCK pufru. Pro detekci ABCA2 byla použita polyklonální IgG králičí protilátka ABCA2 Antibody od Proteintech™ ředěná 1:1 000 v SEA BLOCK pufru + 0,2% Tween®20. Membrána byla inkubována s primární protilátkou 2 hodiny při RT. Promývání probíhalo v PBST, vzhledem k použitému blokačnímu činidlu. Jako sekundární protilátka byla použita polyklonální kozí anti-králičí IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit od LI-COR® Biosciences s konjugovaným fluoroforem, která se ředila 1:5 000 v SEA BLOCK pufru + 0,2% Tween®20 + 0,01% SDS. Membrána byla ve tmě inkubována se sekundární protilátkou 1 hodinu při RT a všechny následující kroky probíhaly již bez přístupu světla. Před fotografováním na přístroji Odyssey se membrána 1 hodinu sušila na filtračním papíru a poté se fotila 10 minut při 800 nm pro vizualizaci fluoroforu a 30 sekund při 700 nm pro marker. Po fotografování se membrána 30 sekund barvila roztokem Amido Black pro vizualizaci přeblovaných proteinů (pomocí Ponceau se PVDF membrána dostatečně neobarví), přes noc se promývala v odbarvovacím roztoku a byla naskenována pro kontrolní denzitometrii v programu ImageJ 1.50i. Dle získaných výsledků nebyly ABCA2 imunoblotty dále hodnoceny (viz kapitola 5.2.2 Protein ABCA2).

4.3.3 Statistické vyhodnocení studie hladiny proteinu

Data získaná po provedení denzitometrie byla před vlastní analýzou nejprve podrobena dvojí normalizaci. Změřené denzity proteinu PRC1 se normalizovaly na denzity kontrolního β -aktinu pro redukci efektu případné degradace proteinu ve vzorcích, dle následujícího vzorce:

$$\text{denzita PRC1 (normalizovaná)} = \text{denzita PRC1 (vzorek)} / \text{denzita } \beta\text{-aktinu (vzorek)},$$

v případě absence pruhu β -aktinu byl vzorek z analýz vyřazen. Druhá normalizace již nově získané hodnoty denzity PRC1 byla provedena na denzitu kontrolního vzorku MDA-MB-231. Tato kontrola byla přítomna na každé membráně se vzorky, normalizace vzorků byla vždy provedena k MDA-MB-231 na příslušné membráně, aby došlo ke srovnání výsledků z různých membrán. Byla prováděna dle následujícího vzorce:

$$\text{finální denzita PRC1} = \text{denz. PRC1 (normalizovaná)} / \text{denz. PRC1 v MDA-MB-231 (normalizovaná)}$$

Analýza normalizovaných hodnot denzity byla provedena v softwaru SPSS v16.0. Nejprve byla provedena analýza rozložení dat pomocí Kolmogorov-Smirnov testu a jelikož data vykazovala odchylky od normálního rozložení, používaly se neparametrické testy. Pomocí Spearman testu se zjišťoval vztah mezi hladinou exprese PRC1 na úrovni transkriptu a proteinu u tumorů a kontrol, rozdíl v denzitě mezi nádorovými a kontrolními vzorky se zhodnotil Kruskal-Wallis testem. Analýza vztahu množství proteinu ke klinickým datům pacientek byla provedena Kruskal-Wallis testem pro faktoriální (grade, stadium, typ) a Spearman testem pro spojitá data (exprese Ki67). Hodnoty denzity rozdělené na 2 skupiny dle mediánu se s TTP hodnotily pomocí Kaplan-Meier testu, signifikance pomocí metody Log Rank.

4.4 Studie genetické variability vybraných genů

Hladina exprese genů nebo funkce jejich produktů může být ovlivněna různými vlivy, mezi které patří i výskyt jednonukleotidových polymorfizmů (single nucleotide polymorphism, SNP) v rámci genu nebo jeho regulačních oblastí. Jedná se o výskyt 2 a více alel 1 lokusu, kdy frekvence výskytu SNP v populaci musí být alespoň 1 %.

Pro genotypizaci byly dle výsledků validační studie genové exprese vybrány 2 geny, PRC1 a ABCA2. V rámci těchto genů byly detekovány vybrané SNP u vzorků periferní krve 98 pacientek s ovariálním karcinomem, která byla odebrána před operativním zákrokem a léčbou. Jelikož se v genu PRC1 dlouhém 29,6 kbp nachází velké množství polymorfizmů,

byly z databází (www.ensembl.org, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vybrány všechny klinicky významné SNP s frekvencí výskytu minoritní alely nad 3 % v evropské populaci. Pro současnou studii byly nakonec vybrány 3 SNP pro vysokorozlišující analýzu křivek tání (high resolution melting, HRM) a 3 SNP pro TaqMan alelickou diskriminaci (viz Tab. 8). Na polymorfizmech rs12910825, rs8028856, rs8031684 a rs11852999 probíhají v současnosti na Oddělení toxikogenomiky SZÚ studie hodnotící jejich vztah ke karcinomu prsu, k čemuž bylo při výběru přihlédnuto. Dle literatury se vybraly 2 další klinicky významné SNP, rs8042680 související s diabetem typu 2 (Voight *et al.*, 2010) a rs2290203, který má dle současné literatury vztah k nádorům prsu (Cai *et al.*, 2014).

| <i>PRCI</i> | | | | | |
|-------------------|--------------|-----------------|----------------------|---------------|--------------------|
| Číslo SNP | Typ varianty | Alely maj./min. | Pozice na chromozomu | Frekvence (%) | Fenotyp |
| <i>rs12910825</i> | intron | A/G | 15:90968030 | 38 | dědičný nádor prsu |
| rs8042680 | intron | C/A | 15:90978107 | 33 | diabetes typu 2 |
| <i>rs8028856</i> | intron | A/G | 15:90987590 | 26 | dědičný nádor prsu |
| rs2290203 | intron | G/A | 15:90968837 | 21 | nádor prsu |
| <i>rs8031684</i> | intron | T/A | 15:90984221 | 19 | dědičný nádor prsu |
| rs11852999 | intron | C/T | 15:90971530 | 7 | nádor prsu |

Tab. 8: Tabulka vybraných polymorfizmů genu *PRCI*. Kurzívou označené polymorfizmy byly vybrány pro HRM analýzu, ostatní pro TaqMan alelickou diskriminaci. Alely jsou uvedeny jako majoritní (maj.) a minoritní (min.) se záměnou na + vlákně DNA. Frekvence jsou uvedené dle 1 000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org>). Pozice na chromozomu je uvedena jako číslo chromozomu:pořadí nukleotidu směrem od p raménka ke q raménku chromozomu a je vztažena k referenční sekvenci NC_000015.10.

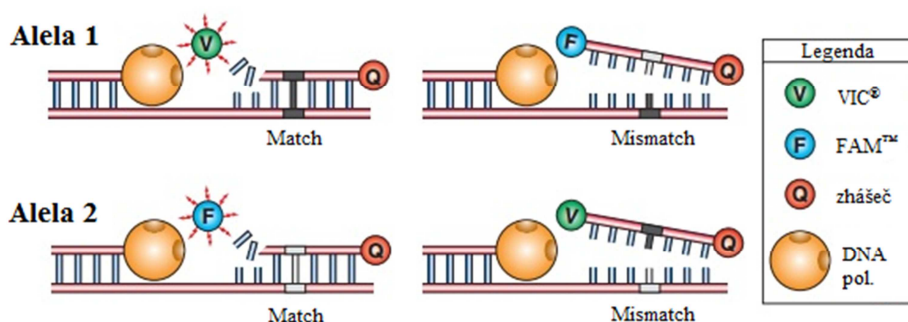
V rámci genu *ABCA2*, dlouhého 21,7 kbp, je známo velké množství polymorfizmů. Z toho důvodu byly pro genotypizaci vyhledány pouze klinicky významné polymorfizmy dle literatury a SNP s frekvencí výskytu minoritní alely nad 3 % v evropské populaci nacházející se v exonech. Z vyselektovaných polymorfizmů byly vybrány pro alelickou diskriminaci rs2271862 a rs7048567 dle vysoké frekvence v evropské populaci a rs908832 jako klinicky významný polymorfizmus související s Alzheimerovou chorobou (Wollmer *et al.*, 2006), viz Tab. 9.

| <i>ABCA2</i> | | | | | |
|--------------|--------------|-----------------|----------------------|---------------|----------------------|
| Číslo SNP | Typ varianty | Alely maj./min. | Pozice na chromozomu | Frekvence (%) | Fenotyp |
| rs2271862 | synonymní | A/G | 9:137011907 | 33 | - |
| rs7048567 | synonymní | G/A | 9:137009585 | 27 | - |
| rs908832 | synonymní | A/G | 9:137018032 | 3 | Alzheimerova choroba |

Tab. 9: Tabulka vybraných polymorfizmů genu *ABCA2* pro TaqMan alelickou diskriminaci. Alely jsou uvedeny jako majoritní (maj.) a minoritní (min.) se záměnou na + vlákně DNA. Frekvence jsou uvedené dle 1 000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org>). Pozice na chromozomu je uvedena jako číslo chromozomu:pořadí nukleotidu směrem od p raménka ke q raménku chromozomu a je vztažena k referenční sekvenci NC_000009.12.

4.4.1 Alelická diskriminace

Alelická diskriminace je multiplexová analýza založená na qPCR sloužící k detekci SNP. Metoda využívá TaqMan SNP Genotyping Assays fungující na podobném principu jako TaqMan Gene Expression Assays (viz kapitola 4.2 Studie genové exprese). TaqMan SNP Assays obsahují pár neznačených primerů a 2 fluorescenčně značené sondy se zhášeči, jedna je značena FAMTM a druhá VIC[®] barvou. Přítomnost různých sond v reakci umožňuje genotypizaci 2 možných variant SNP tak, že každá sonda je absolutně komplementární k 1 variantě. Po specifickém „nasednutí“ sondy na cílovou sekvenci a amplifikaci daného úseku dochází stejně jako při použití TaqMan Expression Assay k degradaci sondy vlivem 5' → 3' exonukleázové aktivity AmpliTaq Gold[®] DNA polymerázy obsažené v reakční směsi. Jakmile je reportérová značka z dosahu zhášeče, lze detekovat fluorescenční signál, který se u 2 použitých sond liší (viz Obr. 23). Dle detekce různých fluorescenčních barev software rozezná přítomnost, nebo nepřítomnost možných variant a po dokončení alelické diskriminace jsou vzorky klasifikovány jako homozygotní nebo heterozygotní pro danou alelu.



Obr. 23: Princip fungování TaqMan alelické diskriminace. Používané různě značené sondy jsou komplementární vždy k 1 možné variantě polymorfizmu. Pokud je tato varianta přítomna, dojde k „nasednutí“ (match) sondy, k oddělení barvy z dosahu zhášeče během amplifikace a detekci signálu. V opačném případě sonda na nekomplementární variantu „nenasedne“ (mismatch) a reportér se neuvolní. Převzato a upraveno dle Applied Biosystems – Alelic Discrimination Getting Started Guide.

98 vzorků DNA z periferní krve bylo ředěno pomocí NFW na koncentraci 20 ng/μl. Pro analýzu *ABCA2* SNP se pro jeden vzorek připravily 4 μl reakční směsi obsahující TaqMan SNP Genotyping Assay k detekovanému polymorfizmu (seznam použitých TaqMan Assays je uveden v Tab. 10) a Genotyping Master Mix se všemi komponentami nutnými pro průběh PCR včetně AmpliTaq Gold[®] DNA polymerázy. K reakční směsi v destičce se 384 jamkami byl napipetován 1 μl ředěné DNA. V případě *PRCI* byly připraveny 3 μl směsi a k ní se přidávaly 2 μl ředěné DNA. Konečné složení 5 μl reakční směsi s DNA bylo následovné:

| | finální koncentrace |
|-----------------------------------|---|
| NFW | - |
| TaqMan SNP Genotyping Assay (40x) | 1x |
| TaqMan Genotyping Master Mix (2x) | 1x |
| DNA (20 ng/μl) | 4 ng/μl (<i>ABCA2</i>); 8 ng/μl (<i>PRCI</i>) |

U všech reakcí byla vytvořena negativní kontrola obsahující NFW místo DNA. Destička s 384 jamkami byla přelepena fólií, řádně utěsněna a centrifugována 2 minuty na PCR Plate Spinner (VWR) při 500 g. Reakce probíhala na přístroji ViiA7 od Applied Biosystems s následujícím programem: 30 sekund při 60 °C; 10 minut při 95 °C; 45x 15 sekund při 95 °C a 1 minutu při 60 °C; 30 sekund při 60 °C.

| Číslo SNP | Číslo TaqMan Assay | Typ varianty | Alely maj./min. | Pozice v transkriptu | Změna kodonu | Změna ak |
|---|--------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|----------|
| <i>ABCA2</i> (NM_001606.4; NP_001597.2) | | | | | | |
| rs908832 | C_9456380_10 | synonymní | A/G | 2177 | GAT,GAC | E679E |
| rs2271862 | C_15961241_10 | synonymní | A/G | 5612 | CAT,CAC | H1824H |
| rs7048567 | C_31786332_20 | synonymní | G/A | 6830 | CCT,CTC | L2230L |
| <i>PRCI</i> (NM_003981.3; NP_003972.1) | | | | | | |
| rs2290203 | C_2999698_1 | intron | G/A | - | - | - |
| rs8042680 | C_2999711_10 | intron | C/A | - | - | - |
| rs11852999 | C_2999702_10 | intron | C/T | - | - | - |

Tab. 10: Seznam použitých TaqMan SNP Genotyping Assays. V tabulce jsou 3 detekované polymorfizmy genu *ABCA2* a 3 genu *PRCI* spolu s čísly použitých TaqMan Assays. Alely jsou uvedeny jako majoritní (maj.) a minoritní (min.). Poziční data jsou vztažena k referenčním sekvencím uvedeným vedle studovaných genů. Pozice v transkriptu je uvedena jako pořadí nukleotidu od 5' konce, změna aminokyseliny je uvedena jako původní aminokyselina, pozice v proteinu od N konce, nová aminokyselina.

Po dokončení reakce bylo spočítáno množství jednotlivých genotypů a frekvence alel (p, q) dle vzorců:

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

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

kde N je celkový počet definovaných genotypů, (AA) je počet standardních homozygotů, (AB) heterozygotů a (BB) variantních homozygotů.

4.4.2 Vysokorozlišující analýza křivek tání

Vysokorozlišující analýza křivek tání je post-PCR metoda sloužící k detekci alternací v sekvenci nukleových kyselin. HRM je založená na změnách křivek tání DNA díky přítomnosti polymorfizmu. Před HRM analýzou je nutné amplifikovat templát za přítomnosti fluorescenční barvy specificky se vážící k dvouvláknové DNA. Během HRM dochází k postupnému zvyšování teploty qPCR produktu a denaturaci DNA, která je zaznamenávána v reálném čase jako snižování fluorescenčního signálu. Teplota tání DNA závisí na obsahu CG (tání při vyšší teplotě) a AT (tání při nižší teplotě) párů bazí a jejich rozmístění v ampliconu. Pomocí HRM analýzy lze detekovat záměnu jediné baze, která se projeví změnou křivky tání. Křivka standardního a variantního homozygota se liší změnou teploty tání, heterozygoti mají odlišný tvar křivky způsobený nesprávným párováním bazí, které vzniklo během PCR reakce v důsledku spojení standardního a variantního DNA vlákna.

HRM analýza byla provedena u 3 vybraných *PRCI* polymorfizmů, rs12910825, rs8028856 a rs8031684, pro něž byly pro předchozí studie provedené na Oddělení toxikogenomiky SZÚ navrženy primery v programu Primer3 v4.0 (<http://primer3.ut.ee>), specifikace primerů spolu se SNP jsou uvedeny v Tab. 11. Pro každý vzorek se připravilo 7,5 µl reakční směsi obsahující Type-it HRM PCR MasterMix s komponentami důležitými pro reakci, mimo jiné HotStarTaq® *Plus* DNA polymerázou a EvaGreen fluorescenční barvou specificky se vážící k dvouvláknové DNA. Ke směsi bylo přidáno 2,5 µl ředěné DNA (2ng/ µl) v NFW. Konečné složení 10 µl reakční směsi bylo následovné:

| | | |
|--------------|--------------------------------|---------------------|
| | | finální koncentrace |
| 1,9 µl | NFW | - |
| 5 µl | Type-it HRM PCR MasterMix (2x) | 1x |
| 0,3 + 0,3 µl | F + R primery (10 µM) | 0,3 µM + 0,3 µM |
| 2,5 µl | DNA (20 ng/µl) | 4 ng/µl |

| <i>PRCI</i> (NM_003981.3; NP_003972.1) | | | | |
|--|---|----------------------|--------------|-----------------|
| Číslo SNP | Primery (5' → 3') | Délka ampliconu (bp) | Typ varianty | Alely maj./min. |
| rs12910825 | F: cgtctggtttgggtgctat R: ctgaggccttgaacctgct | 171 | intron | A/G |
| rs8028856 | F: tgccagggagtcttagttg R: aaaatacaaatctaactggctctg | 152 | intron | A/G |
| rs8031684 | F: gaaagcagccattgcac R: acaagagggaacagtcca | 155 | intron | T/A |

Tab. 11: Specifikace primerů navržených pro HRM analýzu vybraných polymorfizmů. Pozice v transkriptu, změna kodonu a změna aminokyseliny vzhledem k typu polymorfizmů nejsou uvedeny. F označuje přední, R zpětný primer.

Pro všechny reakce se vytvořila také negativní kontrola obsahující NFW místo DNA. Reakce probíhala v 0,1 ml zkumavkách na přístroji RotorGene 6000 (Corbett Life Science) s nastaveným programem:

PCR: 10 minut při 95 °C; 40x 30 sekund při 95 °C, 30 sekund při 58 °C a 30 sekund při 72 °C

HRM: 65–95 °C, stoupání 0,1 °C/cyklus

Analýza křivek tání byla provedena v softwaru Rotor-Gene Q 2.0.2 (QIAGEN), vzorky byly rozděleny dle genotypů na standardní nebo variantní homozygoty a heterozygoty.

V případě nejasné identifikace genotypu byla analýza pro takové vzorky opakována. Poté se spočítala frekvence alel (viz kapitola 4.4.1 Alelická diskriminace).

4.4.3 Vyhodnocení genotypizační studie

Statistická analýza srovnání genotypů s expresními a klinickými daty byla provedena v softwaru SPSS v16.0. Klinická data byla srovnávána mezi jednotlivými genotypy a přítomnostmi jednotlivých alel, přičemž standardní genotyp sloužil jako referenční. V případě srovnání výskytu majoritní alely s určitou charakteristikou sloužil jako referenční genotyp variantní homozygot. Spojitá data byla nejprve podrobena Kolmogorov-Smirnov testu pro určení charakteru rozložení dat a zvolení dalších statistických testů. Vztahy polymorfizmů k faktoriálním veličinám, tedy k histologickému typu, stadiu onemocnění a gradu byly hodnoceny pomocí kontingenčních tabulek a Mantel-Haenszel testu, v rámci kterého se počítá tzv. poměr pravděpodobností (odds ratio, OD) vyjadřující pravděpodobnost výskytu jevu, tedy určité klinické charakteristiky, u testovaného genotypu v porovnání s referenčním genotypem. Exprese markeru Ki67 byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallis testu pro spojitá data a TTP Kaplan-Meyer testem, signifikance metodou Log Rank. Analýza vztahu genotypu s hladinou exprese daného genu na úrovni transkriptu a proteinu (pouze u *PRCI* SNP) byla provedena Kruskal-Wallis testem.

Výsledky analýz stadia, gradu a histologického typu byly podrobeny B-H korekci (viz kapitola 4.2.2 Statistické vyhodnocení studie genové exprese) a u signifikantních vztahů sledovaného polymorfizmu s TTP byla provedena multiparametrická analýza pomocí Cox regrese adjustované na stadium, typ, grade a výskyt vzdálených metastáz. V tomto případě byla multiparametrická analýza adjustována také na histologický typ nádoru, jelikož soubor pacientek vykazoval v této charakteristice větší variabilitu, než v případě souboru pacientek ve validační studii genové exprese (viz kapitola 5 Výsledky). V rámci Cox regrese je počítáno také tzv. hazard ratio (viz kapitola 4.2.2 Statistické vyhodnocení studie genové exprese).

Dle výsledků korelace některých polymorfizmů s klinickými daty byla provedena také haplotypová analýza vybraných polymorfizmů v programu HaploView v4.2, pomocí něhož lze určit sílu vazby mezi polymorfizmy ze získaných genotypů ve studované populaci.

Vybrané polymorfizmy byly analyzované v softwaru RegulomeDB v1.1 (<http://regulome.stanford.edu>), kde byl *in silico* predikován jejich potenciální funkční význam. RegulomeDB je databáze propojující velké množství informací o regulačních oblastech genů, známých i predikovaných, s informacemi o variantách, které byly získané pomocí genomového sekvenování nebo celogenomových asociačních studií. Tento přístup

umožňuje přiřazení regulační informace k jakémukoliv polymorfizmu, a tak je možné predikovat jeho význam přiřazením skóre 1–6, přičemž 1 znamená nejvyšší pravděpodobnost, že se varianta nachází v regulační oblasti genu a je tedy funkčně významná (Boyle *et al.*, 2012).

5 Výsledky

5.1 Studie genové exprese

První částí předkládané práce je validační studie genové exprese, jejímž cílem bylo potvrdit potenciální prognostickou hodnotu kandidátních genů z výsledků pilotní studie provedené Mgr. Kateřinou Elsnerovou v letech 2013–2014, a identifikovat tak nové prognosticky a terapeuticky významné geny.

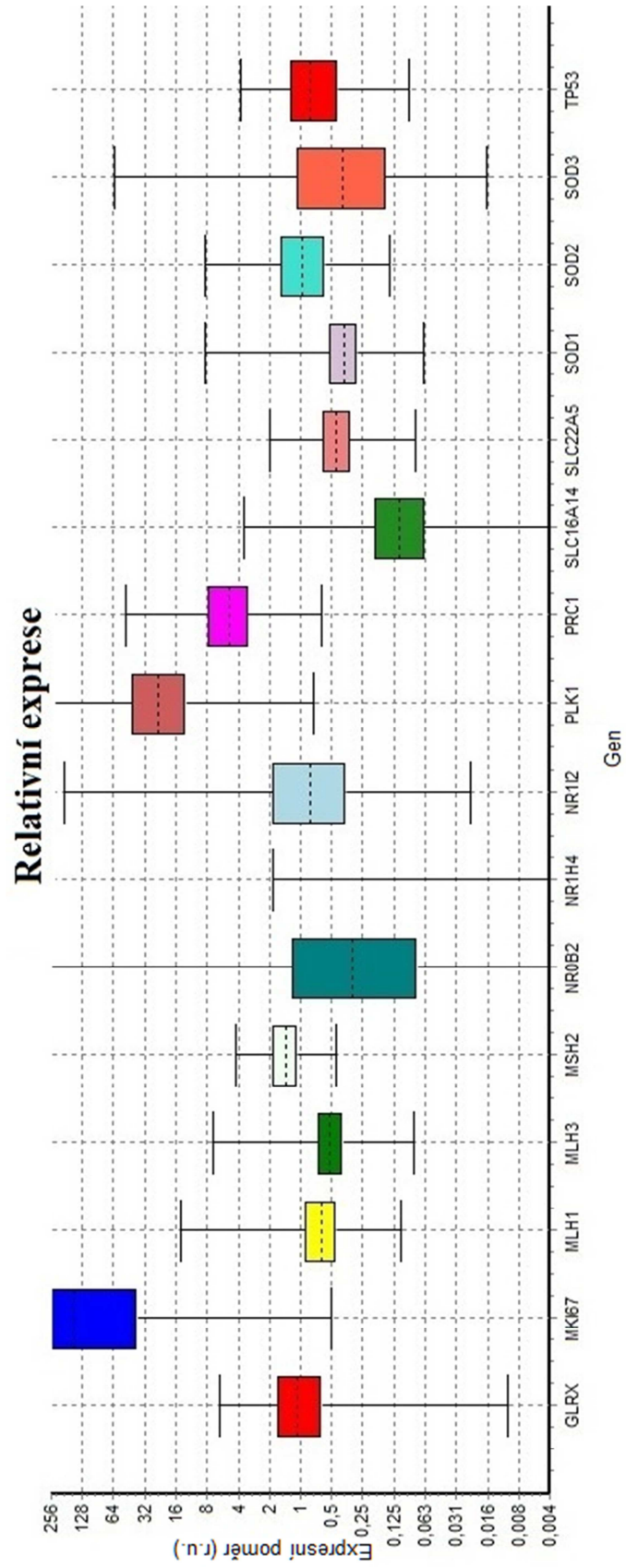
5.1.1 Srovnání expresní hladiny mezi tumory a kontrolními tkáněmi

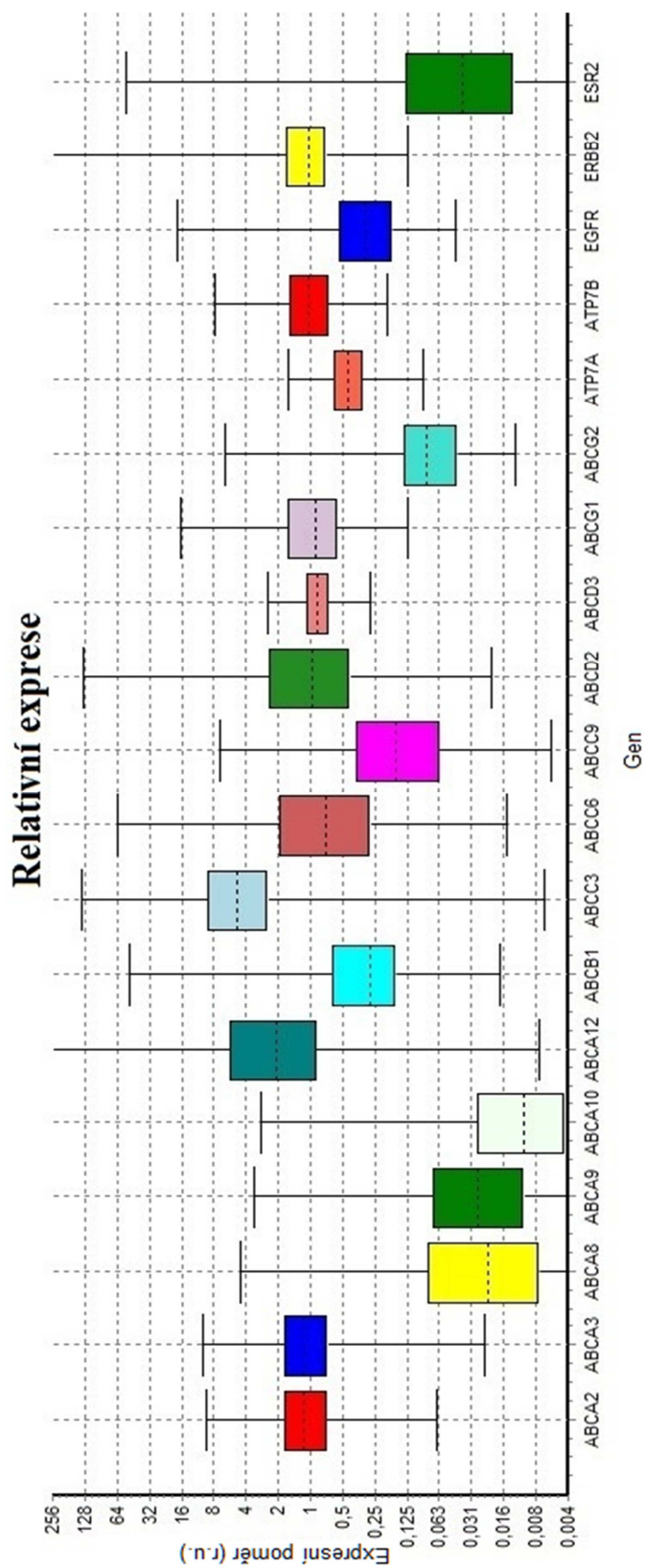
První částí validační studie bylo porovnat hladinu exprese 35 kandidátních genů mezi tumory a kontrolní ovariální tkání. Studie tohoto typu slouží k charakterizaci a porozumění molekulárních mechanismů a fyziologie nádoru. Do validační studie genové exprese bylo zařazeno 57 vzorků nádorové tkáně pacientek s ovariálním karcinomem, jako kontroly se použily vzorky ovariální tkáně 14 žen bez známek maligního nádorového onemocnění vaječníků. Spolu se studovanými geny byly změřeny také 3 referenční geny, které sloužily k normalizaci získaných hodnot. Srovnání exprese v tumorech a kontrolní tkáni bylo provedeno pomocí softwaru REST 2009, výsledky jsou uvedeny v Tab. 12 a krabicové diagramy jsou znázorněny na Obr. 24.

| Gen | Účinnost reakce (%) | Expresní poměr (r.u.) | p-hodnota | 95% konfidenční interval | Nádorová vs. kontrolní tkáň |
|------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Transport | | | | | |
| <i>ABCA2</i> | 97,4 | 1,16 | 0,424 | 0,57–2,37 | - |
| <i>ABCA3</i> | 95,0 | 0,99 | 0,950 | 0,48–2,20 | - |
| <i>ABCA8</i> | 92,6 | 0,02 | < 0,001 ^a | 0,00–0,19 | snížená exprese |
| <i>ABCA9</i> | 90,6 | 0,03 | < 0,001 ^a | 0,01–0,12 | snížená exprese |
| <i>ABCA10</i> | 95,6 | 0,01 | < 0,001 ^a | 0,00–0,05 | snížená exprese |
| <i>ABCA12</i> | 97,8 | 2,34 | 0,019 ^a | 0,50–9,98 | zvýšená exprese |
| <i>ABCB1</i> | 91,3 | 0,33 | < 0,001 ^a | 0,11–1,09 | snížená exprese |
| <i>ABCC3</i> | 94,3 | 4,33 | < 0,001 ^a | 1,65–13,14 | zvýšená exprese |
| <i>ABCC6</i> | 99,3 | 0,72 | 0,289 | 0,18–3,15 | - |
| <i>ABCC9</i> | 94,2 | 0,16 | < 0,001 ^a | 0,04–0,61 | snížená exprese |
| <i>ABCD2</i> | 90,8 | 1,05 | 0,887 | 0,28–3,93 | - |
| <i>ABCD3</i> | 92,4 | 0,86 | 0,137 | 0,60–1,20 | - |
| <i>ABCG1</i> | 96,2 | 1,00 | 0,975 | 0,45–2,19 | - |

| | | | | | |
|-----------------------|------|--------|----------------------|----------------|-----------------|
| <i>ABCG2</i> | 93,9 | 0,08 | < 0,001 ^a | 0,03–0,20 | snížená exprese |
| <i>ATP7A</i> | 94,4 | 0,43 | < 0,001 ^a | 0,26–0,72 | snížená exprese |
| <i>ATP7B</i> | 95,4 | 1,06 | 0,760 | 0,54–2,11 | - |
| <i>SLC16A14</i> | 91,6 | 0,10 | < 0,001 ^a | 0,05–0,25 | snížená exprese |
| <i>SLC22A5</i> | 95,0 | 0,45 | < 0,001 ^a | 0,27–0,71 | snížená exprese |
| MMR | | | | | |
| <i>MLH1</i> | 92,3 | 0,65 | 0,004 ^a | 0,36–1,11 | snížená exprese |
| <i>MLH3</i> | 92,4 | 0,54 | < 0,001 ^a | 0,32–0,88 | snížená exprese |
| <i>MSH2</i> | 93,1 | 1,42 | 0,003 ^a | 0,92–2,26 | zvýšená exprese |
| Buněčný cyklus | | | | | |
| <i>PLK1</i> | 93,7 | 22,19 | < 0,001 ^a | 8,64–57,87 | zvýšená exprese |
| <i>PRC1</i> | 94,0 | 5,04 | < 0,001 ^a | 2,48–10,02 | zvýšená exprese |
| <i>MKI67</i> | 97,9 | 131,44 | < 0,001 ^a | 16,18–1 051,81 | zvýšená exprese |
| <i>TP53</i> | 94,4 | 0,70 | 0,080 | 0,29–1,53 | - |
| Metabolismus | | | | | |
| <i>GLRX</i> | 99,9 | 1,00 | 0,989 | 0,46–2,37 | - |
| <i>SOD1</i> | 96,5 | 0,40 | < 0,001 ^a | 0,23–0,66 | snížená exprese |
| <i>SOD2</i> | 94,4 | 0,95 | 0,791 | 0,40–2,08 | - |
| <i>SOD3</i> | 94,4 | 0,45 | 0,022 ^a | 0,10–2,13 | snížená exprese |
| Signalizace | | | | | |
| <i>EGFR</i> | 97,5 | 0,34 | < 0,001 ^a | 0,14–0,69 | snížená exprese |
| <i>ERBB2</i> | 96,3 | 1,92 | 0,089 | 0,55–2,53 | - |
| <i>ESR2</i> | 93,8 | 0,04 | < 0,001 ^a | 0,01–0,30 | snížená exprese |
| <i>NROB2</i> | 97,3 | 0,34 | 0,031 ^a | 0,04–2,51 | snížená exprese |
| <i>NR1H4</i> | 93,9 | 0,001 | < 0,001 ^a | 0,00–0,01 | snížená exprese |
| <i>NR1I2</i> | 91,8 | 0,88 | 0,709 | 0,24–3,34 | - |

Tab. 12: Srovnání genové exprese studovaných genů v nádorové a kontrolní tkáni. Účinnost reakce byla spočítána ze standardní křivky po qPCR reakci. Expresní poměr v relativních jednotkách vyjadřuje míru a směr změny exprese (od hodnoty 1, což je relativní hodnota exprese referenčních genů). Finální výsledek (snížená, zvýšená exprese) u tučně zvýrazněných genů se shodoval s výsledky pilotní studie (viz kapitola 4.2 Studie genové exprese), v případě *PRC1* s výsledky studie (Ehrlichova *et al.*, 2013). ^aVýsledky zůstaly signifikantní po provedení B-H korekce.





Obr. 24: Krabicový diagram znázorňující změnu exprese v nádorové vs. kontrolní tkáni. Na ose X jsou jednotlivé geny, na ose Y expresní poměr vztažený k referenčním genům.

5.1.2 Srovnání expresní hladiny v nádorové tkáni s klinickými daty

Další částí studie genové exprese bylo porovnání hladiny exprese kandidátních genů v tumorech s klinickými daty pacientek. Cílem byla identifikace nových potenciálních prognostických genů pro další studium.

Do validační studie genové exprese bylo zařazeno 57 vzorků nádorové tkáně pacientek s ovariálním karcinomem ve věku 42–81 let. Všechny pacientky prodělaly operativní zákrok, následně podstoupily léčbu adjuvantní chemoterapií na bázi platinového derivátu a paklitaxelu a nadále byly sledovány ve Fakultní nemocnici Motol. Klinická data studovaného souboru pacientek shrnuje Tab. 13.

| Klinická charakteristika | Soubor patientek | |
|---|------------------|--------|
| | N | % |
| Medián věku v době diagnózy (roky) | 57,0 | |
| Stadium | | |
| I | 3 | (5,4) |
| II | 2 | (3,6) |
| III | 47 | (83,9) |
| IV | 4 | (7,1) |
| celkem | 56 | (100) |
| neznámo | 1 | |
| Typ nádoru | | |
| HGSC | 54 | (94,7) |
| ostatní | 3 | (5,3) |
| celkem | 57 | (100) |
| neznámo | 0 | |
| Grade | | |
| G1 | 1 | (1,8) |
| G2 | 9 | (15,8) |
| G3 | 47 | (82,5) |
| celkem | 57 | (100) |
| neznámo | 0 | |
| Vzdálené metastázy | | |
| ano | 4 | (7,1) |
| ne | 52 | (92,9) |
| celkem | 56 | (100) |
| neznámo | 1 | |
| TTP | | |
| medián (měsíce) | 13,0 | |
| počet hodnocených patientek | 29 | |
| Expresse Ki67 | | |
| medián (%) | 25,0 | |
| počet hodnocených patientek | 57 | |

Tab. 13: Tabulka klinických dat souboru patientek zařazených do validační studie genové exprese.

Naměřené hodnoty Cq normalizované k referenčním genům byly statisticky porovnány s klinickými daty v softwaru SPSS v16.0. Nejprve byly změřené exprese všech genů podrobeny Kolmogorov-Smirnov testu, a jelikož většina hodnot nevykazovala normální rozložení, pro statistické vyhodnocení byly použity neparametrické testy.

Faktoriální data byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallis testu, u signifikantních výsledků se směr vztahu určil jednofaktorovým ANOVA testem, a pro spojitá data se využil

Spearman test. TTP byla hodnocena Kaplan-Meier testem a signifikance metodou Log Rank. Hodnocení histologického typu nebylo z důvodu malé rozmanitosti, která je způsobena také velikostí souboru, do výsledků zahrnuto. U 9 z celkových 35 studovaných genů byl nalezen vztah mezi hladinou jejich exprese a některou klinickou charakteristikou. Signifikantní výsledky jsou uvedeny v Tab. 14 a) a b) a na Obr. 25. Výsledky pilotní a validační studie genové exprese týkající se membránových transportérů byly publikovány v časopise *Oncology Reports* a článek je k nahlédnutí v Příloze II.

Tab. 14 a)

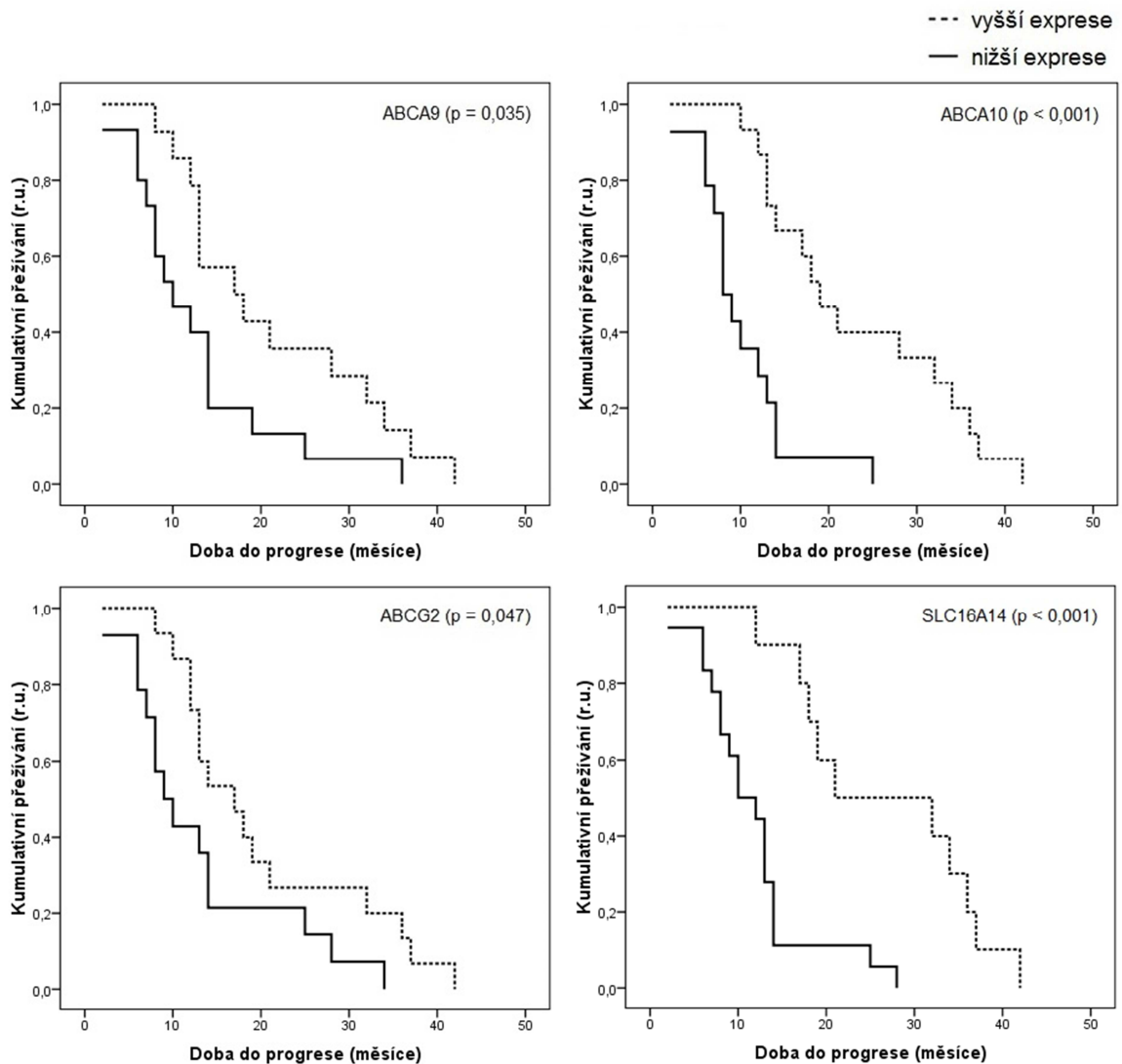
| Gen | Grade | | Exprese Ki67 |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 1 + 2 | 3 | |
| Transport | | | |
| <i>ABCA2</i> | 1,27 ±0,05 | 1,31 ±0,04 | r = 0,319 |
| | p = 0,012 | | p = 0,017 |
| <i>ABCA10</i> | NS | | r = 0,296 |
| | | | p = 0,025 |
| Buněčný cyklus | | | |
| <i>PLK1</i> | NS | | r = -0,328 |
| | | | p = 0,013 |
| <i>PRC1</i> | NS | | r = -0,281 |
| | | | p = 0,036 |
| <i>MKI67</i> | NS | | r = -0,322 |
| | | | p = 0,015 |
| Signalizace | | | |
| <i>ESR2</i> | 1,35 ±0,13 | 1,49 ±0,11 | NS |
| | p = 0,010 | | |

Tab. 14 a): Signifikantní výsledky statistického porovnání hladiny exprese vybraných genů s klinickými daty pacientek. Pro analýzu byly využity normalizované hodnoty Cq k průměru referenčních genů, Cq/REF, čím menší je tedy vypočítaný poměr, tím je hladina exprese daného genu vyšší. V tabulce jsou signifikantní výsledky srovnání gradu s expresí jednotlivých genů uvedeny jako průměr normalizovaných Cq hodnot ± směrodatná odchylka, spolu s danou p-hodnotou. Výsledky srovnání exprese Ki67 a exprese studovaných genů jsou uvedeny jako r, což je Spearmanův korelační koeficient (záporná hodnota v tomto případě znamená pozitivní korelaci), a příslušná p-hodnota. Tučně zvýrazněné výsledky v tabulkách potvrzují vztahy nalezené v pilotní studii, v případě *PRC1* ve studii Ehrlichova *et al.* (2013). Žádný nový signifikantní výsledek nevyvrací výstupy pilotní studie. V případě nesignifikantních výsledků je v tabulce uvedeno NS (non significant).

Tab. 14 b)

| Gen | Exprese | TTP | | | | Cox regrese | | |
|------------------|---------|-----|--------|-----------|----------------------|-------------|-----------|-------|
| | | N | Medián | 95% CI | p | HR | 95% CI | p |
| Transport | | | | | | | | |
| <i>ABCA9</i> | ↑ | 14 | 17,0 | 7,8–26,2 | 0,035 | NS | | |
| | ↓ | 15 | 10,0 | 5,0–15,1 | | | | |
| <i>ABCA10</i> | ↑ | 15 | 19,0 | 14,0–24,1 | < 0,001 ^a | 0,17 | 0,06–0,49 | 0,001 |
| | ↓ | 14 | 8,0 | 6,2–9,9 | | | | |
| <i>ABCG2</i> | ↑ | 15 | 17,0 | 10,7–23,3 | 0,047 ^a | 0,41 | 0,18–0,95 | 0,038 |
| | ↓ | 14 | 9,0 | 5,3–12,7 | | | | |
| <i>SLC16A14</i> | ↑ | 10 | 21,0 | 0,9–41,1 | < 0,001 ^a | 0,24 | 0,09–0,41 | 0,003 |
| | ↓ | 18 | 10,0 | 5,8–14,2 | | | | |

Tab. 14 b): Signifikantní výsledky statistického porovnání hladiny exprese vybraných genů s TTP neboli dobou od operace do progresu, relapsu, nebo úmrtí pacientek. Pro analýzu byly využity normalizované hodnoty Cq k průměru referenčních genů, tedy Cq/REF. Před analýzou byly subjekty rozděleny dle mediánu na skupiny s nižší a vyšší expresí. V tabulce jsou uvedeny signifikantní výsledky korelace vyšší a nižší exprese (šipky) s TTP. Uveden je studovaný počet pacientek (N) s vyšší a nižší expresí, medián TTP v měsících, 95% konfidenční interval (95% CI) a p-hodnota. Tabulka zahrnuje také výsledky Cox regrese s tzv. hazard ratio (HR) vyjadřujícím pravděpodobnost, že k progresi dojde u jedné skupiny pacientek dříve (> 1), nebo později (< 1) než u druhé. Uveden je i 95% konfidenční interval a p-hodnota po multiparametrické analýze adjustované na stadium, grade a výskyt vzdálených metastáz. Grafy hodnocení TTP jsou uvedeny v Obr. 25. Tučně zvýrazněné výsledky v tabulkách potvrzují vztahy nalezené v pilotní studii. Žádný nový signifikantní výsledek nevyvrací výstupy pilotní studie. ^aVýsledek multiparametrické analýzy byl významný. V případě nesignifikantních výsledků je v tabulce uvedeno NS (non significant).



Obr. 25: Signifikantní korelace genové exprese s TTP hodnocenou jako doba od operace do progresu, relapsu, nebo úmrtí pacientek stanovená v měsících, určena pomocí Kaplan-Meier testu. TTP byla hodnocena pomocí rozdělení pacientek dle mediánu na subjekty s vyšší a nižší expresí. Na ose X je znázorněna doba do progresu v měsících (TTP), na ose Y kumulativní přežívání v relativních jednotkách (r.u.).

Výsledky statistické analýzy srovnání gradu a exprese Ki67 s klinickými daty byly podrobeny B-H korekci. Po provedení nezůstaly výsledky signifikantní, což je dáno do velké míry velikostí studovaného souboru pacientek. Na druhou stranu jednou z cest ověření výsledků na malé studii je validace na nezávislém souboru, což je případ této práce. Signifikantní výsledky srovnání hladiny exprese s TTP byly podrobeny Cox regresi adjustované na stadium, grade a výskyt vzdálených metastáz. Žádné nově nalezené signifikantní vztahy nevyvrací výstupy pilotní studie genové exprese.

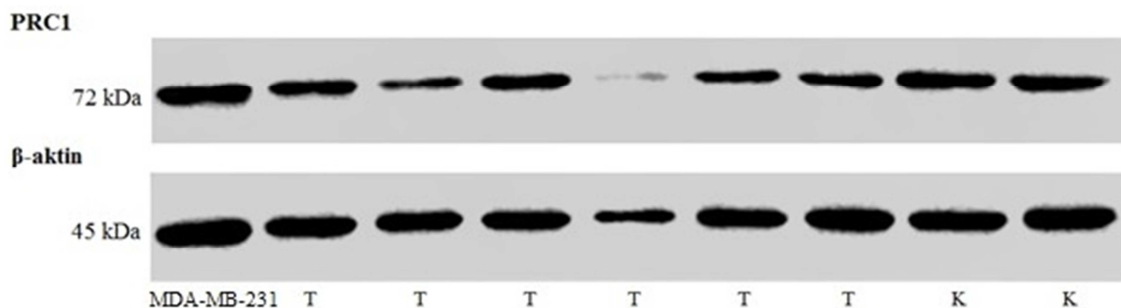
Pro další analýzy byly vybrány 2 geny, jeden gen kódující membránový transportér ABCA2 a druhý regulátor buněčného dělení PRC1. Exprese genu *ABCA2* koreluje se 2 klinickými charakteristikami, přičemž jeden vztah byl potvrzen z pilotní studie. Gen *PRC1* byl vybrán jako nejzajímavější kandidát z dosavadních studií prováděných na Oddělení toxikogenomiky SZÚ se vztahem k prognóze pacientek léčených chemoterapeutiky na bázi platinového derivátu a paklitaxelu u prsního karcinomu (Brynychova *et al.*, 2016). Korelace *PRC1* s markerem Ki67 byla potvrzením studie probíhající na Oddělení toxikogenomiky SZÚ v minulých letech (Ehrlichova *et al.*, 2013).

5.2 Sledování hladin proteinu v cílové tkáni

Cílem studie hladiny proteinu bylo zjistit, zda existuje vztah mezi hladinou transkriptu genů *PRC1* a *ABCA2* a množstvím proteinu v nádorové a kontrolní ovariální tkáni. Dalším cílem bylo srovnání exprese na úrovni proteinu mezi tumory a kontrolami. Součástí studie bylo i porovnání hladiny proteinu s klinickými daty pacientek.

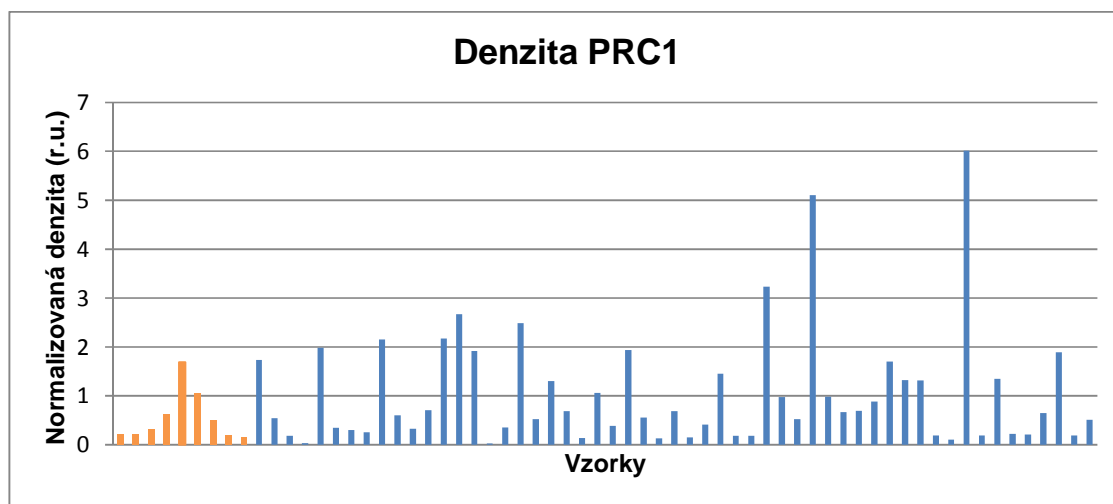
5.2.1 Protein PRC1

Hladina proteinu PRC1 byla stanovena v nádorové tkáni u 57 pacientek (viz kapitola 5.1.2 Srovnání expresní hladiny v nádorové tkáni s klinickými daty) a u 9 kontrolních vzorků použitých ve studii genové exprese. Spolu s PRC1 byl ve vzorcích detekován také β -aktin, který sloužil ke kontrole kvality vzorků a k normalizaci naměřených denzit. Denzity byly normalizované také ke vzorku lidské nádorové buněčné linie MDA-MB-231, který se nanášel na každý gel a sloužil jako kalibrátor pro srovnání mezi jednotlivými membránami. Z důvodu degradace proteinu byly 2 nádorové vzorky z dalších analýz vyřazeny. Příklad výsledku provedeného imunoblotu a celkové výsledky zaznamenané v grafech jsou znázorněny na Obr. 26 a 27 a) a b).

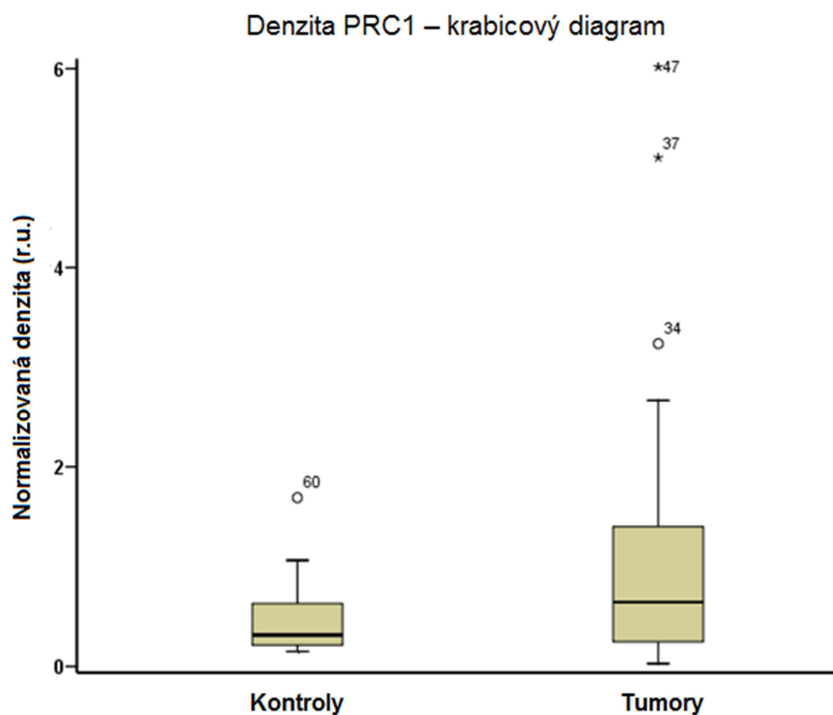


Obr. 26: Imunoblot studovaného proteinu PRC1 a kontrolního β -aktinu. Na membráně se nachází kontrolní vzorek MDA-MB-231, 6 nádorových a 2 kontrolní vzorky.

Obr. 27 a)



Obr. 27 b)



Obr. 27: Naměřená denzita PRC1 v nádorové a kontrolní ovariální tkáni. Na ose X v Obr. 27 a) jsou modře označené vzorky nádorové a oranžově vzorky kontrolní tkáně. Na ose Y jsou hodnoty denzity v relativních jednotkách (r.u.) normalizované na kontrolní protein β -aktin a vzorek kalibrátoru MDA-MB-231. Obr. 27 b) znázorňuje také naměřené a normalizované hodnoty PRC1, tentokrát v krabicovém diagramu rozlišeném na kontroly a tumory. Vzorky označené hvězdičkou a kroužkem se denzitou PRC1 od ostatních výrazně liší, jedná se o tzv. outliers. Hvězdičkou označené vzorky se odchyľují více, než ty označené kroužkem.

5.2.1.1 Srovnání hladiny PRC1 mezi tumory a kontrolními tkáněmi, porovnání s hladinou transkriptu

Prvním cílem studie hladiny proteinu bylo porovnání množství proteinu PRC1 mezi tumory a kontrolními tkáněmi. Celkem bylo statisticky porovnáno 55 nádorových a 9 kontrolních vzorků v softwaru SPSS v16.0 pomocí Kruskal-Wallis testu. Průměrná hladina proteinu v tumorech byla 1,05 a v kontrolních vzorcích 0,55 relativních jednotek. Medián u nádorů byl 0,64 a u kontrol 0,31, což naznačuje trend vyšší hladiny proteinu PRC1 u tumorů. Rozdíl hladin PRC1 mezi tumory a kontrolními tkáněmi však nebyl signifikantní ($p = 0,220$). Celkově byl u tumorů větší rozptyl denzity PRC1 než u kontrolní tkáně (viz Obr. 27 b)).

Dalším cílem bylo porovnání hladiny PRC1 v tumorech a kontrolních vzorcích s hladinou transkriptu genu *PRC1*. Srovnání bylo provedeno v softwaru SPSS v16.0 pomocí Spearman testu. U tumorů ani u kontrolních vzorků nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi hladinou transkriptu a proteinu ($p = 0,454$ pro tumory; $p = 0,865$ pro kontroly).

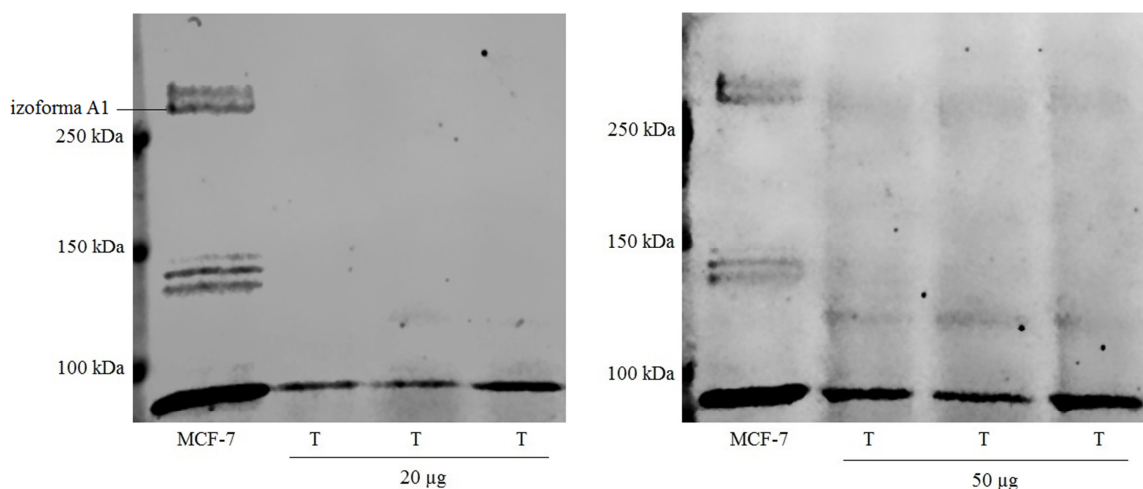
5.2.1.2 Srovnání hladiny PRC1 v nádorech s klinickými daty

Porovnání hladiny PRC1 s klinickými daty bylo provedeno na souboru pacientek z validační studie genové exprese (viz Tab. 13), ze kterého byly z důvodu degradace proteinu 2 vzorky vyřazeny. Srovnání 55 vzorků s klinickými daty bylo provedeno v softwaru SPSS v16.0 pomocí Kruskal-Wallis testu pro faktoriální a Spearman testu pro spojitá data. TTP se hodnotila Kaplan-Meier testem s hodnocením signifikance metodou Log Rank. Nebyl nalezen žádný signifikantní vztah mezi klinickými daty a hladinou proteinu PRC1 v nádorové tkáni pacientek.

5.2.2 Protein ABCA2

Po četných experimentech zaměřených na normalizaci podmínek imunoblotování se podařilo detekovat kanonickou izoformu 1A (270 kDa) proteinu ABCA2 v buněčné linii nádoru prsu MCF-7. V ovariálních nádorových vzorcích se však podařilo detekovat pouze 1 minoritní izoformu, pravděpodobně se jedná o formu proteinu obsahující 989 aminokyselin o velikosti 108 kDa (E9PGB2), která neobsahuje funkční domény klasických ABC transportérů (ENSEMBL, URL9). Výsledek imunoblotu s maximálním množstvím 50 μ g tkáňového proteinu naznačuje přítomnost majoritní formy ABCA2, avšak ze získaných výsledků nelze provést denzitometrii ani další analýzy. V tumorech byl slabě exprimován další protein s molekulovou hmotností okolo 120 kDa, který se nevyskytuje v kontrolní buněčné linii

a jeho velikost neodpovídá žádné známé izoformě ABCA2 (ENSEMBL, URL8). Výsledky imunoblotů jsou uvedeny na Obr. 28.



Obr. 28: Imunoblotování proteinu ABCA2. Uvedeny jsou výsledky 2 imunoblotů s různou nanáškou tkáňového proteinu. U obou byla v buněčné linii MCF-7 detekována požadovaná kanonická izoforma 1A, spolu s dalšími izoformami. V tkáňových vzorcích s 50 µg proteinu je náznak přítomnosti izoformy 1A, nejedná se však o průkazný výsledek, který by nás opravňoval k dalším závěrům.

5.3 Studie genetické variability kandidátních genů

Genotypizační studie vybraných vysoce frekventovaných nebo klinicky významných polymorfizmů genů *PRCI* a *ABCA2* byla provedena na souboru 98 pacientek s cílem identifikovat prognosticky a terapeuticky významné polymorfizmy pro ovariální karcinom. SNP byly detekovány v DNA z periferní krve, jedná se tedy o dědičné varianty.

5.3.1 Alelická diskriminace

Alelickou diskriminací bylo detekováno celkem 6 SNP, 3 u *ABCA2* a 3 u *PRCI*. Výsledky experimentu a frekvence získaných genotypů jsou uvedeny v Tab. 16 pro gen *ABCA2* a Tab. 17 pro gen *PRCI*. Příklad výsledku genotypizace alelickou diskriminací dle fluorescence FAMTM a VIC[®] sond je znázorněn na Obr. 29.

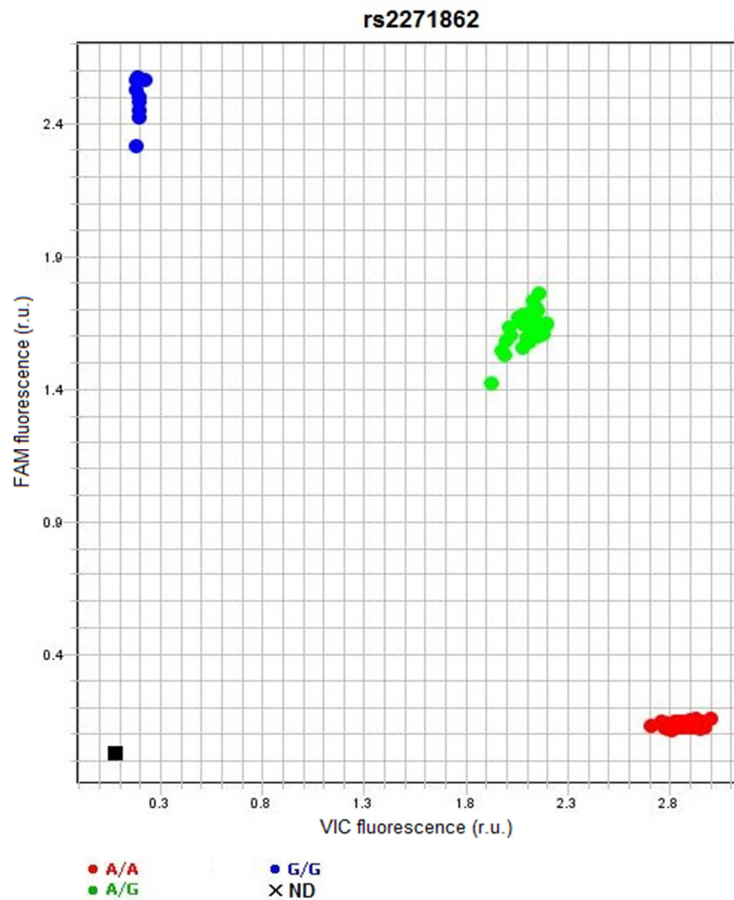
| ABCA2 SNP | Distribuce genotypů | | |
|------------------|----------------------------|--------|---|
| | AD (N + %) | | Frekvence alel (%) 1 000 Genomes frekvence (%) |
| rs2271862 | | | |
| A/A | 49 | (50,0) | A (69,9) G (30,1) |
| A/G | 39 | (39,8) | |
| G/G | 10 | (10,2) | |
| Celkem | 98 | (100) | A (67,0) G (33,0) |
| rs7048567 | | | |
| G/G | 47 | (48,0) | G (68,9) A (31,1) |
| G/A | 41 | (41,8) | |
| A/A | 10 | (10,2) | |
| Celkem | 98 | (100) | G (68,0) A (32,0) |
| rs908832 | | | |
| G/G | 93 | (94,9) | G (97,4) A (2,6) |
| G/A | 5 | (5,1) | |
| A/A | 0 | (0) | |
| Celkem | 98 | (100) | G (97,0) A (3,0) |

Tab. 16: Výsledky alelické diskriminace (AD) genu *ABCA2*. Uvedeny jsou distribuce genotypů (počet nosiček i procento z celku), zjištěná frekvence alel a pro srovnání i frekvence alel v evropské populaci dle 1 000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org>).

| PRCI SNP | Distribuce genotypů | | |
|-------------------|----------------------------|--------|---|
| | AD (N + %) | | Frekvence alel (%) 1 000 Genomes frekvence (%) |
| rs2290203 | | | |
| G/G | 64 | (65,3) | G (81,1) A (18,9) |
| G/A | 31 | (31,6) | |
| A/A | 3 | (3,1) | |
| Celkem | 98 | (100) | G (79,0) A (21,0) |
| rs8042680 | | | |
| C/C | 44 | (44,9) | C (65,8) A (34,1) |
| C/A | 41 | (41,8) | |
| A/A | 13 | (13,3) | |
| Celkem | 98 | (100) | C (67,0) A (33,0) |
| rs11852999 | | | |
| C/C | 76 | (79,2) | C (89,6) T (10,4) |
| C/T | 20 | (20,8) | |
| T/T | 0 | (0) | |
| Celkem | 96 | (100) | C (93,0) T (7,0) |
| ND | 2 | | |

Tab. 17: Výsledky alelické diskriminace (AD) genu *PRCI*. Uvedeny jsou distribuce genotypů (počet nosiček i procento z celku), zjištěná frekvence alel a pro srovnání i frekvence alel v evropské populaci dle 1 000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org>).

Frekvence minoritních alel sledovaných genů ve studované populaci je srovnatelná s frekvencí u evropské populace sledované v rámci projektu 1 000 Genomes.



Obr. 29: Příklad výstupu analýzy genotypů polymorfizmu rs2271862 genu *ABCA2* alelickou diskriminací dle fluorescence FAMTM a VIC[®] sondy. Osa X vyjadřuje míru fluorescence FAMTM (alela G) a Y míru fluorescence VIC[®] (alela A) sondy v relativních jednotkách (r.u.). Černý čtverec znázorňuje negativní kontrolu bez DNA.

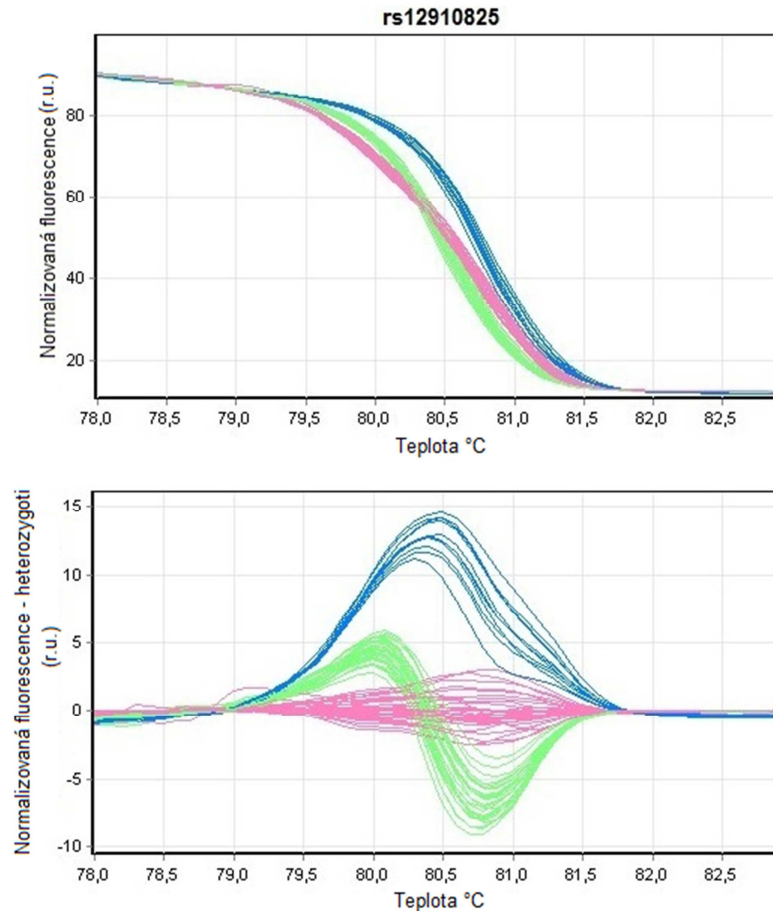
5.3.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání

Pomocí HRM analýzy byly detekované 3 SNP v genu *PRCI*. Výsledky experimentu a frekvence získaných genotypů jsou uvedeny v Tab. 18. Pro přesnou identifikaci genotypů byly kromě křivek tání zobrazeny také diferenciační grafy normalizované k jednotlivým genotypům. Příklad křivky tání a diferenciačního grafu je zobrazen na Obr. 30.

| <i>PRC1</i> SNP | Distribuce genotypů | | |
|-------------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| | HRM (N + %) | Frekvence alel (%) | 1 000 Genomes frekvence (%) |
| rs12910825 | | | |
| A/A | 38 (38,8) | A (62,2) G (37,8) | A (62,0) |
| A/G | 46 (46,9) | | G (38,0) |
| G/G | 14 (14,3) | | |
| Celkem | 98 (100) | | |
| rs8028856 | | | |
| A/A | 50 (52,6) | A (73,7) G (26,3) | A (74,0) |
| A/G | 40 (42,1) | | G (26,0) |
| G/G | 5 (5,3) | | |
| Celkem | 95 (100) | | |
| ND | 3 | | |
| rs8031684 | | | |
| T/T | 64 (57,1) | T (81,6) A (18,4) | T (81,0) |
| T/A | 27 (27,6) | | A (19,0) |
| A/A | 4 (15,3) | | |
| Celkem | 95 (100) | | |
| ND | 3 | | |

Tab. 18: Výsledky HRM analýzy. Uveden je počet zjištěných genotypů a procento z celku, zjištěná frekvence alel a pro srovnání i frekvence alel v evropské populaci dle 1 000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org>).

Frekvence minoritních alel ve studované populaci je srovnatelná s frekvencí u evropské populace sledované v rámci projektu 1 000 Genomes.



Obr. 30: Příklad výstupu HRM analýzy – křivka tání a diferenciační graf polymorfismu rs12910825 genu *PRCI*. Osa X vyjadřuje vzrůstající teplotu ve °C, osa Y normalizovanou fluorescenci v relativních jednotkách (r.u.) v prvním grafu a normalizovanou fluorescenci na heterozygoty (r.u.) ve druhém grafu. Zelená barva označuje standardní homozygoty, růžová heterozygoty a modrá variantní homozygoty.

5.3.3 Srovnání genotypů vybraných polymorfizmů s klinickými daty

Cílem genotypizační studie bylo porovnání genotypů vybraných polymorfizmů s klinickými daty pacientek a identifikace nových prognostických SNP, které by lékařům usnadnily volbu správné terapie a určení prognózy pro dané pacientky. Bylo provedeno také srovnání genotypů s fenotypy, tzn. hladinou transkriptu a proteinu.

Do genotypizační studie bylo zařazeno 98 vzorků periferní krve pacientek s ovariálním karcinomem ve věku 31–84 let. Odběr krve byl proveden před chirurgickým zákrokem a léčbou. Klinická data studovaného souboru pacientek shrnuje Tab. 19.

| Klinická charakteristika | Soubor pacientek | |
|---|------------------|--------|
| | N | % |
| Medián věku v době diagnózy (roky) | 59,5 | |
| Stadium | | |
| I | 3 | (3,3) |
| II | 6 | (6,5) |
| III | 75 | (81,5) |
| IV | 8 | (8,7) |
| celkem | 92 | (100) |
| neznámo | 6 | |
| Typ nádoru | | |
| HGSC | 81 | (85,3) |
| ostatní | 14 | (14,7) |
| celkem | 95 | (100) |
| neznámo | 3 | |
| Grade | | |
| G1 | 3 | (3,1) |
| G2 | 16 | (16,5) |
| G3 | 78 | (80,4) |
| celkem | 97 | (100) |
| neznámo | 1 | |
| Vzdálené metastázy | | |
| ano | 8 | (9,0) |
| ne | 81 | (91,0) |
| celkem | 89 | (100) |
| neznámo | 9 | |
| TTP | | |
| medián (měsíce) | 13,0 | |
| počet hodnocených pacientek | 45 | |
| Expresse Ki67 | | |
| medián (%) | 30,0 | |
| počet hodnocených pacientek | 71 | |

Tab. 19: Tabulka klinických dat souboru pacientek zařazených do genotypizační studie.

Zjištěné genotypy byly statisticky porovnány s klinickými daty v softwaru SPSS v16.0. Klinická data byla srovnána mezi jednotlivými genotypy a výskytem jednotlivých alel, přičemž standardní genotyp sloužil jako referenční. V případě srovnání výskytu majoritní alely s určitou charakteristikou sloužil jako referenční genotyp variantní homozygot. Faktoriální data byla s genotypy hodnocena pomocí kontingenčních tabulek s OR a Mantel-Haenszel testu. Pro spojitá data se využil neparametrický Kruskal-Wallis test

vzhledem k rozložení dat. K hodnocení TTP se použil Kaplan-Meier test a signifikance byla určena Log Rank testem. U 3 polymorfizmů genu *PRCI* a u 3 polymorfizmů genu *ABCA2* byla nalezena korelace s některou klinickou charakteristikou. Signifikanční výsledky jsou uvedeny v Tab. 20 a) a b) a Obr. 31.

Tab. 20 a)

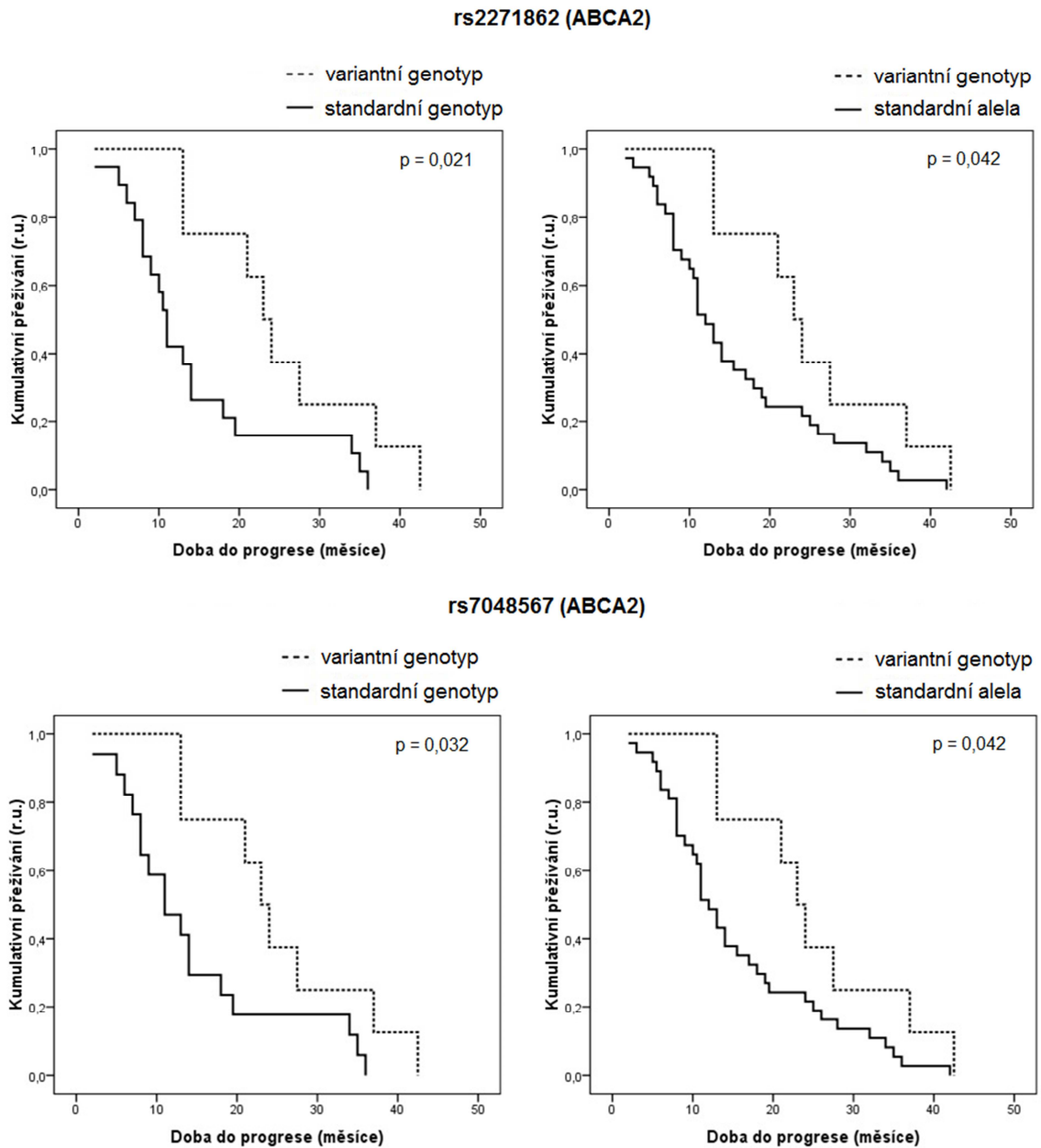
| <u>PRCI SNP</u> | Stadium | | | | OR | 95% CI | p |
|------------------|----------|--------|---------|--------|-------|--------------------|--------------------|
| | III + IV | | I + II | | | | |
| | N | % | N | % | | | |
| rs2290203 | | | | | | | |
| G/G | 56 | (67,5) | 2 | (22,2) | | referenční genotyp | |
| G/A | 26 | (31,3) | 5 | (55,6) | | NS | |
| A/A | 1 | (1,2) | 2 | (22,2) | 0,02 | 0–0,29 | 0,005 ^a |
| Alela A | 27 | - | 7 | - | 0,14 | 0,03–0,71 | 0,017 |
| Alela G* | 82 | - | 7 | - | 23,43 | 1,88–291,63 | 0,014 |
| rs8028856 | | | | | | | |
| A/A | 43 | (53,8) | 2 | (22,2) | | referenční genotyp | |
| A/G | 35 | (43,8) | 4 | (44,4) | | NS | |
| G/G | 2 | (2,5) | 3 | (33,3) | 0,03 | 0–0,3 | 0,003 ^a |
| Alela G | 37 | - | 7 | - | | NS | |
| Alela A* | 78 | - | 6 | - | 19,5 | 2,71–140,18 | 0,003 ^a |
| <u>PRCI SNP</u> | Typ | | | | OR | 95% CI | p |
| | HGSC | | ostatní | | | | |
| | N | % | N | % | | | |
| rs8031684 | | | | | | | |
| T/T | 51 | (69,9) | 14 | (63,6) | | referenční genotyp | |
| T/A | 21 | (28,8) | 5 | (22,7) | | NS | |
| A/A | 1 | (1,4) | 3 | (13,6) | 0,09 | 0,01–0,95 | 0,045 |
| Alela A | 22 | - | 8 | - | | NS | |
| Alela T* | 72 | - | 19 | - | 11,37 | 1,12–115,56 | 0,039 |
| <u>ABCA2 SNP</u> | Grade | | | | OR | 95% CI | p |
| | 3 | | 1 + 2 | | | | |
| | N | % | N | % | | | |
| rs908832 | | | | | | | |
| G/G | 71 | (98,6) | 21 | (84,0) | | referenční genotyp | |
| G/A | 1 | (1,4) | 4 | (16,0) | 0,07 | 0,01–0,69 | 0,023 |
| A/A | 0 | 0 | 0 | 0 | | ND | |
| Alela A | 1 | - | 4 | - | 0,07 | 0,01–0,69 | 0,023 |
| Alela G* | 72 | - | 25 | - | | ND | |

Tab. 20 a): Signifikantní výsledky statistického porovnání vybraných polymorfizmů s klinickými daty pacientek. V Tab. 20 a) jsou signifikantní výsledky srovnání stadia a gradu s genotypy uvedeny jako poměr pravděpodobností (OR) vyjadřující míru rizika (> 1), nebo protektivity (< 1) studovaného genotypu vzhledem k referenčnímu genotypu, spolu s 95% konfidenčním intervalem (95% CI) a příslušnou p-hodnotou. Rizikové skupiny jsou pacientky s vyšším stadiem, gradem a s HGSC typem ovariálního karcinomu. Uvedeny jsou také počty pacientek (N) s jednotlivými genotypy a klinickými charakteristikami. ^aVýsledek zůstal signifikantní po provedení B-H korekce. V případě nesignifikantních výsledků je v tabulce uvedeno NS (non significant), v případě nedeterminovaných výsledků ND (not determined). *U označených genotypů sloužil jako referenční genotyp variantní homozygot.

Tab. 20 b)

| <u>ABCA2 SNP</u> | TTP | | | | Cox regrese | | |
|------------------|-----|--------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------|
| | N | Medián | 95 % CI | p | HR | 95% CI | p |
| rs2271862 | | | | | | | |
| A/A | 19 | 11 | 9,59–12,41 | ref. | | referenční genotyp | |
| A/G | 18 | 13 | 5,72–20,23 | NS | | - | |
| G/G | 8 | 23 | 18,84–27,16 | 0,021 ^b | 0,29 | 0,1–0,89 | 0,029 |
| Alela G | 26 | 17 | 7,00–26,99 | NS | | - | |
| Alela A* | 37 | 12 | 9,87–14,13 | 0,042 | | NS | |
| rs7048567 | | | | | | | |
| G/G | 17 | 11 | 5,62–16,38 | ref. | | referenční genotyp | |
| G/A | 20 | 12 | 7,62–16,38 | NS | | - | |
| A/A | 8 | 23 | 18,84–27,16 | 0,032 | | NS | |
| Alela A | 28 | 15,5 | 9,45–21,55 | NS | | - | |
| Alela G* | 37 | 12 | 9,87–14,13 | 0,042 | | NS | |

Tab. 20 b): Signifikantní výsledky statistického porovnání vybraných polymorfizmů s TTP neboli dobou od operace do progresu, relapsu, nebo úmrtí pacientek. V tabulce jsou výsledky srovnání délky TTP mezi pacientkami s jednotlivými genotypy. Uveden je počet studovaných pacientek s jednotlivými genotypy (N), medián TTP v měsících, 95% konfidenční interval (95% CI) a signifikantní p-hodnoty. Uvedeny jsou také výsledky Cox regrese s tzv. hazard ratio (HR) vyjadřujícím pravděpodobnost, že k progresi dojde u studované skupiny dříve (> 1), nebo později (<1) než u referenční skupiny. Uveden je i 95% konfidenční interval a signifikantní p-hodnoty po multiparametrické analýze adjustované na stadium, typ nádoru, grade a výskyt vzdálených metastáz. Grafy hodnocení TTP jsou uvedeny v Obr. 31 ^bVýsledek multiparametrické analýzy byl významný. V případě nesignifikantních výsledků je v tabulce uvedeno NS (non significant), v případě nedeterminovaných výsledků ND (not determined). *U označených genotypů sloužil jako referenční genotyp variantní homozygot.



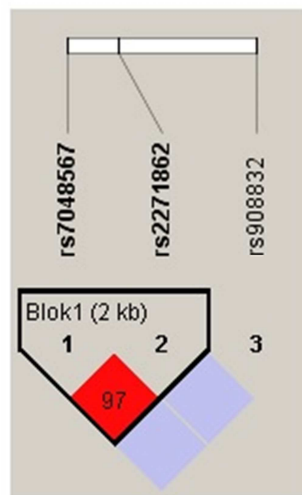
Obr. 31: Signifikantní korelace vybraných polymorfizmů s TTP neboli dobou od operace do progresu, relapsu, nebo úmrtí stanovenou v měsících, určena pomocí Kaplan-Meier testu. Na ose X je znázorněna doba do progresu v měsících, na ose Y kumulativní přežívání v relativních jednotkách (r.u.).

Výsledky statistické analýzy srovnání stadia, histologického typu a gradu s klinickými daty byly podrobeny B-H korekci. Signifikantní výsledky srovnání výskytu určitých alel polymorfizmů s TTP byly podrobeny Cox regresi adjustované na stadium, grade, histologický typ nádoru a výskyt vzdálených metastáz. Výsledky, které nezůstaly signifikantní po

provedení B-H korekce a multiparametrické analýzy, je třeba ověřit na nezávislém souboru pacientek.

5.3.4 Haplotypová analýza studovaných *ABCA2* polymorfizmů

Vzhledem k zřetelné spojitosti mezi výsledky analýz rs2271862 a rs7048567 byla u studovaných polymorfizmů genu *ABCA2* provedena haplotypová analýza v programu HaploView v4.2 (viz Obr. 32). Byla potvrzena domněnka, že 2 ze studovaných polymorfizmů spolu vytváří haplotyp. Síla vazby mezi nimi dle D' skóre je 97 %, což naznačuje silnou vazbu.



Obr. 32: Haplotypová analýza studovaných polymorfizmů genu *ABCA2*. Červená barva označuje polymorfizmy vytvářející haplotyp.

5.3.5 *In silico* predikce funkčního významu polymorfizmů a srovnání genotypů s hladinou exprese

In silico predikce funkčního významu polymorfizmů byla provedena v programu RegulomeDB v1.1. Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tab. 21.

| Číslo SNP | RegulomeDB skóre | Význam |
|---------------------|------------------|--|
| <i>PRCI</i> | | |
| rs12910825 | 1f | Pravděpodobně ovlivňuje vazbu TF a souvisí s expresí daného genu |
| rs8042680 | 1f | Pravděpodobně ovlivňuje vazbu TF a souvisí s expresí daného genu |
| rs2290203 | 1f | Pravděpodobně ovlivňuje vazbu TF a souvisí s expresí daného genu |
| rs8028856 | 5 | Minimální evidence o vazbě TF |
| rs11852999 | 5 | Minimální evidence o vazbě TF |
| rs8031684 | 6 | Minimální evidence o vazbě TF |
| <i>ABCA2</i> | | |
| rs908832 | 5 | Minimální evidence o vazbě TF |
| rs2271862 | 5 | Minimální evidence o vazbě TF |
| rs7048567 | 5 | Minimální evidence o vazbě TF |

Tab. 21: Funkční význam polymorfizmů dle RegulomeDB. Uvedené skóre pohybující se mezi 1–6 představuje pravděpodobnost, že se daný polymorfizmus nachází v regulační oblasti genu a má funkční důsledky, čím je skóre nižší, tím je tato pravděpodobnost větší. TF označuje transkripční faktor(y).

RegulomeDB skóre 3 studovaných polymorfizmů genu *PRCI* (rs12910825, rs8042680 a rs2290203) naznačuje jejich pravděpodobný vliv na genovou expresi a vazbu transkripčních faktorů. Zmíněné varianty jsou tedy *in silico* funkčně významné. U ostatních polymorfizmů nebyl zjištěn funkční význam.

Genotypy vybraných polymorfizmů byly srovnány s hladinou exprese příslušného genu v nádorové tkáni na úrovni transkriptu a proteinu (pouze SNP genu *PRCI*), s cílem identifikovat potenciální významné SNP ovlivňující expresi. Ke srovnání s množstvím proteinu a s hladinou transkriptu byl použit Kruskal-Wallis test.

Nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi studovanými polymorfizmy a hladinou transkriptu *ABCA2* a *PRCI*, ani s množstvím proteinu *PRC1*. Experimentálně tedy pro karcinom ovaria nebyl potvrzen *in silico* funkční význam alternující genovou expresi v cílové tkáni.

6 Diskuze

Ovariální karcinom je velmi závažné onkologické onemocnění, které ačkoliv nepatří mezi nejčastěji se vyskytující gynekologické malignity, svou mortalitou je převyšuje. Se špatnou prognózou souvisí fakt, že většina těchto nádorů je diagnostikována až v pokročilých stádiích z důvodu nespecifických a pozdně nastupujících symptomů. Dalším důležitým faktorem zvyšujícím mortalitu je častý vznik rezistence ke konvenční chemoterapeutické léčbě platinovými deriváty a taxany. Účinnost léčby a prognóza pacientek může být ovlivňována mnoha genetickými faktory alternujícími množství nebo funkce proteinů účastnících se transportu, metabolismu a působení léčiv, ale také signální transdukcce nebo regulace proliferace. Hlavním cílem práce bylo ověřit hypotézu, stanovenou na základě pilotní studie, která předpokládá, že deregulace exprese vybraných genů v nádorové tkáni a výskyt jejich polymorfizmů mají prognostickou a prediktivní hodnotu pro klinický průběh karcinomu ovaria, a mohly by sloužit jako terapeutické markery, případně k definici nových cílů pro vývoj léčiv.

6.1 Studie genové exprese

Pilotní studie genové exprese provedená Mgr. Elsnerovou spolu s navazující validační studií, která byla předmětem diplomové práce, jako první poskytuje komplexní srovnání hladin transkriptů genů potenciálně souvisejících s prognózou a účinností terapie mezi nádorovou a kontrolní ovariální tkání a také s klinickými daty pacientek s ovariálním karcinomem. Deregulovaná exprese může být způsobena výskytem mutací v daném genu a jeho regulačních oblastech, vlivem epigenetických faktorů (methylace regulačních oblastí nebo exprese microRNA) nebo změnou aktivity a množství transkripčních faktorů a dalších *trans*-elementů. Předpokladem studie je, že zvýšená nebo snížená transkripce některých genů bude významně ovlivňovat prognózu onemocnění a účinnost léčby. Tyto geny by mohly tedy sloužit jako prognostické nebo terapeutické markery.

U 9 z celkových 35 studovaných kandidátních genů validační studie byla prokázána korelace hladiny jejich transkriptu s některou klinickou charakteristikou. S gradem korelovaly 2 geny, *ABCA2* a *ESR2*, u obou byla zjištěna negativní korelace genové exprese s hodnotou gradu. 5 genů korelovalo s expresí proliferačního markeru Ki67, *ABCA2* a *ABCA10* negativně, *PLK1*, *PRC1* a *MKI67* pozitivně. U 4 genů, *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCG2* a *SLC16A14*, byla zjištěna souvislost mezi TTP po nasazené léčbě a hladinou jejich exprese,

všechny geny vykazovaly pozitivní korelaci mezi TTP a expresní hladinou. Expresí žádného genu nekorelovala se stadiem onemocnění.

6.1.1 Geny transportních proteinů

Transportní proteiny účastní se exportu nebo importu léčiv do buněk nebo transportu v rámci buněčných kompartmentů přímo ovlivňují akumulaci léčiv v buňce a jejich účinnost. Důležité jsou i fyziologické funkce transportérů při výživě buňky a transportu metabolitů, které mohou ovlivňovat proliferaci a buněčný metabolismus.

Současná studie poprvé u ovariálního karcinomu odhalila negativní korelaci mezi expresí genu *ABCA2* a hodnotou gradu, dále také jeho negativní korelaci s expresí proliferativního markeru Ki67. Korelace s gradem je v souladu s výsledky pilotní studie a studie provedené na karcinomu prsu, souvislost s Ki67 však byla zjištěna poprvé. U karcinomu prsu byla navíc v nádorové tkáni v porovnání s kontrolní tkání odhalena vyšší hladina transkriptu (Hlavac *et al.*, 2013), což v současné ani pilotní studii zjištěno nebylo. Tento fakt je možné přisoudit menšímu počtu kontrolních ovariálních vzorků v této studii a především tomu, že kontrolní vzorky bez známek nádorového bujení pocházely od jiných pacientek než vzorky nádorů. Ve studii karcinomu prsu byly naopak k dispozici párové vzorky. Vysoká exprese majoritní izoformy 1A byla detekována především v mozkové, ale i ovariální tkáni. Protein ABCA2 se nachází na membránách endolyzozomálního systému buňky (Ile *et al.*, 2004) a účastní se transportu sterolů a udržení homeostázy cholesterolu v buňce. Snížená hladina cholesterolu a jeho zvýšená potřeba buňkou pozitivně ovlivňuje expresi ABCA2, který zabraňuje nadměrnému úniku volného cholesterolu z endolyzozomálního systému do jiných buněčných kompartmentů, například do endoplazmatického retikula, kde dochází k jeho esterifikaci. Endolyzozomální systém tak slouží jako zásobárna volného cholesterolu (Kaminski *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2004). Tento jev je pravděpodobně příčinou rezistence k estramustinu a dalším látkám odvozeným od cholesterolu, které ABCA2 nejspíše také transportuje do endolyzozomálních organel a zabraňuje tak jejich cytostatickému působení. Přítomnost steroidních hormonů totiž pozitivně ovlivňuje expresi ABCA2, která je spojena s rezistencí (Laing *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2004). Vyšší exprese ABCA2 při potřebě cholesterolu také koreluje s vyšší expresí genu pro LDL (low density lipoprotein) receptor umožňující endocytózu LDL partikul přenášejících cholesterol a také HMG CoA syntetázy syntetizující cholesterol z acetyl-CoA (přítomnost steroidních hormonů však tyto 2 geny inhibuje) (Davis *et al.*, 2004). Tkáně s velkým množstvím ABCA2 jsou právě ty, které mají nejvyšší potřebu cholesterolu a jeho

správné homeostázy pro své funkce. Oligodendrocyty v mozku potřebují cholesterol pro produkci myelinu (Mack *et al.*, 2007), v ovariích pak jde o syntézu steroidních hormonů z cholesterolového prekursoru. Význam tohoto transportéru v nádorové progresi spočívá ve fyziologické regulaci množství využitelného cholesterolu v buňce, která je nezbytná pro správný buněčný metabolismus a proliferaci. Snížená exprese ABCA2 vede k vyššímu úniku volného cholesterolu z endolyzozomálního systému. Zvýšená hladina cholesterolu stimuluje buněčnou proliferaci, u buněčných linií karcinomu prsu také migraci a ztrátu adheze (Singh *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2014), což může vysvětlovat vyšší hladinu proliferačního markeru Ki67 a eventuálně i vyšší grade.

Ve validační i pilotní studii byla zjištěna korelace mezi vyšší expresí genu *ABCA9* a delší TTP pacientek, což je v rozporu s výsledky publikovanými ve studii Hedditch *et al.* (2014), kde vyšší exprese *ABCA9* korelovala s kratší TTP pacientek. V současné i pilotní studii byla zaznamenána signifikantně snížená exprese *ABCA9* ve srovnání s kontrolní tkání, stejný výsledek byl pozorován i u jiných nádorů, například u karcinomu kolorekta nebo prsu (Hlavata *et al.*, 2012; Hlavac *et al.*, 2013). Přesná funkce proteinu ABCA9 zatím není plně objasněna, stejně jako jeho subcelulární lokalizace. ABCA9 hraje roli při diferenciaci monocytů na makrofágy a také při udržení homeostázy cholesterolu a lipidů v buňce (Piehler *et al.*, 2002). Doposud nebyla identifikována žádná léčiva přenášená tímto transportérem. Výsledky současné studie naznačují společnou regulaci exprese ABCA9 a ABCA2 v nádorech ovaria. Z funkčního hlediska by, podobně jako u ABCA2, snížená exprese ABCA9 mohla znamenat deregulaci homeostázy cholesterolu.

Expresí genu *ABCA10* negativně korelovala s expresí proliferačního markeru Ki67, v pilotní studii byla zaznamenána negativní korelace při rozdělení exprese Ki67 podle hladiny 15 % („cut off“) na 2 skupiny pacientek dle studie Alco *et al.* (2015). Jiné studie se korelací exprese Ki67 a *ABCA10* u ovariálního karcinomu nezabývaly. Ve validační studii byl prvně zjištěn silný vztah mezi zvýšenou expresí *ABCA10* a delší TTP pacientek s ovariálním karcinomem, podobně jako v případě *ABCA9*, kde však korelace nebyla tak silná. Hladina exprese genu byla významně snížená v nádorové tkáni, což je v souladu s výsledky pilotní studie a se studiemi zabývajících se karcinomem kolorekta a prsu (Hlavata *et al.*, 2012; Hlavac *et al.*, 2013). Tento transportér nepatří mezi intenzivně studované ABC transportéry, jeho funkce ani subcelulární lokalizace není doposud známa, účastní se však, podobně jako další členové rodiny ABCA, udržování homeostázy cholesterolu a lipidů (Wenzel *et al.*, 2003). V současné době nejsou identifikována žádná léčiva přenášená tímto transportérem. Jeho korelace s TTP a proliferací může být vysvětlována stejně jako v případě *ABCA9*.

Výsledky naznačující vztahy mezi geny transportérů lipidů a steroidů a prognózou pacientek s ovariaálním karcinomem nalezené touto studií jsou v literatuře unikátní. Z tohoto důvodu je nutné se dále věnovat vysvětlení výsledků z funkčního hlediska. Je velmi pravděpodobné, že spíše než o přímou interakci s působením cytostatik, se bude jednat o interakci signálních drah estrogenních receptorů a syntézy cholesterolu s proliferací. Z tohoto hlediska se zdá zajímavé, že některé metabolity cholesterolu (oxysteroly) mají funkci jako endogenní selektivní modulátory estrogenního receptoru (SERM) a o jejich využití se uvažuje u karcinomu prsu (Segala *et al.*, 2013).

Validační studie prvně odhalila vztah mezi zvýšenou expresí genu *ABCG2* a delší TTP, což je v rozporu s obecně přijímaným faktem, že *ABCG2* je gen mnohočetné lékové rezistence, především u karcinomu prsu. Jeho zvýšená exprese v mnoha *in vitro* a *in vivo* modelech karcinomu prsu koreluje s mnohočetnou lékovou rezistencí, kratším přežíváním, vyšším stadiem onemocnění a výskytem metastáz (Doyle *et al.*, 1998; Robey *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2011). U různých buněčných linií ovariaálního karcinomu zvýšená exprese *ABCG2* korelovala s rezistencí k mnoha léčivům, které tento transportér exportuje ven z buňky. Snížení exprese *ABCG2* vede ke zvýšení senzitivity k léčivům zahrnujících i platinové deriváty (Jia *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2014b). Bylo zjištěno, že rekurentní ovariaální nádory mají vyšší expresi proteinu *ABCG2* po terapii karboplatinou a paklitaxelem, než před zahájením terapie, což podporuje roli *ABCG2* jako chemorezistentního proteinu (Ween *et al.*, 2015). V nádorové tkáni byla detekována nižší hladina exprese než v kontrolní ovariaální tkáni během validační i pilotní studie, což bylo v souladu s výsledky studie zabývající se kolorektálním karcinomem (Hlavata *et al.*, 2012), ale v rozporu s výsledky studie zabývající se karcinomem pankreatu (Mohelnikova-Duchonova *et al.*, 2013). Protein *ABCG2* je lokalizován v plazmatické membráně (Aust *et al.*, 2004) a kromě léčiv a jiných xenobiotik se pravděpodobně účastní také exportu lipidů a sterolů, podobně jako další proteiny rodiny *ABCG* (Morisaki *et al.*, 2005; Gelissen *et al.*, 2006). Výsledek současné studie by tedy mohl být interpretován podobně jako v případě předchozích transportérů z rodiny *ABCA*. Exprese *ABCG2* se zvyšuje při zvýšené hladině estrogenu, který pomocí svého receptoru přímo stimuluje expresi *ABCG2*. Jeho množství může tedy být i hormonálně závislé a může se lišit mezi pacienty s hormonálně závislými a nezávislými nádory (Ee *et al.*, 2004). Exprese *ABCG2* je aktivována také při zvýšené hladině cholesterolu v krvi, je tedy ovlivňována i stravou jedince (Rodrigues *et al.*, 2009). Snížené množství cholesterolu v plazmatické membráně vede ke snížení aktivity transportéru (Storch *et al.*, 2007). *ABCG2* by na prognózu mohl mít duální vliv vyplývající z jeho funkce transportovat léčiva i lipidy,

zapotřebí jsou ale další studie věnující se hladině tohoto transportéru u pacientek s ovariálním karcinomem.

Signifikantní korelace s TTP byla prvně identifikována také u transportéru SLC16A14. Jednalo se opět o pozitivní korelaci mezi hladinou exprese genu *SLC16A14* a délkou doby do progrese, relapsu, nebo úmrtí pacientek. Tento transportér doposud nebyl ve vztahu k nádorům příliš studován. Ve studii zabývající se membránovými transportéry byla zjištěna významně snížená exprese *SLC16A14* u buněčných linií ovariálního karcinomu rezistentních k různým léčivům, včetně platinového derivátu, oproti senzitivní linii (Januchowski *et al.*, 2014). V současné i pilotní studii byla odhalena signifikantně snížená hladina *SLC16A14* u nádorové tkáně oproti kontrolní ovariální tkáni. Pilotní studie zjistila také negativní korelaci mezi expresí *SLC16A14* a Ki67, která však ve validační studii nebyla potvrzena. Proteiny rodiny SLC se účastní importu i exportu nejrůznějších substrátů včetně léčiv (viz kapitola 2.2.1.2 SLC transportéry a chemorezistence). Transportéry SLC16 transportují především metabolity jako pyruvát, laktát, acetát nebo aminokyseliny. Funkce SLC16A14 však zatím nebyla prostudována (Halestrap, 2013). Dosavadní výsledky naznačují možnou roli tohoto transportéru jako importéru léčiv do buněk.

Role nejstudovanějších transportérů ABCB1, ABCC3 a SLC22A5 v souvislosti s rezistencí a prognózou nádorů zahrnutých do validační studie nebyla v diplomové práci potvrzena. Mimo již zmíněné geny transportních proteinů, jejichž exprese korelovala s klinickými charakteristikami, byla u mnoha dalších nalezena rozdílná hladina transkriptu u nádorové a kontrolní tkáně. Transportéry ABCA8, ABCB1 a ABCC9 měly signifikantně sníženou hladinu transkriptu v nádorové tkáni, což souhlasí s výsledky pilotní studie a dalšími studiemi provedenými na Oddělení toxikogenomiky SZÚ u karcinomu prsu (Hlavac *et al.*, 2013), kolorekta (Hlavata *et al.*, 2012) a ovarií v případě ABCB1 (ostatní transportéry nebyly v dané studii zahrnuty) (Ehrlichova *et al.*, 2013). Transportéry ABCA12 a ABCC3 měly významně zvýšenou genovou expresi v nádorové tkáni, což je v souladu s výsledky pilotní studie a studie zabývající se karcinomem prsu (Hlavac *et al.*, 2013), v případě ABCC3 také jiné práce zabývající se ovariálním karcinomem (Auner *et al.*, 2010). Odlišné exprese transportérů patřících do stejných rodin naznačují jejich rozdílný význam pro nádorové buňky. Dále byla zaznamenána snížená exprese genů *SLC22A5* a *ATP7A* v nádorech. Nižší hladina *SLC22A5* byla zjištěna u různých nádorových buněčných linií (Scalise *et al.*, 2012), rozdíly mezi tumory a kontrolní tkání v expresi *ATP7A* doposud v jiných studiích porovnány nebyly.

6.1.2 Geny regulačních proteinů buněčného cyklu

Deregulace proteinů účastnících se regulace buněčného cyklu vede k jeho narušení a může ovlivnit proliferační aktivitu buňky. Tyto proteiny hrají důležitou roli při vzniku tumoru, ale jsou také možným terapeutickým cílem při nádorové léčbě.

Během validační i pilotní studie byla zjištěna pozitivní korelace mezi expresí genů *PRC1*, *PLK1* a *MKI67* a expresí proliferačního markeru Ki67. Hladina jejich transkriptů byla v nádorové oproti kontrolní tkáni výrazně zvýšená. Všechny 3 produkty zmíněných genů hrají roli v proliferaci. Výsledek současné práce souhlasí s výsledky předchozí studie na Oddělení toxikogenomiky SZÚ, která sledovala expresi *PRC1* u ovariálního karcinomu (Ehrlichova *et al.*, 2013). Protein *PRC1* se účastní vytvoření středové oblasti dělicího vřeténka a je nezbytný pro cytokinezi, což vysvětluje korelaci s Ki67 a také zvýšenou expresi v tumorech (Jiang *et al.*, 1998). Srovnatelný výsledek týkající se *PLK1* byl získán i v jiné studii ovariálního karcinomu, v tomto případě na úrovni proteinu (Weichert *et al.*, 2004). *PLK1* je protoonkogenní protein stimulující vstup buňky do mitózy a cytokinezi, což objasňuje výsledky diplomové práce (Burkard *et al.*, 2007). Exprese genu *MKI67* koreluje s expresí svého produktu, proteinu Ki67, kterou sledují patologové u některých nádorů, především nádorů prsu (Bustreo *et al.*, 2016). Jiné studie odhalily pozitivní korelaci mezi expresí proteinu Ki67 a hodnotou gradu, stadia, pravděpodobností relapsu a progresu a negativní korelaci s délkou přežívání, což na úrovni transkriptu v diplomové práci nebylo potvrzeno (Garzetti *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2012).

Diplomová práce nezjistila korelaci mezi expresí *TP53* a klinickými charakteristikami pacientek ani rozdílnou hladinu mezi tumory a kontrolními tkáněmi. Studie tohoto významného regulačního proteinu se spíše zabývají jeho mutační analýzou, jelikož bodové mutace *TP53* vedou k jeho defektu a vytváření nefunkčních tetramerů. Předchozí studie zabývající se ovariálním karcinomem však odhalila vztah mezi vyšší expresí proteinu p53 a kratším přežíváním, vyšším gradem a rezistencí k platinovým derivátům (Vanderzee *et al.*, 1995; Nakayama *et al.*, 2003). Z tohoto důvodu se hladinou transkriptu *TP53* zabývala i tato studie. Mutace *TP53* často vedou právě ke zvýšené expresi (Havrilesky *et al.*, 2003), pro lepší porozumění výsledků je v budoucnu zapotřebí provést mutační analýzu na souboru studovaných pacientek.

6.1.3 Geny proteinů signálních drah

Mnoho genů kódujících proteiny signální transdukce se řadí mezi protoonkogeny. Pokud dojde k jejich narušení nebo deregulaci, může dojít k nekontrolované proliferaci aktivité buňky a vzniku nádoru. Tyto proteiny mohou sloužit i jako cíl nádorové terapie.

Během validační studie byla odhalena negativní korelace mezi hladinou exprese *ESR2* a hodnotou gradu nádorů. V pilotním i validačním souboru pacientek byla detekována snížená exprese v nádorech oproti kontrolní tkáni. Tyto výsledky jsou v souladu s dalšími studiemi na různých buněčných liniích ovariálního karcinomu, které zjistily poměrně vysokou expresi *ESR2* v kontrolní tkáni, která je však v nádorech snížena a klesá postupně během jeho progresu. Bylo dokázáno, že ER β kódovaný tímto genem snižuje expresi cyklinu D, který je nezbytný pro vstup buňky do procesu jejího dělení. ER β má protektivní charakter a jeho snížená hladina je pravděpodobně důležitým faktorem při vzniku a progresi nádoru, což by vysvětlovalo negativní korelaci s hodnotou gradu (Bardin *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2005).

V diplomové práci byla v nádorové tkáni zjištěna snížená exprese dalších genů kódujících proteiny signálních drah, *EGFR*, *NROB2* a *NR1H4*. Je známo, že exprese receptoru EGFR pozitivně koreluje s hodnotou gradu a expresí Ki67, negativně pak s délkou přežívání. Zvýšená hladina však byla detekována pouze u 17 % pacientek s ovariálním karcinomem (Lassus *et al.*, 2006). Nižší exprese *EGFR* v tumorech byla ve validační a pilotní studii zjištěna prvně. Nízká hladina *NROB2* v tumorech byla zjištěna i u jiných nádorů, například u karcinomu jater, kde snížená exprese souvisela s vyšší proliferací aktivitou a horší prognózou (Park *et al.*, 2010). *NROB2* vyvazuje a inhibuje jaderné transkripční aktivátory spouštějící proliferaci, jeho snížená exprese je tak pro nádory výhodná (Seol *et al.*, 1996). Nižší hladina *NR1H4* u nádorů oproti kontrolním tkáním byla zjištěna ve validační i pilotní studii. Tento výsledek koreluje se zjištěnou nižší hladinou *ABCG2* v tumorech obou studovaných souborů pacientek, jelikož FXR je transkripčním faktorem tohoto i jiných ABC transportérů (Zollner *et al.*, 2003; Herraes *et al.*, 2012).

6.1.4 Geny proteinů buněčného metabolismu a reparačních proteinů

Geny detoxikačních proteinů mohou přímo modulovat míru reakce buňky na použítá léčiva, jelikož se účastní jejich detoxikace. Geny proteinů MMR systému jsou kromě opravy důležité pro signalizaci vedoucí k apoptóze v případě neopravitelného poškození DNA (viz kapitola 2.2.2.1 MMR systém).

V předkládané práci nebyl nalezen významný vztah mezi expresí studovaných genů buněčného metabolismu a MMR systému a klinickými charakteristikami pacientek. U některých genů však byl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi mezi nádorovou a kontrolní tkání. V nádorové tkáni byla detekována nižší exprese genů MMR systému *MLH1* a *MLH3* a vyšší exprese *MSH2*. V případě *MLH1* a *MLH3* se jednalo o výsledek, který potvrdil pilotní studii. Exprese *MSH2* se však v pilotní studii mezi nádory a kontrolami nelišila. Proteiny MMR systému se účastní signalizace vedoucí k apoptóze a v jiných studiích byl zjištěn vztah mezi nízkou expresí nebo defektem *MLH1* či *MSH2* a rezistencí k platinovým derivátům (Fink *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 2009). Nízká exprese genů MMR systému je tak pro nádorovou buňku výhodná. Tato práce naznačuje, že jsou zapotřebí další studie zabývající se expresí *MSH2* a dalších MMR genů u ovariálního karcinomu.

Významně snižená byla v tumorech hladina *SOD1* a *SOD3*, v případě *SOD1* se jedná o stejný výsledek jako v pilotní studii. U kolorektálního karcinomu byla také zjištěna snížená hladina *SOD* genů v tumorech, která se však zvyšovala se stadiem onemocnění (Skrzycki *et al.*, 2010). Aktivita těchto genů koreluje s horší prognózou nádorových onemocnění (Wang *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015) a v pilotní studii míra exprese korelovala s agresivnějším HGSC typem nádoru. V kontrolní tkáni *SOD* buňku chrání a zabraňuje jejímu poškození a vzniku nádoru, během karcinogeneze pravděpodobně dochází ke snížení exprese proteinů detoxikačního systému. Při progresi a léčbě tumoru jsou buňky vystavené vyššímu oxidačnímu stresu, což při zvýšené expresi *SOD* následně zvyšuje odolnost nádorových buněk (shrnuto v Hu *et al.*, 2005).

U některých studovaných genů, *ABCA3*, *ABCC6*, *ABCD3*, *ABCG1*, *ATP7B*, *GLRX*, *SOD2* a *ERBB2*, nebyla zjištěna žádná korelace s klinickými daty nebo změna exprese v nádorové tkáni. To však neznamená, že pro vznik či progresi onemocnění a pro účinnost terapie nejsou důležité. Roli mohou hrát mutace alterující aktivitu, konformaci nebo lokalizaci proteinu, které nemají vliv na míru transkripce a přesto také mohou nádorový růst ovlivňovat. Genetické analýzy jsou proto nedílnou součástí studií nádorových genetických faktorů a několik jich na Oddělení toxikogenomiky SZÚ probíhá.

Validační studie slouží právě pro potvrzení nebo vyvrácení výsledků pilotní studie a k zacílení dalších studií. Největší validitu mají tedy výsledky potvrzené z předchozí studie na nezávislém souboru pacientek. Nové významné výsledky by měly být dále validovány, aby bylo možné je využít jako prognostické a terapeutické markery. Během studie genové exprese na úrovni transkriptu bylo identifikováno několik potenciálních biomarkerů ovariálního karcinomu, které je zapotřebí detekovat v nádorové tkáni i na hladině proteinu.

6.2 Sledování hladin proteinu v cílové tkáni

Po studii genové exprese následovalo stanovení hladin vybraných proteinů pomocí imunoblotování v nádorové a kontrolní tkáni, jelikož právě proteiny jsou funkčními jednotkami genů. Cílem bylo porovnání změřených hladin mezi tumory a kontrolami, určení korelace mezi množstvím transkriptu a proteinu a případné korelace s klinickými daty pacientek. Dle výsledků studie genové exprese a dalších studií probíhajících na Oddělení toxikogenomiky SZÚ byly pro navazující studii vybrány proteiny PRC1 a ABCA2.

Předkládaná práce se poprvé zabývá analýzou hladiny proteinu PRC1 u ovariálního karcinomu pomocí imunoblotování, jejím srovnáním s kontrolními vzorky a klinickými daty pacientek. Během studie bylo zjištěno, že hladina proteinu PRC1 v nádorové ani kontrolní tkáni nekoreluje s hladinou transkriptu jeho genu. Regulace exprese je velmi komplexní děj probíhající na mnoha úrovních, post-transkripční regulace tak může způsobit stav, kdy hladina transkriptu nekoreluje s množstvím proteinu. Roli může hrát stabilita transkriptu, přítomnost mutace způsobující předčasný stop-kodón, míra translace mRNA, stabilita proteinu a mnoho dalších faktorů (shrnutí v Vogel a Marcotte, 2012). Při srovnání hladiny proteinu mezi nádorovou a kontrolní tkání byl pozorován trend vyššího množství PRC1 v nádorové tkáni, stejně jako v případě transkriptu, výsledek korelace však v tomto případě nebyl signifikantní. Nebyl zjištěn žádný významný vztah mezi hladinou PRC1 proteinu a klinickými daty. Tento výsledek může znamenat, že nalezený vztah mezi genovou expresí *PRC1* a klinickým charakterem ovariálního karcinomu není funkční, tedy hladina transkriptu *PRC1* je jen jakýmsi markerem, který je spojený s jinou potenciálně funkční složkou (expresí nebo epigenetickým faktorem). V tom případě by byl *PRC1* použitelný pouze jako prognostický marker, nikoliv jako cíl pro novou protinádorovou terapii.

Současná práce se také poprvé zabývala detekcí proteinu ABCA2 v nádorové ovariální tkáni pomocí imunoblotování. Podařilo se detekovat majoritní izoformu 1A v kontrolním vzorku buněčné linie prsního karcinomu MCF-7. V ovariálních tumorech byla tato izoforma detekována pouze sporadicky, ze získaných výsledků tedy nebylo možné provádět další statistické analýzy. Kromě formy 1A byla v tumorech silně exprimována minoritní izoforma ABCA2, která neobsahuje funkční domény ABC transportérů a má předčasný stop-kodón, díky němuž je degradována (ENSEMBL, URL9). Imunoblotování není nejvhodnější formou určení hladiny proteinu ABCA2 v nádorové ovariální tkáni, avšak je poměrně jednoduchou metodou prokazující výskyt konkrétních izoform tohoto transportéru. ABCA2 má více variant, ne všechny jsou funkční, ale některé jsou detekovány stejnou protilátkou cílenou proti

C konci proteinu. Imunohistochemické barvení nebo ELISA v tomto případě neposkytnou validní výsledek, jelikož budou detekovat i nefunkční izoformy. Je proto zapotřebí dále zdokonalovat postup detekce ABCA2 v ovariální nádorové tkáni pomocí imunoblotování či jiných metod, nebo vyvinout protilátky specifické ke konkrétním variantám ABCA2.

Během stanovení hladiny proteinu imunoblotováním je nezbytné brát v potaz fakt, že se jedná o semikvantitativní a spíše kvalitativní analýzu. Výsledky mohou být zatíženy chybami v přesnosti, což může značně ovlivnit výsledky následné statistické analýzy, např. korelace s transkriptem. V současnosti se však jedná o nejrychlejší a nejjednodušší metodu sledování přítomnosti požadovaného proteinu ve studovaném materiálu.

6.3 Studie genetické variability kandidátních genů

Po získání výsledků studie genové exprese kandidátních genů byla provedena genotypizační studie. Je známo, že SNP mohou ovlivňovat expresi genu nebo funkci jeho produktu, a mohou tak souviset se vznikem nebo průběhem nejrozličnějších onemocnění. Předpokladem studie je, že výskyt určité dědičné alely vybraných genů souvisí s prognózou pacientek nebo s účinností terapie ovariálního karcinomu a její detekce v DNA z periferní krve tak může pomoci predikovat postup onemocnění bez nutnosti molekulární analýzy nádoru. Odběr krve a nakládání s materiálem je podstatně jednodušší, než práce s odebraným tkáňovým vzorkem. Diplomová práce poprvé poskytuje genotypizační analýzu vybraných polymorfizmů genů *PRC1* a *ABCA2* ve vztahu k ovariálnímu karcinomu.

Pacientky byly testovány na 6 intronových SNP v genu *PRC1*, z nichž rs2290203, rs8028856 a rs8031684 souvisely s některou klinickou charakteristikou. V současné studii byla majoritní alela G polymorfizmu rs2290203 nalezena významně častěji u pacientek s pokročilým onemocněním stadia III nebo IV ve srovnání s pacientkami v lokálně pokročilém stadiu I nebo II. Podobný vztah byl zaznamenán i u nosiček alely A SNP rs8028856. Tyto výsledky jsou však zatíženy velmi malými počty pacientek ve srovnávaných skupinách, zejména nosiček referenčních genotypů, a opatrná interpretace je tedy na místě. Podobný výsledek byl zjištěn také u jiné studie zabývající se mimo jiné významem SNP rs2290203 u karcinomu prsu (Cai *et al.*, 2014). Dle *in silico* predikce funkčního významu v programu RegulomeDB rs2290203 ovlivňuje vazbu transkripčních faktorů a expresi genu, což na úrovni transkriptu ani proteinu *PRC1* v diplomové práci nebylo potvrzeno, stejně jako ve studii na karcinomu prsu (Cai *et al.*, 2014). V rámci této studie byl však zjištěn vztah mezi přítomností rizikové alely G a nižší expresí genu *RCCD1* (RCC1 domain containing 1), který

leží 5 712 bp proti směru transkripce od rs2290203. Nižší exprese byla zaznamenána u nádorové i zdravé prsní tkáně (Cai *et al.*, 2014). Studovaný polymorfismus se tedy pravděpodobně skutečně nachází v oblasti vazby transkripčních faktorů, kterou ovlivňuje, nejedná se však o faktory genu *PRC1*, ale *RCCD1*. Funkce genu *RCCD1* není doposud známa, uvedené výsledky však naznačují jeho protinádorové působení. *In silico* predikce potenciálního významu rs8028856 nenaznačila funkční význam a vztah ke genové ani proteinové expresi *PRC1* rovněž nebyl nalezen. Z tohoto důvodu nelze zatím další studium tohoto SNP doporučit.

Přítomnost majoritní alely T polymorfismu rs8031684 korelovala s HGSC typem nádoru, který se vyznačuje nízkou diferenciací, vysokou nukleární atypičností, zvýšenou frekvencí mitóz a horší prognózou (Malpica *et al.*, 2004). Polymorfismus rs8031684 je tedy vhodným kandidátem pro prognostický marker. Dle *in silico* predikce funkčního významu pravděpodobně nedochází k vazbě transkripčních faktorů do oblasti rs8031684, tento SNP by tak neměl ovlivnit expresi genu, což bylo v diplomové práci potvrzeno na úrovni transkriptu i proteinu *PRC1*. Výše uvedené polymorfismy rs8028856 a rs8031684 mají vztah ke karcinomu prsu (Brynychova *et al.*, 2016).

Úloha výše uvedených intronových polymorfismů může spočívat v regulaci okolních genů, nebo jejich výskyt může ovlivňovat sestřih transkriptu. Je známo, že intronové varianty mohou ovlivnit proces sestřihu a vznik pozměněného proteinu, který může mít alternativní funkci a může přispívat ke vzniku patologických stavů (shrnutí v Ward a Cooper, 2010). Další možností je vazba na jinou (dosud neznámou) oblast na chromozomu, která má funkční vztah k expresi jiného onkogenu či tumor supresoru.

U dalších 3 testovaných SNP genu *PRC1*, rs12910825, rs8042680 a rs11852999, nebyla zjištěna žádná korelace s klinickými daty. Dle *in silico* predikce funkce rs12910825 a rs8042680 pravděpodobně leží v oblasti vazby transkripčních faktorů, hladinu transkriptu a proteinu *PRC1* však dle výsledků této práce neovlivňují. Je možné, že ovlivňují expresi jiných genů, avšak v progresi a účinnosti terapie ovariálního karcinomu pravděpodobně nehrají roli.

V rámci genu *ABCA2* byly pacientky testovány na 3 exonové synonymní SNP, rs908832, rs2271862 a rs7048567, z nichž všechny korelovaly s některou klinickou charakteristikou. Významně vyšší procento nosiček majoritní alely G polymorfismu rs908832 bylo nalezeno mezi pacientkami s vyšším gradem nádoru. Tento SNP byl dosud studován především ve spojitosti s Alzheimerovou chorobou, kde výskyt minoritní alely A silně koreluje s vyšší pravděpodobností vzniku tohoto neurodegenerativního onemocnění.

U pacientů s raným propuknutím Alzheimerovy nemoci je frekvence alely A až 3x vyšší, než je frekvence v populaci (Mace *et al.*, 2005). Ve vztahu k ovariálnímu karcinomu má však narozdíl od Alzheimerovy choroby alela A protektivní charakter. Jak již bylo zmíněno, protein ABCA2 se účastní transportu lipidů a sterolů, ovlivňuje tedy produkci myelinu a také β -amyloidových plaků, které poškozují nervové buňky a jsou příčinou vzniku Alzheimerovy choroby. Zvýšená exprese ABCA2 přitom souvisí s vyšší produkcí těchto plaků a vyšším rizikem vzniku nemoci (Mack *et al.*, 2007; Michaki *et al.*, 2012). Během diplomové práce však nebyl nalezen vztah mezi rs908832 a expresí genu *ABCA2* ve studovaných tkáních, ani dle *in silico* funkční analýzy oblast s tímto SNP pravděpodobně nemá funkční význam. Tento synonymní polymorfismus tedy nemění expresi na úrovni transkripce, může ji však regulovat na dalších úrovních, například translace pomocí tzv. kodon bias (Ikemura, 1985), a ovlivňovat hladinu proteinu. U Alzheimerovy choroby vyšší hladina ABCA2 koreluje s vyšším rizikem, u ovariálního karcinomu bylo v diplomové práci zjištěno, že jeho zvýšená hladina (na úrovni transkriptu) koreluje s nižším gradem a tedy lepší prognózou. Je možné, že majoritní alela G riziková ve vztahu ke gradu u ovariálního karcinomu vede ke snížení hladiny proteinu, minoritní alela A ke zvýšení. To by vysvětlovalo odlišný vliv alel u Alzheimerovy choroby a ovariálního karcinomu. Pro další porozumění vztahů mezi genetickou variabilitou a funkcí ABCA2 u obou studovaných onemocnění je zapotřebí zdokonalit detekci proteinu ABCA2 a zjistit tak, zda alely skutečně ovlivňují jeho hladinu.

Majoritní alely polymorfizmů rs2271862 a rs7048567, A a G, které spolu vytváří haplotyp, byly ve zvýšené frekvenci detekovány mezi pacientkami s kratší TTP. Doposud nebyl identifikován žádný vztah těchto SNP k dalším onemocněním. Dle *in silico* funkční analýzy se tyto SNP pravděpodobně nenachází v oblasti vazby transkripčních faktorů a ani diplomová práce nepotvrdila vztah k expresi genu *ABCA2*. Vzhledem k výsledkům studie genové exprese, kde množství transkriptu negativně koreluje s proliferačním markerem Ki67 a s hodnotou gradu, by majoritní alely teoreticky mohly hladinu ABCA2 snižovat, zapotřebí jsou však další analýzy zabývající se expresí ABCA2 na úrovni proteinu.

Identifikace těchto významných polymorfizmů v genech *PRCI* a *ABCA2* detekovatelných v DNA periferní krve ve vztahu k ovariálnímu karcinomu je velkým posunem k přesnějšímu určení prognózy pro jednotlivé pacientky, která může vést k efektivnější léčbě tohoto závažného onemocnění. Genotypizační studie potvrdila významnost genů *PRCI* a *ABCA2* ve vztahu k ovariálnímu karcinomu. Předpokládaná úloha vybraných polymorfizmů u tohoto onemocnění byla tak potvrzena a je třeba ji dále studovat na rozsáhlejších nezávislých souborech pacientek.

7 Souhrn

Náplní diplomové práce byla studie genetických faktorů ve vztahu k prognóze a účinnosti terapie ovariálního karcinomu, závažného onemocnění s komplikovanou diagnostikou a doposud neidentifikovanými vhodnými prognostickými a terapeutickými markery. Práce poskytuje také srovnání výsledků s dalšími studiemi.

V rámci předkládané práce byla provedena studie genové exprese kandidátních genů na úrovni transkripce, která byla srovnána s klinickými daty pacientek s ovariálním karcinomem a také byly prostudovány rozdíly mezi nádorovou a kontrolní ovariální tkání. Podařilo se identifikovat několik potenciálně prognosticky a terapeuticky významných genů. Velmi důležité pro účinnost terapie a prognózu pacientek se zdají být geny transportních proteinů, které regulují akumulaci léčiv a steroidních molekul v buňce. Jako významné byly identifikovány geny transportních proteinů *ABCA2*, *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCG2* a *SLC16A14*. Zvýšená hladina transkriptu těchto genů negativně korelovala s hodnotou gradu, expresí proliferačního markeru Ki67 a s délkou doby od operace do progresu, relapsu, nebo úmrtí pacientek. Jejich snížená exprese tedy obecně znamená horší prognózu. Predikovaná role uvedených ABC proteinů v progresi ovariálního karcinomu spočívá pravděpodobně v deregulaci homeostázy cholesterolu, v případě *SLC16A14* by se mohlo jednat o snížený import léčiv do buněk.

Roli v progresi nádoru hrají také geny regulátorů průběhu buněčného cyklu a signální transdukce, jejichž deregulace může vést k nadměrné proliferaci. Během studie byly identifikovány 3 geny regulace buněčného cyklu, *PRC1*, *PLK1* a *MKI67*, jejichž hladina transkriptu pozitivně korelovala s expresí proliferačního markeru Ki67 a tedy s horší prognózou. Produkty těchto genů se účastní regulace a správného průběhu buněčného cyklu a mohou být považovány za proliferační markery. Hladina transkriptu *ESR2* kódujícího estrogenní receptor β negativně korelovala s hodnotou gradu, což je dáno antiproliferačním působením tohoto proteinu.

Diplomová práce jako první představuje výsledky stanovení hladiny proteinů *PRC1* a *ABCA2* pomocí imunoblotování v nádorové ovariální tkáni a studie genetické variability jejich genů, které byly vybrány dle výsledků analýz genové exprese. Hladina proteinů byla srovnána s množstvím transkriptu, dále byl hodnocen rozdíl mezi nádorovou a kontrolní ovariální tkání a vztahy s klinickými daty pacientek, jelikož právě proteiny jsou funkčními produkty genů. Podařilo se detekovat a analyzovat hladinu *PRC1*, která nekorelovala s množstvím transkriptu ani s klinickými daty. Byl pozorován trend vyšší hladiny *PRC1*

v nádorech, stejně jako v případě transkriptu, tento výsledek však nebyl signifikantní. Roli v regulaci exprese *PRCI* v tomto případě pravděpodobně hrají post-transkripční mechanismy. V případě proteinu *ABCA2* byla kanonická izoforma proteinu v nádorové tkáni detekována pouze sporadicky, a výsledky imunodetekce nebylo možné použít pro další analýzy. Metodika imunoblotování *ABCA2* podle předkládané práce vyžaduje další zdokonalení.

Během studie genetické variability byly v DNA z periferní krve pacientek detekovány vybrané dědičné jednonukleotidové polymorfizmy genů *PRCI* a *ABCA2*, u kterých byla zjišťována korelace s klinickými daty pacientek, s hladinou transkriptu a v případě *PRCI* i proteinu. Odběr krve a manipulace s tímto biologickým materiálem je podstatně jednodušší, než práce s tkáňovými vzorky, proto je důležité nacházet biomarkery detekovatelné z krve. Významně vyšší procento nosiček majoritní alely G polymorfizmu rs2290203 a majoritní alely A polymorfizmu rs8028856 genu *PRCI* bylo nalezeno mezi pacientkami s pokročilým stadiem onemocnění. Byla nalezena prevalence majoritní alely T polymorfizmu rs8031684 téhož genu u pacientek s nejběžnějším a agresivním „high-grade“ serózním karcinomem oproti pacientkám s ostatními typy ovariálních karcinomů. Byl nalezen vztah majoritní alely G polymorfizmu rs908832 genu *ABCA2* k vyššímu gradu nádoru. Signifikantně vyšší procento nosiček majoritních alel A a G polymorfizmů rs2271862 a rs7048567 téhož genu bylo nalezeno u pacientek s kratší dobou od operace do progresu, relapsu, nebo úmrtí.

Předkládaná práce splnila vytyčené cíle a potvrdila hlavní hypotézu studie. Získané poznatky mohou vést k praktickému využití nových biomarkerů prognózy a účinnosti terapie ovariálního karcinomu, buď na úrovni měření hladiny transkriptu genů v nádorové tkáni, nebo detekce dědičných polymorfizmů v DNA z periferní krve. Jelikož doposud nebyly identifikovány vhodné biomarkery predikující vývoj tohoto onemocnění, jsou výstupy studie velkým přínosem. Výsledky diplomové práce mohou posunout medicínský přístup k ovariálnímu karcinomu o další krok směrem k personalizované léčbě, která je do budoucna vzhledem k častému vzniku rezistence ke konvenční léčbě nutností. Předkládaná práce mimo jiné přispěla k rozšíření charakteristiky ovariálního karcinomu na molekulární úrovni. Uvedené poznatky mohou sloužit k lepšímu porozumění vzniku a vývoje onemocnění, případně k definici nových cílů pro vývoj léčiv.

8 Seznam použité literatury

- Aghajanian, C., Blank, S.V., Goff, B.A., Judson, P.L., Teneriello, M.G., Husain, A., Sovak, M.A., Yi, J., and Nycum, L.R. (2012). OCEANS: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab in Patients With Platinum-Sensitive Recurrent Epithelial Ovarian, Primary Peritoneal, or Fallopian Tube Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 30, 2039-2045.
- Ahmed, A.A., Etemadmoghadam, D., Temple, J., Lynch, A.G., Riad, M., Sharma, R., Stewart, C., Fereday, S., Caldas, C., DeFazio, A., *et al.* (2010). Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *Journal of Pathology* 221, 49-56.
- Alco, G., Bozdogan, A., Selamoglu, D., Pilanci, K.N., Tuzlali, S., Ordu, C., Igdem, S., Okkan, S., Dincer, M., Demir, G., *et al.* (2015). Clinical and histopathological factors associated with Ki-67 expression in breast cancer patients. *Oncology Letters* 9, 1046-1054.
- Angelini, S., Pantaleo, M.A., Ravegnini, G., Zenesini, C., Cavrini, G., Nannini, M., Fumagalli, E., Palassini, E., Saponara, M., Di Battista, M., *et al.* (2013). Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy. *Pharmacological Research* 68, 1-6.
- Antoniou, A., Pharoah, P.D.P., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics* 72, 1117-1130.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Felli, I.C., Losacco, M., a Natile, G. (2011). Probing the interaction of cisplatin with the human copper chaperone Atox1 by solution and In-Cell NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 133, 18361-18369.
- Auner, V., Sehouli, J., Oskay-Oezcelik, G., Horvat, R., Speiser, P., a Zeillinger, R. (2010). ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecologic Oncology* 117, 198-201.
- Aust, S., Bachmayr-Heyda, A., Pateisky, P., Tong, D., Darb-Esfahani, S., Denkert, C., Chekerov, R., Sehouli, J., Mahner, S., Van Gorp, T., *et al.* (2012). Role of TRAP1 and estrogen receptor alpha in patients with ovarian cancer - A study of the OVCAD consortium. *Molecular Cancer* 11, Article Number 69.
- Aust, S., Obrist, P., Jaeger, W., Klimpfing, M., Tucek, G., Wrba, F., Penner, E., a Thalhammer, T. (2004). Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium. *Laboratory Investigation* 84, 1024-1036.
- Baekelandt, M.M., Holm, R., Nesland, J.M., Trope, C.G., a Kristensen, G.B. (2000). P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer. *Anticancer Research* 20, 1061-1067.
- Bardin, A., Hoffmann, P., Boulle, N., Katsaros, D., Vignon, F., Pujol, P., a Lazennec, G. (2004). Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis (Retracted article. See vol 65, pg 5480, 2005). *Cancer Research* 64, 5861-5869.
- Benjamini, Y., a Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57, 289-300.
- Berek, J.S., Crum, C., a Friedlander, M. (2015). Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 131, S111-S122.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2012). *Biochemistry*, Seventh Edition. W.H. Freeman and Company, Basingstoke.
- Blalock, T.D., Spurr-Michaud, S.J., Tisdale, A.S., Heimer, S.R., Gilmore, M.S., Ramesh, V., a Gipson, I.K. (2007). Functions of MUC16 in corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48, 4509-4518.
- Blommaert, F.A., Vandijkknijnenburg, H.C.M., Dijt, F.J., Denengelse, L., Baan, R.A., Berends, F., a Fichtingerschepman, A.M.J. (1995). Formation of DNA-adducts by the anticancer drug carboplatin - different nucleotide-sequence preferences in-vitro and in cells. *Biochemistry* 34, 8474-8480.

- Bodurka, D.C., Deavers, M.T., Tian, C.Q., Sun, C.C., Malpica, A., Coleman, R.L., Lu, K.H., Sood, A.K., Birrer, M.J., Ozols, R., *et al.* (2012). Reclassification of serous ovarian carcinoma by a 2-tier system. *Cancer 118*, 3087-3094.
- Boonstra, R., Timmer-Bosscha, H., van Echten-Arends, J., van der Kolk, D.M., van den Berg, A., de Jong, B., Tew, K.D., Poppema, S., a de Vries, E.G.E. (2004). Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation. *British Journal of Cancer 90*, 2411-2417.
- Booth, D.G., Takagi, M., Sanchez-Pulido, L., Petfalski, E., Vargiu, G., Samejima, K., Imamoto, N., Ponting, C.P., Tollervey, D., Earnshaw, W.C., *et al.* (2014). Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *Elife 3*, Article Number e01641.
- Boyle, A.P., Hong, E.L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M.A., Kasowski, M., Karczewski, K.J., Park, J., Hitz, B.C., Weng, S., *et al.* (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research 22*, 1790-1797.
- Brynychova, V., Ehrlichova, M., Hlavac, V., Nemcova-Furstova, V., Pecha, V., Leva, J., Trnkova, M., Mrhalova, M., Kodet, R., Vrana, D., *et al.* (2016). Genetic and functional analyses do not explain the association of high PRC1 expression with poor survival of breast carcinoma patients. *Biomed Pharmacother 2016* in press.
- Burger, H., Zoumaro-Djayoon, A., Boersma, A.W.M., Helleman, J., Berns, E., Mathijssen, R.H.J., Loos, W.J., a Wiemer, E.A.C. (2010). Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *British Journal of Pharmacology 159*, 898-908.
- Burger, R.A., Brady, M.F., Bookman, M.A., Fleming, G.F., Monk, B.J., Huang, H., Mannel, R.S., Homesley, H.D., Fowler, J., Greer, B.E., *et al.* (2011). Incorporation of Bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *New England Journal of Medicine 365*, 2473-2483.
- Burkard, M.E., Randall, C.L., Larochelle, S., Zhang, C., Shokat, K.M., Fisher, R.P., a Jallepalli, P.V. (2007). Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104*, 4383-4388.
- Bustreo, S., Osella-Abate, S., Cassoni, P., Donadio, M., Airoidi, M., Pedani, F., Papotti, M., Sapino, A., a Castellano, I. (2016). Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment 157*, 363-371.
- Buys, S.S., Partridge, E., Black, A., Johnson, C.C., Lamerato, L., Isaacs, C., Reding, D.J., Greenlee, R.T., Yokochi, L.A., Kessel, B., *et al.* (2011). Effect of screening on ovarian cancer mortality the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association 305*, 2295-2303.
- Cai, Q.Y., Zhang, B., Sung, H., Low, S.K., Kweon, S.S., Lu, W., Shi, J.J., Long, J.R., Wen, W.Q., Choi, J.Y., *et al.* (2014). Genome-wide association analysis in East Asians identifies breast cancer susceptibility loci at 1q32.1, 5q14.3 and 15q26.1. *Nature Genetics 46*, 886-890.
- Cox, D.R. (1972). Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology 34*, 187-220.
- Dasari, S., a Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology 740*, 364-378.
- Davis, W., Boyd, J.T., Ile, K.E., a Tew, K.D. (2004). Human ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) positively regulates low-density lipoprotein receptor expression and negatively regulates cholesterol esterification in Chinese hamster ovary cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids 1683*, 89-100.
- De Sousa, G.F., Wlodarczyk, S.R., a Monteiro, G. (2014). Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 50*, 693-701.
- Dean, M., Rzhetsky, A., a Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research 11*, 1156-1166.
- DeLoia, J.A., Zamboni, W.C., Jones, J.M., Strychor, S., Kelley, J.L., a Gallion, H.H. (2008). Expression and activity of taxane-metabolizing enzymes in ovarian tumors. *Gynecologic Oncology 108*, 355-360.
- Denny, L., Quinn, M., a Hacker, N. (2012). FIGO Cancer Report 2012. *International Journal of Gynecology & Obstetrics 119*, S89-S89.

- Ding, X., Mohd, A.B., Huang, Z., Baba, T., Bernardini, M.Q., Lyerly, H.K., Berchuck, A., Murphy, S.K., Buermeyer, A.B., a Devi, G.R. (2009). MLH1 expression sensitises ovarian cancer cells to cell death mediated by XIAP inhibition. *British Journal of Cancer* *101*, 269-277.
- Dos Santos, C.R., Domingues, G., Matias, I., Matos, J., Fonseca, I., de Almeida, J.M., a Dias, S. (2014). LDL-cholesterol signaling induces breast cancer proliferation and invasion. *Lipids in Health and Disease* *13*, Article Number 16.
- Doyle, L.A., Yang, W.D., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y.M., Rishi, A.K., a Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 15665-15670.
- Drapkin, R., von Horsten, H.H., Lin, Y.F., Mok, S.C., Crum, C.P., Welch, W.R., a Hecht, J.L. (2005). Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Research* *65*, 2162-2169.
- Drotschmann, K., Topping, R.R., Clodfelter, J.E., a Salsbury, F.R. (2004). Mutations in the nucleotide-binding domain of MutS homologs uncouple cell death from cell survival. *DNA Repair* *3*, 729-742.
- Du Bois, A., Luck, H.J., Meier, W., Adams, H.P., Mobus, V., Costa, S., Bauknecht, T., Richter, B., Warm, M., Schroder, W., *et al.* (2003). A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute* *95*, 1320-1330.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H.D., a Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium-album* Limber. *European Journal of Biochemistry* *47*, 91-97.
- Ee, P.L.R., Kamalakaran, S., Tonetti, D., He, X.L., Ross, D.D., a Beck, W.T. (2004). Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Research* *64*, 1247-1251.
- Ehrlichova, M., Mohelnikova-Duchonova, B., Hrdy, J., Brynychova, V., Mrhalova, M., Kodet, R., Rob, L., Pluta, M., Gut, I., Soucek, P., *et al.* (2013). The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma. *Genomics* *102*, 96-101.
- Ferlini, C., Cicchillitti, L., Raspaglio, G., Bartollino, S., Cimitan, S., Bertucci, C., Mozzetti, S., Gallo, D., Persico, M., Fattorusso, C., *et al.* (2009). Paclitaxel directly binds to Bcl-2 and functionally mimics activity of Nur77. *Cancer Research* *69*, 6906-6914.
- Fichtinger-Schepman, A.M., *et al.* (1985). Citováno podle Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* *7*, 573-584.
- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R.D., a Howell, S.B. (1996). The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Research* *56*, 4881-4886.
- Garcia-Velasco, A., Mendiola, C., Sanchez-Munoz, A., Ballestin, C., Colorner, R., a Cortes-Funes, H. (2008). Prognostic value of hormonal receptors, p53, ki67 and HER2/neu expression in epithelial ovarian carcinoma. *Clinical & Translational Oncology* *10*, 367-371.
- Garzetti, G.G., Ciavattini, A., Goteri, G., Denictolis, M., Stramazotti, D., Lucarini, G., a Biagini, G. (1995). Ki67 antigen immunostaining (MIB-1 monoclonal-antibody) in serous ovarian-tumors - index of proliferative activity with prognostic-significance. *Gynecologic Oncology* *56*, 169-174.
- Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., a Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* *26*, 534-540.
- Geyer, J.T., Lopez-Garcia, M.A., Sanchez-Estevéz, C., Sarrio, D., Moreno-Bueno, G., Franceschetti, I., Palacios, J., a Oliva, E. (2009). Pathogenetic pathways in ovarian endometrioid adenocarcinoma a molecular study of 29 cases. *American Journal of Surgical Pathology* *33*, 1157-1163.
- Gnerre, C., Blattler, S., Kaufmann, M.R., Looser, R., a Meyer, U.A. (2004). Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics* *14*, 635-645.
- Godwin, A.K., Meister, A., Odwyer, P.J., Huang, C.S., Hamilton, T.C., a Anderson, M.E. (1992). High-resistance to cisplatin in human ovarian-cancer cell-line is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 3070-3074.

- Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., *et al.* (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Molecular Cell* 6, 517-526.
- Gottesman, M.M., Fojo, T., a Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2, 48-58.
- Grindedal, E.M., Renkonen-Sinisalo, L., Vasen, H., Evans, G., Sala, P., Blanco, I., Gronwald, J., Apold, J., Eccles, D.M., Sanchez, A.A., *et al.* (2010). Survival in women with MMR mutations and ovarian cancer: a multicentre study in Lynch syndrome kindreds. *Journal of Medical Genetics* 47, 99-102.
- Gruneberg, U., Neef, R., Li, X.L., Chan, E.H.Y., Chalamalasetty, R.B., Nigg, E.A., a Barr, F.A. (2006). KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *Journal of Cell Biology* 172, 363-372.
- Guengerich, F.P. (2008). Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology* 21, 70-83.
- Gupta, D., Venkatesh, M., Wang, H.W., Kim, S., Sinz, M., Goldberg, G.L., Whitney, K., Longley, C., a Mani, S. (2008). Expanding the roles for pregnane X receptor in cancer: Proliferation and drug resistance in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 14, 5332-5340.
- Guzzo, G., Sciacovelli, M., Bernardi, P., a Rasola, A. (2014). Inhibition of succinate dehydrogenase by the mitochondrial chaperone TRAP1 has anti-oxidant and anti-apoptotic effects on tumor cells. *Oncotarget* 5, 11897-11908.
- Halestrap, A.P. (2013). The SLC16 gene family - Structure, role and regulation in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 337-349.
- Havrilesky, L., Darcy, K.M., Hamdan, H., Priore, R.L., Leon, J., Bell, J., a Berchuck, A. (2003). Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology* 21, 3814-3825.
- He, L., Vasiliou, K., a Nebert, D.W. (2009). Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Human genomics* 3, 195-206.
- Hedditch, E.L., Gao, B., Russell, A.J., Lu, Y., Emmanuel, C., Beesley, J., Johnatty, S.E., Chen, X.Q., Harnett, P., George, J., *et al.* (2014). ABCA transporter gene expression and poor outcome in epithelial ovarian cancer. *Jnci-Journal of the National Cancer Institute* 106, Article Number dju149.
- Hellstrom, I., Raycraft, J., Hayden-Ledbetter, M., Ledbetter, J.A., Schummer, M., McIntosh, M., Drescher, C., Urban, N., a Hellstrom, K.E. (2003). The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Research* 63, 3695-3700.
- Herraez, E., Gonzalez-Sanchez, E., Vaquero, J., Romero, M.R., Serrano, M.A., Marin, J.J.G., a Briz, O. (2012). Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins. *Molecular Pharmaceutics* 9, 2565-2576.
- Hinoshita, E., Uchiumi, T., Taguchi, K., Kinukawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimachi, K., a Kuwano, M. (2000). Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clinical Cancer Research* 6, 2401-2407.
- Hirose, K., Longo, D.L., Oppenheim, J.J., a Matsushima, K. (1993). Overexpression of mitochondrial manganese superoxide-dismutase promotes the survival of tumor-cells exposed to interleukin-1, tumor-necrosis-factor, selected anticancer drugs, and ionizing-radiation. *Faseb Journal* 7, 361-368.
- Hlavac, V., Brynychova, V., Vaclavikova, R., Ehrlichova, M., Vrana, D., Pecha, V., Kozevnikovova, R., Trnkova, M., Gatek, J., Kopperova, D., *et al.* (2013). The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* 14, 515-529.
- Hlavata, I., Mohelnikova-Duchonova, B., Vaclavikova, R., Liska, V., Pitule, P., Novak, P., Bruha, J., Vycital, O., Holubec, L., Treska, V., *et al.* (2012). The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 27, 187-196.
- Hoglund, P.J., Nordstrom, K.J.V., Schioth, H.B., a Fredriksson, R. (2011). The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of bilaterian species. *Molecular Biology and Evolution* 28, 1531-1541.
- Hu, Y.M., Rosen, D.G., Zhou, Y., Feng, L., Yang, G., Liu, J.S., a Huang, P. (2005). Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer. *Journal of Biological Chemistry* 280, 39485-39492.

- Hunter, S.M., Anglesio, M.S., Ryland, G.L., Sharma, R., Chiew, Y.E., Rowley, S.M., Doyle, M.A., Li, J., Gilks, C.B., Moss, P., *et al.* (2015). Molecular profiling of low grade serous ovarian tumours identifies novel candidate driver genes. *Oncotarget* 6, 37663-37677.
- Chen, M., Jin, Y., Bi, Y.L., Yin, J., Wang, Y.X., a Pan, L.Y. (2014a). A survival analysis comparing women with ovarian low-grade serous carcinoma to those with high-grade histology. *Oncotargets and Therapy* 7, 1891-1899.
- Chen, Y., Bieber, M.M., a Teng, N.N.H. (2014b). Hedgehog signaling regulates drug sensitivity by targeting ABC transporters ABCB1 and ABCG2 in epithelial ovarian cancer. *Molecular Carcinogenesis* 53, 625-634.
- Cho, H.S., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., a Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421, 756-760.
- Cho, K.R., a Shih, I.M. (2009). Ovarian cancer. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease* 4, 287-313.
- Ikemura, T. (1985). Codon usage and transfer-RNA content in unicellular and multicellular organisms. *Molecular Biology and Evolution* 2, 13-34.
- Ile, K.E., Davis, W., Boyd, J.T., Soulika, A.M., a Tew, K.D. (2004). Identification of a novel first exon of the human ABCA2 transporter gene encoding a unique N-terminus. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression* 1678, 22-32.
- Itoh, S., Kim, H.W., Nakagawa, O., Ozumi, K., Lessner, S.M., Aoki, H., Akram, K., McKinney, R.D., Ushio-Fukai, M., a Fukai, T. (2008). Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 9157-9167.
- Januchowski, R., Zawierucha, P., Rucinski, M., Andrzejewska, M., Wojtowicz, K., Nowicki, M., a Zabel, M. (2014). Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 68, 447-453.
- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Center, M., a Keppler, D. (1994). ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Research* 54, 4833-4836.
- Jia, P., Wu, S., Li, F., Xu, Q., Wu, M., Chen, G., Liao, G., Wang, S., Zhou, J., Lu, Y., *et al.* (2005). Breast cancer resistance protein-mediated topotecan resistance in ovarian cancer cells. *International Journal of Gynecological Cancer* 15, 1042-1048.
- Jiang, W., Jimenez, G., Wells, N.J., Hope, T.J., Wahl, G.M., Hunter, T., a Fukunaga, R. (1998). PRC1: A human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Molecular Cell* 2, 877-885.
- Johansson, L., Thomsen, J.S., Damdimopoulos, A.E., Spyrou, G., Gustafsson, J.A., a Treuter, E. (1999). The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ER alpha and ER beta. *Journal of Biological Chemistry* 274, 345-353.
- Jordan, M.A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W.B., Copp, H., a Wilson, L. (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research* 56, 816-825.
- Journe, F., Durbecq, V., Chaboteaux, C., Rouas, G., Laurent, G., Nonclercq, D., Sotiriou, C., Body, J.J., a Larsimont, D. (2009). Association between farnesoid X receptor expression and cell proliferation in estrogen receptor-positive luminal-like breast cancer from postmenopausal patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 115, 523-535.
- Juliano, R.L., a Ling, V. (1976). Surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese-hamster ovary cell mutants. *Biochimica Et Biophysica Acta* 455, 152-162.
- Kaminski, W.E., Piehler, A., Pullmann, K., Porsch-Ozcurumez, M., Duong, C., Bared, G.M., Buchler, C., a Schmitz, G. (2001). Complete coding sequence, promoter region, and genomic structure of the human ABCA2 gene and evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281, 249-258.
- Katzenellenbogen, B.S., Kendra, K.L., Norman, M.J., a Berthois, Y. (1987). Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen-receptor content of MCF-7 human-breast cancer-cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens. *Cancer Research* 47, 4355-4360.
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 7, 573-584.

- Ketabi, Z., Bartuma, K., Bernstein, I., Malander, S., Gronberg, H., Bjorck, E., Holck, S., a Nilbert, M. (2011). Ovarian cancer linked to lynch syndrome typically presents as early-onset, non-serous epithelial tumors. *Gynecologic Oncology* 121, 462-465.
- Kim, B., Fatayer, H., Hanby, A.M., Horgan, K., Perry, S.L., Valleley, E.M.A., Verghese, E.T., Williams, B.J., Thorne, J.L., a Hughes, T.A. (2013). Neoadjuvant chemotherapy induces expression levels of breast cancer resistance protein that predict disease-free survival in breast cancer. *Plos One* 8, Article Number e62766.
- Korita, P.V., Wakai, T., Shirai, Y., Matsuda, Y., Sakata, J., Takamura, M., Yano, M., Sanpei, A., Aoyagi, Y., Hatakeyama, K., *et al.* (2010). Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports* 23, 965-972.
- Kumar, G., Ray, S., Walle, T., Huang, Y., Willingham, M., Self, S., a Bhalla, K. (1995). Comparative in vitro cytotoxic effects of taxol and its major human metabolite 6 alpha-hydroxytaxol. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 36, 129-135.
- Kurman R.J., Carcangiu M.L., Herrington C.S., a Young R.H. (eds.) (2014). Citováno podle Berek, J.S., Crum, C., a Friedlander, M. (2015). Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 131, S111-S122.
- Laing, N.M., Belinsky, M.G., Kruh, G.D., Bell, D.W., Boyd, J.T., Barone, L., Testa, J.R., a Tew, K.D. (1998). Amplification of the ATP-Binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells. *Cancer Research* 58, 1332-1337.
- Larson, C.A., Blair, B.G., Safaei, R., a Howell, S.B. (2009). The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs. *Molecular Pharmacology* 75, 324-330.
- Lassus, H., Sihto, H., Leminen, A., Joensuu, H., Isola, J., Nupponen, N.N., a Butzow, R. (2006). Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 84, 671-681.
- Lee, J., a Moon, C. (2011). Current status of experimental therapeutics for head and neck cancer. *Experimental Biology and Medicine* 236, 375-389.
- Lee, Y.Y., Choi, C.H., Do, I.G., Song, S.Y., Lee, W., Park, H.S., Song, T.J., Kim, M.K., Kim, T.J., Lee, J.W., *et al.* (2011). Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. *Gynecologic Oncology* 122, 361-365.
- Li, C., Lin, M.H., a Liu, J.W. (2004). Identification of PRC1 as the p53 target gene uncovers a novel function of p53 in the regulation of cytokinesis. *Oncogene* 23, 9336-9347.
- Li, D.W., Sun, J.Y., Wang, K., Zhang, S., Hou, Y.J., Yang, M.F., Fu, X.Y., Zhang, Z.Y., Mao, L.L., Yuan, H., *et al.* (2015). Attenuation of cisplatin-induced neurotoxicity by cyanidin, a natural inhibitor of ROS-mediated apoptosis in PC12 cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* 35, 995-1001.
- Lieu, C.H., Chang, Y.N., a Lai, Y.K. (1997). Dual cytotoxic mechanisms of submicromolar taxol on human leukemia HL-60 cells. *Biochemical Pharmacology* 53, 1587-1596.
- Lin, C.C., Zeng, H.L., Lu, J.Y., Xie, Z.Q., Sun, W.Y., Luo, C., Ding, J., Yuan, S.T., Geng, M.Y., a Huang, M. (2015). Acetylation at lysine 71 inactivates superoxide dismutase 1 and sensitizes cancer cells to genotoxic agents. *Oncotarget* 6, 20578-20591.
- Ling, Y.H., Consoli, U., Tornos, C., Andreeff, M., a Perez-Soler, R. (1998). Accumulation of cyclin B1, activation of cyclin B1-dependent kinase and induction of programmed cell death in human epidermoid carcinoma KB cells treated with taxol. *International Journal of Cancer* 75, 925-932.
- Liu, L.X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R., a Aubourg, P. (1999). Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *Journal of Biological Chemistry* 274, 32738-32743.
- Liu, P., Sun, Y.L., Du, J., Hou, X.S., a Meng, H. (2012). CD105/Ki67 coexpression correlates with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* 22, 586-592.
- Mabuchi, S., Ohmichi, M., Kimura, A., Ikebuchi, Y., Hisamoto, K., Arimoto-Ishida, E., Nishio, Y., Takahashi, K., Tasaka, K., a Murata, Y. (2004). Tamoxifen inhibits cell proliferation via mitogen-activated protein kinase cascades in human ovarian cancer cell lines in a manner not dependent on the expression of estrogen receptor or the sensitivity to cisplatin. *Endocrinology* 145, 1302-1313.

- Mace, S., Cousin, E., Ricard, S., Genin, E., Spanakis, E., Lafargue-Soubigou, C., Genin, B., Fournel, R., Roche, S., Haussy, G., *et al.* (2005). ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 18, 119-125.
- Mack, J.T., Townsend, D.M., Beljanski, V., a Tew, K.D. (2007). The ABCA2 transporter: intracellular roles in trafficking and metabolism of LDL-derived cholesterol and sterol-related compounds. *Current Drug Metabolism* 8, 47-57.
- Maglich, J.M., Stoltz, C.M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J.T., a Kliewer, S.A. (2002). Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Molecular Pharmacology* 62, 638-646.
- Malpica, A., Deavers, M.T., Lu, K., Bodurka, D.C., Atkinson, E.N., Gershenson, D.M., a Silva, E.G. (2004). Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *American Journal of Surgical Pathology* 28, 496-504.
- Medl, M., Sevela, P., Czerwenka, K., Dobianer, K., Hanak, H., Hruza, C., Klein, M., Leodolter, S., Mullauerertl, S., Rosen, A., *et al.* (1995). DNA amplification of her-2/NEU and INT-2 oncogenes in epithelial ovarian-cancer. *Gynecologic Oncology* 59, 321-326.
- Meyer, T.S., a Lamberts, B.L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochimica Et Biophysica Acta* 107, 144-&.
- Michaki, V., Guix, F.X., Vennekens, K., Munck, S., Dingwall, C., Davis, J.B., Townsend, D.M., Tew, K.D., Feiguin, F., De Strooper, B., *et al.* (2012). Down-regulation of the ATP-binding cassette transporter 2 (Abca2) reduces amyloid-beta production by altering nicastrin maturation and intracellular localization. *Journal of Biological Chemistry* 287, 1100-1111.
- Miyajima, A., Nakashima, J., Yoshioka, K., Tachibana, M., Tazaki, H., a Murai, M. (1997). Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *British Journal of Cancer* 76, 206-210.
- Miyoshi, Y., Ando, A., Takamura, Y., Taguchi, T., Tamaki, T., a Noguchi, S. (2002). Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues. *International Journal of Cancer* 97, 129-132.
- Mohelnikova-Duchonova, B., Brynychova, V., Oliverius, M., Honsova, E., Kala, Z., Muckova, K., a Soucek, P. (2013). Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. *Pancreas* 42, 707-716.
- Mohelnikova-Duchonova, B., Oliverius, M., Honsova, E., a Soucek, P. (2012). Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma. *Disease Markers* 32, 203-210.
- Mollinari, C., Kleman, J.P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T., a Margolis, R.L. (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *Journal of Cell Biology* 157, 1175-1186.
- Monsarrat, B., Chatelut, E., Royer, I., Alvinerie, P., Dubois, J., Dezeuse, A., Roche, H., Cros, S., Wright, M., a Canal, P. (1998). Modification of paclitaxel metabolism in a cancer patient by induction of cytochrome P450 3A4. *Drug Metabolism and Disposition* 26, 229-233.
- Morisaki, K., Robey, R., Ozvegy-Laczka, C., Honjo, Y., Polgar, O., Steadman, K., Sarkadi, B., a Bates, S.E. (2005). Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56, 161-172.
- Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D., a Papadimitriou, C. (2012). Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treatment Reviews* 38, 890-903.
- Mustacchi, G., Sormani, M.P., Bruzzi, P., Gennari, A., Zanconati, F., Bonifacio, D., Monzoni, A., a Morandi, L. (2013). Identification and validation of a new set of five genes for prediction of risk in early breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 9686-9702.
- Nakayama, K., Kanzaki, A., Terada, K., Mutoh, M., Ogawa, K., Sugiyama, T., Takenoshita, S., Itoh, K., Yaegashi, N., Miyazaki, K., *et al.* (2004). Prognostic value of the Cu-transporting ATPase in ovarian carcinoma patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 10, 2804-2811.
- Nakayama, K., Takebayashi, Y., Nakayama, S., Hata, K., Fujiwaki, R., Fukumoto, M., a Miyazaki, K. (2003). Prognostic value of overexpression of p53 in human ovarian carcinoma patients receiving cisplatin. *Cancer Letters* 192, 227-235.

- Neef, R., Gruneberg, U., Kopajtich, R., Li, X.L., Nigg, E.A., Sillje, H., a Barr, F.A. (2007). Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nature Cell Biology* 9, 436-U132.
- Ness, R.B. (2003). Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 189, 280-294.
- Novotny, Z., Presli, J., Kucera, R., Topolcan, O., Vrzalova, J., Fuchsova, R., Betincova, L., a Rokyta, Z. (2012). HE4 and ROMA index in czech postmenopausal women. *Anticancer Research* 32, 4137-4140.
- Odicino, F. (2009). Gynaecological tumours. *In: Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., a Wittekind, C. (eds.): TNM classification of malignant tumours, seventh edition. Wiley-Blackwell, Oxford-Chichester-Hoboken, 222-227.*
- O'Donnell, A.J.M., Macleod, K.G., Burns, D.J., Smyth, J.F., a Langdon, S.P. (2005). Estrogen receptor-alpha mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocrine-Related Cancer* 12, 851-866.
- Ohishi, Y., Oda, Y., Uchiumi, T., Kobayashi, H., Hirakawa, T., Miyamoto, S., Kinukawa, N., Nakano, H., Kuwano, M., a Tsuneyoshi, M. (2002). ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research* 8, 3767-3775.
- Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96, 2181-2196.
- Pal, T., Akbari, M.R., Sun, P., Lee, J.H., Fulp, J., Thompson, Z., Coppola, D., Nicosia, S., Sellers, T.A., McLaughlin, J., *et al.* (2012). Frequency of mutations in mismatch repair genes in a population-based study of women with ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 107, 1783-1790.
- Park, Y.Y., Choi, H.S., a Lee, J.S. (2010). Systems-level analysis of gene expression data revealed NR0B2/SHP as potential tumor suppressor in human liver cancer. *Molecules and Cells* 30, 485-491.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W.Z., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M.A., Hammer, R.E., a Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693-704.
- Perego, P., Giarola, M., Righetti, S.C., Supino, R., Caserini, C., Delia, D., Pierotti, M.A., Miyashita, T., Reed, J.C., a Zunino, F. (1996). Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Research* 56, 556-562.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, Article Number e45.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., a Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, Article Number e35.
- Piehler, A., Kaminski, W.E., Wenzel, J.J., Langmann, T., a Schmitz, G. (2002). Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295, 408-416.
- Plumb, J.A., Strathdee, G., Sludden, J., Kaye, S.B., a Brown, R. (2000). Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Research* 60, 6039-6044.
- Presta, L.G., Chen, H., Oconnor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M., a Ferrara, N. (1997). Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Research* 57, 4593-4599.
- Pujade-Lauraine, E., Hilpert, F., Weber, B., Reuss, A., Poveda, A., Kristensen, G., Sorio, R., Vergote, I., Witteveen, P., Bamias, A., *et al.* (2014). Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: the AURELIA open-label randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology* 32, 1302-1308.
- Rahgozar, S., Moafi, A., Abedi, M., Entezar-e-ghaem, M., Moshtaghian, J., Ghaedi, K., Esmaeili, A., a Montazeri, F. (2014). mRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. *Cancer Biology & Therapy* 15, 35-41.

- Ramirez, I., Chon, H.S., a Apte, S.M. (2011). The role of surgery in the management of epithelial ovarian cancer. *Cancer Control* 18, 22-30.
- Rao, S., Krauss, N.E., Heering, J.M., Swindell, C.S., Ringel, I., Orr, G.A., a Horwitz, S.B. (1994). 3'-(P-azidobenzamido)taxol photolabels the N-terminal 31 amino-acids of beta-tubulin. *Journal of Biological Chemistry* 269, 3132-3134.
- Ray-Coquard, I., Guastalla, J.P., Allouache, D., Combe, M., Weber, B., Cretin, J., Cure, H., Nunhuck, S., Paraiso, D., Mousseau, M., *et al.* (2008). HER2 overexpression/amplification and trastuzumab treatment in advanced ovarian cancer: a GINECO Phase II Study. *Oncologie* 10, S411-S417.
- Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., a Mangelsdorf, D.J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *Journal of Biological Chemistry* 277, 18793-18800.
- Risch, H.A., McLaughlin, J.R., Cole, D.E.C., Rosen, B., Bradley, L., Kwan, E., Jack, E., Vesprini, D.J., Kuperstein, G., Abrahamson, J.L.A., *et al.* (2001). Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *American Journal of Human Genetics* 68, 700-710.
- Robey, R.W., Medina-Perez, W.Y., Nishiyama, K., Lahusen, T., Miyake, K., Litman, T., Senderowicz, A.M., Ross, D.D., a Bates, S.E. (2001). Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clinical Cancer Research* 7, 145-152.
- Rodrigues, A.C., Hirata, M.H., Dominguez, R., a Hirata, C. (2009). Impact of cholesterol on ABC and SLC transporters expression and function and its role in disposition variability to lipid-lowering drugs. *Pharmacogenomics* 10, 1007-1016.
- Romero-Calvo, I., Ocon, B., Martinez-Moya, P., Suarez, M.D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O., a de Medina, F.S. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry* 401, 318-320.
- Rowinsky, E.K., a Donehower, R.C. (1995). Drug-therapy - paclitaxel (taxol). *New England Journal of Medicine* 332, 1004-1014.
- Rustin, G.J.S., van der Burg, M.E.L., Griffin, C.L., Guthrie, D., Lamont, A., Jayson, G.C., Kristensen, G., Mediola, C., Coens, C., Qian, W.D., *et al.* (2010). Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial. *Lancet* 376, 1155-1163.
- Safaei, R., Maktabi, M.H., Blair, B.G., Larson, C.A., a Howell, S.B. (2009). Effects of the loss of Atox1 on the cellular pharmacology of cisplatin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103, 333-341.
- Sain, N., Krishnan, B., Ormerod, M.G., De Rienzo, A., Liu, W.M., Kaye, S.B., Workman, P., a Jackman, A.L. (2006). Potentiation of paclitaxel activity by the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human ovarian carcinoma cell lines with high levels of activated AKT. *Molecular Cancer Therapeutics* 5, 1197-1208.
- Sakamoto, M., Kondo, A., Kawasaki, K., Goto, T., Sakamoto, H., Miyake, K., Koyamatsu, Y., Akiya, T., Iwabuchi, H., Muroya, T., *et al.* (2001). Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Human cell* 14, 305-315.
- Samimi, G., Katano, K., Holzer, A.K., Safaei, R., a Howell, S.B. (2004). Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Molecular Pharmacology* 66, 25-32.
- Samimi, G., Varki, N.M., Wilczynski, S., Safaei, R., Alberts, D.S., a Howell, S.B. (2003). Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clinical Cancer Research* 9, 5853-5859.
- Sanchez, A.M., Flamini, M.I., Baldacci, C., Goglia, L., Genazzani, A.R., a Simoncini, T. (2010). Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP. *Molecular Endocrinology* 24, 2114-2125.
- Sanchez, C., Mendoza, P., Contreras, H.R., Vergara, J., McCubrey, J.A., Huidobro, C., a Castellon, E.A. (2009). Expression of multidrug resistance proteins in prostate cancer is related with cell sensitivity to chemotherapeutic drugs. *Prostate* 69, 1448-1459.

- Scalise, M., Galluccio, M., Accardi, R., Cornet, I., Tommasino, M., a Indiveri, C. (2012). Human OCTN2 (SLC22A5) is down-regulated in virus- and nonvirus-mediated cancer. *Cell Biochemistry and Function* 30, 419-425.
- Sciacovelli, M., Guzzo, G., Morello, V., Frezza, C., Zheng, L., Nannini, N., Calabrese, F., Laudiero, G., Esposito, F., Landriscina, M., *et al.* (2013). The mitochondrial chaperone TRAP1 promotes neoplastic growth by inhibiting succinate dehydrogenase. *Cell Metabolism* 17, 988-999.
- Segala, G., de Medina, P., Iuliano, L., Zerbinati, C., Paillasse, M.R., Noguier, E., Dalenc, F., Payre, B., Jordan, V.C., Record, M., *et al.* (2013). 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of Tamoxifen in breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 86, 175-189.
- Seol, W., Choi, H.S., a Moore, D.D. (1996). An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 272, 1336-1339.
- Sever, R., a Glass, C.K. (2013). Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, Article Number a016709.
- Shih, I.M., a Kurman, R.J. (2004). Ovarian tumorigenesis - a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *American Journal of Pathology* 164, 1511-1518.
- Shimizu, Y., Kamoi, S., Amada, S., Akiyama, F., a Silverberg, S.G. (1998). Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma - Testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer* 82, 893-901.
- Schmeler, K.M., Sun, C.C., Bodurka, D.C., Deavers, M.T., Malpica, A., Coleman, R.L., Ramirez, P.T., a Gershenson, D.M. (2008). Neoadjuvant chemotherapy for low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. *Gynecologic Oncology* 108, 510-514.
- Schofield, M.J., a Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual Review of Microbiology* 57, 579-608.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., a Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *Bmc Molecular Biology* 7, Article Number 3.
- Schwartz, D.R., Kardia, S.L.R., Shedden, K.A., Kuick, R., Michailidis, G., Taylor, J.M.G., Misek, D.E., Wu, R., Zhai, Y.L., Darrah, D.M., *et al.* (2002). Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer Research* 62, 4722-4729.
- Schwartz, P.E., Chambers, J.T., Kohorn, E.I., Chambers, S.K., Weitzman, H., Voynick, I.M., MacLusky, N., a Naftolin, F. (1989). Tamoxifen in combination with cytotoxic chemotherapy in advanced epithelial ovarian cancer. A prospective randomized trial. *Cancer* 63, 1074-1078.
- Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265-7279.
- Singer, G., Oldt, R., Cohen, Y., Wang, B.G., Sidransky, D., Kurman, R.J., a Shih, I.M. (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 95, 484-486.
- Singh, P., Saxena, R., Srinivas, G., Pande, G., a Chattopadhyay, A. (2013). Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. *Plos One* 8, Article Number e58833.
- Sivertsson, L., Edebert, I., Palmertz, M.P., Ingelman-Sundberg, M., a Neve, E.P.A. (2013). Induced CYP3A4 Expression in Confluent Huh7 Hepatoma Cells as a Result of Decreased Cell Proliferation and Subsequent Pregnane X Receptor Activation. *Molecular Pharmacology* 83, 659-670.
- Skrzycki, M., Majewska, M., a Czczot, H. (2010). Superoxide dismutase mRNA and protein level in human colorectal cancer. *Central European Journal of Biology* 5, 590-599.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., *et al.* (1989). Studies of the HER-2/NEU proto-oncogene in human-breast and ovarian-cancer. *Science* 244, 707-712.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., a Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.

- Sobin, L.H., Brierley, J., Gospodarowicz, M.K., a O'Sullivan, B. (2009). Introduction. *In*: Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., a Wittekind, C. (eds.): TNM classification of malignant tumours, seventh edition. Wiley-Blackwell, Oxford-Chichester-Hoboken, 1-22.
- Soucek, P., Anzenbacher, S., Skoumalova, I., a Dvokak, M. (2005). Expression of cytochrome P450 genes in CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 23, 1417-1422.
- Spruance, S.L., Reid, J.E., Grace, M., a Samore, M. (2004). Hazard ratio in clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 2787-2792.
- Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., Latour, A., Liu, Y.P., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., *et al.* (2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3369-3374.
- Storch, C.H., Ehehalt, R., Haefeli, W.E., a Weiss, J. (2007). Localization of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 323, 257-264.
- Subramanian, R., Wilson-Kubalek, E.M., Arthur, C.P., Bick, M.J., Campbell, E.A., Darst, S.A., Milligan, R.A., a Kapoor, T.M. (2010). Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell* 142, 433-443.
- Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P., a Negishi, M. (1999). The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *Journal of Biological Chemistry* 274, 6043-6046.
- Sugiyama, T., Kamura, T., Kigawa, J., Terakawa, N., Kikuchi, Y., Kita, T., Suzuki, W., Sato, I., a Taguchi, K. (2000). Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary - a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* 88, 2584-2589.
- Sundov, D., Caric, A., Mrklic, I., Gusic, D., Capkun, V., Hofman, I.D., Mise, B.P., a Tomic, S. (2013). P53, MAPK, topoisomerase II alpha and Ki67 immunohistochemical expression and KRAS/BRAF mutation in ovarian serous carcinomas. *Diagnostic Pathology* 8, Article Number 21.
- Surowiak, P., Materna, V., Kaplenko, I., Spaczynski, M., Dolinska-Krajewska, B., Gebarowska, E., Dietel, M., Zabel, M., a Lage, H. (2006). ABCC2 (MRP2, cMOAT) can be localized in the nuclear membrane of ovarian carcinomas and correlates with resistance to cisplatin and clinical outcome. *Clinical Cancer Research* 12, 7149-7158.
- Syed, N., Coley, H.M., Sehoul, J., Koensgen, D., Mustea, A., Szlosarek, P., McNeish, I., Blagden, S.P., Schmid, P., Lovell, D.P., *et al.* (2011). Polo-like kinase Plk2 is an epigenetic determinant of chemosensitivity and clinical outcomes in ovarian cancer. *Cancer Research* 71, 3317-3327.
- Synold, T.W., Dussault, I., a Forman, B.M. (2001). The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nature Medicine* 7, 584-590.
- Ševčík, L. (2012). Léčebné možnosti relabujícího karcinomu ovaria. *Remedia* 22, 86-93.
- Takahashi, K., Shibukawa, T., Moriyama, M., Shirai, T., Kijima, S., Iwanari, O., Matsunaga, I., a Kitao, M. (1986). Clinical usefulness and false-positive results of CA 125 as a tumor-marker of ovarian-cancer - a study on 674 patients. *Japanese Journal of Surgery* 16, 305-310.
- Thigpen, J.T., Blessing, J.A., Ball, H., Hummel, S.J., a Barrett, R.J. (1994). Phase-II trial of paclitaxel in patients with progressive ovarian-carcinoma after platinum-based chemotherapy - a gynecologic-oncology-group study. *Journal of Clinical Oncology* 12, 1748-1753.
- Thummel, K.E., Brimer, C., Yasuda, K., Thottassery, J., Senn, T., Lin, Y., Ishizuka, H., Kharasch, E., Schuetz, J., a Schuetz, E. (2001). Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1 alpha,25-dihydroxy vitamin D-3. *Molecular Pharmacology* 60, 1399-1406.
- Topic, E., a Gluhak, J. (1991). Isolation of restrictible DNA. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 29, 327-330.
- Towbin, H., Staehelin, T., a Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.

- Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T.A., Risinger, J.I., Barrett, J.C., Hamilton, T.C., a Chaney, S.G. (1998). The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: Correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Research* 58, 3579-3585.
- Vanderzee, A.G.J., Hollema, H., Suurmeijer, A.J.H., Krans, M., Sluiter, W.J., Willemsse, P.H.B., Aalders, J.G., a Devries, E.G.E. (1995). Value of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase-PI, C-ERBB-2, and P53 as prognostic factors in ovarian carcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 13, 70-78.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., a Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12097-12102.
- Vierkoetter, K.R., Ayabe, A.R., VanDrunen, M., Ahn, H.J., Shimizu, D.M., a Terada, K.Y. (2014). Lynch Syndrome in patients with clear cell and endometrioid cancers of the ovary. *Gynecologic Oncology* 135, 81-84.
- Vlasák, P., Presl, J., Bouda, J., Bartáková, A., Novotný, Z., a Topolčan, O. (2014). Předoperační diagnostika ovariálních nádorů a management pacientek s primárně inoperabilním maligním nádorem vaječníku.. *In: Jakubec, I. (ed.): Plzeňský lékařský sborník 80. Karolinum, Praha, 67–80.*
- Vogel, C., a Marcotte, E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* 13, 227-232.
- Voight, B.F., Scott, L.J., Steinthorsdottir, V., Morris, A.P., Dina, C., Welch, R.P., Zeggini, E., Huth, C., Aulchenko, Y.S., Thorleifsson, G., *et al.* (2010). Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nature Genetics* 42, 579-U155.
- Walczak, R., Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Castrillo, A., Pei, L.M., a Tontonoz, P. (2004). Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *Journal of Biological Chemistry* 279, 9905-9911.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., a Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha-subunits and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and common nucleotide binding fold. *Embo Journal* 1, 945-951.
- Wang, C.A., Harrell, J.C., Iwanaga, R., Jedlicka, P., a Ford, H.L. (2014). Vascular endothelial growth factor C promotes breast cancer progression via a novel antioxidant mechanism that involves regulation of superoxide dismutase 3. *Breast Cancer Research* 16, Article Number 462.
- Wang, J.Y., Lou, P.P., Lesniewski, R., a Henkin, J. (2003). Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly. *Anti-Cancer Drugs* 14, 13-19.
- Ward, A.J., a Cooper, T.A. (2010). The pathobiology of splicing. *Journal of Pathology* 220, 152-163.
- Ween, M.P., Armstrong, M.A., Oehler, M.K., a Ricciardelli, C. (2015). The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 96, 220-256.
- Weichert, W., Denkert, C., Schmidt, M., Gekeler, V., Wolf, G., Kobel, M., Dietel, M., a Hauptmann, S. (2004). Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *British Journal of Cancer* 90, 815-821.
- Wenzel, J.J., Kaminski, W.E., Piehler, A., Heimerl, S., Langmann, T., a Schmitz, G. (2003). ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306, 1089-1098.
- Wollmer, M.A., Kapaki, E., Hersberger, M., Muntwyler, J., Brunner, F., Tsolaki, M., Akatsu, H., Kosaka, K., Michikawa, M., Molyva, D., *et al.* (2006). Brief research communication - ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics* 141B, 534-536.
- Wu, C.Y., Guan, Q., Wang, Y.J., Zhao, Z.J., a Zhou, G.W. (2003). SHP-1 suppresses cancer cell growth by promoting degradation of JAK kinases. *Journal of Cellular Biochemistry* 90, 1026-1037.
- Xiang, L., Su, P., Xia, S.J., Liu, Z.Y., Wang, Y., Gao, P., a Zhou, G.Y. (2011). ABCG2 is associated with HER-2 Expression, lymph node metastasis and clinical stage in breast invasive ductal carcinoma. *Diagnostic Pathology* 6, Article Number 90.
- Yancik, R. (1993). Ovarian-cancer - age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. *Cancer* 71, 517-523.

Yang, X.K., Wang, J.D., Zhou, Y., Wang, Y.M., Wang, S.Y., a Zhang, W.Y. (2012). Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Letters* 321, 137-143.

Yang, X.W., a Page, M. (1995). P-glycoprotein expression in ovarian cancer cell line following treatment with cisplatin. *Oncology Research* 7, 619-624.

Yonezawa, A., Masuda, S., Yokoo, S., Katsura, T., a Inui, K. (2006). Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319, 879-886.

Young, L.C., Campling, B.G., Cole, S.P.C., Deeley, R.G., a Gerlach, J.H. (2001). Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clinical Cancer Research* 7, 1798-1804.

Zhang, R.T., Shi, H.R., Ren, F., Liu, H.N., Zhang, M.H., Deng, Y.X., a Li, X. (2015a). Misregulation of polo-like protein kinase 1, P53 and P21(WAF1) in epithelial ovarian cancer suggests poor prognosis. *Oncology Reports* 33, 1235-1242.

Zhang, S.Z., Lovejoy, K.S., Shima, J.E., Lagpacan, L.L., Shu, Y., Lapuk, A., Chen, Y., Komori, T., Gray, J.W., Chen, X., *et al.* (2006). Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Research* 66, 8847-8857.

Zhang, Z.M., Xie, Z., Sun, G.Y., Yang, P.F., Li, J., Yang, H.F., Xiao, S., Liu, Y., Qiu, H.B., Qin, L.J., *et al.* (2015b). Reversing drug resistance of cisplatin by hsp90 inhibitors in human ovarian cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8, 6687-6701.

Zhao, L.J., Xu, H., Qu, J.W., Zhao, W.Z., Zhao, Y.B., a Wang, J.H. (2012). Modulation of drug resistance in ovarian cancer cells by inhibition of protein kinase C-alpha (PKC-alpha) with small interference RNA (siRNA) agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13, 3631-3636.

Zhu, C.J., a Jiang, W. (2005). Cell cycle-dependent translocation of PRC1 on the spindle by Kif4 is essential for midzone formation and cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 343-348.

Zhu, C.J., Lau, E., Schwarzenbacher, R., Bossy-Wetzel, E., a Jiang, W. (2006). Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6196-6201.

Zollner, G., Fickert, P., Fuchsbichler, A., Silbert, D., Wagner, M., Arbeiter, S., Gonzalez, F.J., Marschall, H.U., Zatloukal, K., Denk, H., *et al.* (2003). Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *Journal of Hepatology* 39, 480-488.

Další zdroje

URL1:

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx

URL2:

<http://www.uzis.cz/publikace/novotvary-2011>

URL3:

http://globocan.iarc.fr/old/bar_sex_site.asp?selection=22182&title=Ovary&statistic=2&populations=6&window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&submit=%C2%A0Execute

URL4:

www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor

URL5:

http://www.onkogynekologie.com/wp-content/uploads/2011/03/Guideline_C56_Epit_2013.pdf

URL6:

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000150991-UBC/tissue>

URL7:

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000196262-PPIA/tissue>

URL8:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000107331;r=9:137007213-137028922

URL9:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000107331;r=9:137007227-137028922;t=ENST00000487109