

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Lenka Pláničková

Vývoj a validace nové metodiky pro obohacení a detekci cirkulující nádorové DNA
u onkologických pacientů

Development and validation of a new method for enrichment and detection
of circulating tumor DNA in cancer patients

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Marek Minárik, Ph.D.

Praha, 2017

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, 14. 8. 2017

.....
Lenka Pláničková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Marku Minárikovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který věnoval této práci. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Lucii Benešové, Ph.D. za poskytnutou možnost vypracovat tuto práci v laboratořích Genomac a vedoucí laboratoří Bc. Barboře Belšánové za konzultace a vedení při zaučování laboratorních metod využívaných v této práci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za velkou podporu při vypracovávání této práce. Děkuji také ostatním kolegyním z laboratoří Genomac za podporu a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Tato práce vznikla za podpory MZ ČR jako součást grantových projektů AZV 15-27939 a AZV 17-30748A.

Abstrakt

Nádorová onemocnění jsou v celosvětovém měřítku jednou z nejčastějších příčin úmrtí, přičemž prognóza je obecně lepší, pokud je onemocnění diagnostikováno a léčeno včas. Protinádorová léčba je postupně posouvána od klasické chemoterapie s omezenou účinností a známými negativními vedlejšími účinky směrem k cílené biologické léčbě, která se používá, jsou-li zjištěny specifické genetické mutace. Součástí léčby nádorového onemocnění je také detekce následné progresy založená zejména na sledování nádorových biomarkerů. V současné době je stále více zkoumána možnost vyšetřování molekulárních markerů metodou tzv. tekuté biopsie, na kterou byla tato práce zaměřena.

Hlavním cílem práce byl experimentální vývoj a validace metody záchytu ctDNA ze vzorků krevní plazmy na základě detekce vybraných somatických mutací. Vývoj a optimalizace systému založeného na principu denaturační kapilární elektroforézy probíhaly na vzorcích pozitivních na mutace onkogenu *KRAS*, následně byla provedena klinická část výzkumu na pilotním souboru 21 vzorků krevní plazmy. Na závěr práce byla metoda optimalizována pro detekci markerů *BRAF* a *EGFR*. Dílčím cílem práce bylo ověření klinické využitelnosti zvýšením citlivosti detekce a tím i podílu záchytu pacientů v pokročilém stádiu onemocnění.

Výsledky práce naznačují možnost využití této metody v oblasti sledování léčby nejen pacientů s kolorektálním karcinomem či karcinomem plic, ale i pacientů s dalšími nádorovými onemocněními.

Klíčová slova

DNA mutace, *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, ctDNA, kolorektální karcinom, karcinom plic, mikropreparace, denaturační kapilární elektroforéza

Abstract

Tumors are one of the leading causes of death worldwide. Generally, the prognosis is better if the treatment begins at an early stage. Nowadays, the conventional chemotherapy treatment of cancer, known for its limited efficacy and side effects, is being gradually replaced by targeted biological treatment, which is used when specific genetic mutations are found. A part of the treatment is a detection of a potential progression, which is mainly based on the tumor biomarkers monitoring. Currently, further investigation of a so-called liquid biopsy method are ongoing, on which this thesis is focused.

The main aim of this work was the experimental development and validation of the method for detection of the ctDNA in the plasma samples based on the somatic mutations presence. For the development and optimization of the system on the principle of denaturation capillary electrophoresis, the samples of cancer patients with *KRAS* mutation were used. Subsequently, a clinical part of the research was performed on a pilot set of 21 plasma samples. Finally, the method was optimized for the detection of *BRAF* and *EGFR* markers. A partial objective was to improve the detection sensitivity and increase the capture of the ctDNA in patients with advanced stage of the disease.

The results of this work suggest the possibility of using this method for monitoring patients with not only colorectal or lung carcinoma, but other types of cancer as well.

Key words

DNA mutations, *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, ctDNA, colorectal cancer, lung cancer, micropreparation, denaturing capillary electrophoresis

Obsah

Seznam použitých zkratek	7
1. Úvod.....	9
2. Přehled literatury.....	10
2.1 Stručný úvod do molekulární patogeneze nádorových onemocnění.....	10
2.2 Signální dráhy a význam mutací onkogenů v solidních nádorech	11
2.2.1 MAPK signální dráha.....	11
2.2.2 MAPK/ERK signální dráha	12
2.3 Klinické využití molekulárních markerů	16
2.3.1 Klasifikace molekulárních markerů	17
2.4 Techniky vyšetřování molekulárních markerů.....	19
2.4.1 Analogové metody	20
2.4.2 Digitální metody	22
3. Cíle práce	24
4. Materiál a metody	25
4.1 Použité vzorky DNA	25
4.2 Použité chemikálie	27
4.3 Použité metody.....	28
4.3.1 PCR amplifikace I, PCR amplifikace II.....	28
4.3.2 Horizontální gelová elektroforéza v agarózovém gelu	32
4.3.3 Detekce DNA mutací pomocí metody DCE	33
4.3.4 Standardní DCE	34
4.3.5 Mikropreparativní DCE systém	35
4.3.6 Vyhodnocení dat	44
5. Výsledky	45
5.1 Optimalizace mikropreparativního DCE systému	45
5.2 Frakční kolekce	47

5.2.1	Kontaminace	49
5.2.2	Počet cyklů PCR amplifikace II.....	51
5.2.3	Kvantifikace	51
5.2.4	Klinická část výzkumu.....	54
5.2.5	Optimalizace dalších významných molekulárních markerů	56
6.	Diskuze	61
7.	Souhrn.....	67
8.	Seznam použité literatury	68

Seznam použitých zkratek

APC	Adenomatous polyposis coli gene
AS-PCR	Alelicky-specifická PCR
BRAF	Onkogen rodiny Raf
BRCA1/2	Gene „Breast Cancer“ 1/2
CE	Kapilární elektroforéza
COLD-PCR	Coamplification at lower denaturation temperature PCR
CtDNA	Cirkulující nádorová DNA
CRD	Cystein bohatá doména
DCE	Denaturační kapilární elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dPCR	Digitální PCR
EB	Ethidium bromid
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru
EGF	Epidermální růstový faktor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
E18	EGFR exon 18
E19	EGFR exon 19
E20	EGFR exon 20
E21	EGFR exon 21
FAM	Carboxyfluorescein
FAP	Familiální adenomová polypóza
FRET	Fluorescenční rezonanční přenos energie
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
G12A	Substituční mutace Gly12Ala
G12C	Substituční mutace Gly12Cys
G12D	Substituční mutace Gly12Asp
G12R	Substituční mutace Gly12Arg
G12S	Substituční mutace Gly12Ser
G12V	Substituční mutace Gly12Val
G13C	Substituční mutace Gly13Cys
G13D	Substituční mutace Gly13Asp
G79A	Substituční mutace Gly79Ala
HNPCC	Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
HT	Heteroduplexy
JNK	C-Jun N-terminal kinase
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L858R	Substituční mutace Lys858Arg
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MLH1	MutL homolog 1 gene
MSH2	MutS protein homolog 2 gene
MSH6	MutS protein homolog 6 gene
MUT DNA	Mutovaná DNA
NGS	Sekvenování nové generace
NK	Negativní kontrola

PCR	Polymerázová řetězová reakce
PK	Pozitivní kontrola
POP-4	Separáční polymer
POP-7	Separáční polymer
PPP	PCR Master Mix
qPCR	Kvantitativní PCR
RBD	Ras vazebn� doména
RTK	Receptorov� tyrozin-kinázy
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris/Borate/EDTA
TGF	Transformační r�stov� faktor
TNM	TNM klasifikace maligních nádorů
TP53	Tumor protein 53
V600E	Substituční mutace Glu600Gly
WT DNA	Wild Type DNA (nemutovan� forma DNA)

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou celosvětově považována za jednu z nejčastějších příčin úmrtí, přičemž nádorové onemocnění tlustého střeva a konečníku je řazeno na třetí místo, i přestože je-li tento typ nádorového onemocnění zaznamenán v časném stádiu, je dobře léčitelný. V současné době je za nejefektivnější léčbu považován chirurgický zákrok zaměřený na primární nádor často doprovázený chemoterapeutickou léčbou, nicméně i od té je vzhledem k negativním vedlejším účinkům ustupováno směrem k cílené léčbě biologické.

Podstata biologické léčby spočívá v blokaci konkrétní signální dráhy, v případě nádorového onemocnění tlustého střeva a konečníku se nejčastěji jedná o dráhu Epidermálního růstového faktoru (EGF). Zablokováním EGF-receptoru (EGFR) ligandem (nejčastěji monoklonální protilátkou) dochází k zamezení aktivace signálu vedoucímu k nekontrolovatelné buněčné proliferaci. Ve většině případů je léčba protilátkou anti-EGFR účinná, přibližně ve 40 % případů však účinná není. Jedna z možných příčin neúspěšné léčby spočívá v přítomnosti mutované formy onkogenu *KRAS* v nádorových buňkách (viz dále). Z tohoto důvodu jsou v současné době pacienti na tuto mutaci vyšetřováni a léčbu lze nasadit pouze u pacientů s nemutovanou (WT) formou onkogenu *KRAS*.

Vzhledem k riziku vzniku rezistence takto léčeného nádoru je důležité včasné rozpoznání progresu onemocnění, které se stává předmětem zájmu mnoha vědců po celém světě. Ideální kontrolou by byla často opakovaná tkáňová biopsie, která ale z důvodu zdravotního stavu pacienta není možná. Proto se dnes zkoumá možnost využití tzv. tekuté biopsie, využívající jako zdroj genetického materiálu fragmenty DNA uvolněné z nádoru do periferního oběhu pacienta. Tato metoda odběru biologického vzorku je oproti tkáňové biopsii méně invazivní. Záchyt cirkulující nádorové DNA se odvíjí od typu nádoru a stádia onemocnění, avšak zcela zásadní je citlivost použité metodiky. V současné době jsou k dispozici vysoce citlivé postupy, které se však vyznačují značnou finanční náročností. Z tohoto důvodu je vývoj nových citlivých a zároveň cenově dostupných metodik velmi žádoucí.

2. Přehled literatury

2.1 Stručný úvod do molekulární patogeneze nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění jsou charakterizována poruchou homeostázy, která je na molekulární úrovni způsobena poškozením genetické informace vedoucím k nefunkčnosti systémů zajišťujících kontrolovaný průběh dělení a růstu buněk (buněčné proliferace). Tato genetická poškození, obecně zahrnovaná pod termínem „mutace“, mohou vyřadit či jinak negativně ovlivnit funkci významných buněčných systémů. Mezi nejdůležitější patří kontrola buněčného cyklu, růstové signální dráhy, nebo řízené buněčné smrti (apoptóza). Poruchy těchto systémů vedou ke vzniku nádoru a jeho proliferaci (Hanahan & Weinberg, 2000; Erstad *et al.*, 2015), jejímž důsledkem je pronikání do okolních struktur s následnou migrací buněk a vytvářením vzdálených metastáz (Hanahan & Weinberg, 2000).

Genetické mutace lze rozdělit do skupin podle vzniku, rozsahu a dopadu na funkci buňky. Do první skupiny patří mutace zárodečné a somatické. Zárodečné mutace (přítomny v prvotním zárodku organismu) se vyskytují ve všech tělních i pohlavních buňkách, mohou se tak přenést i na potomky a jsou příčinou tzv. hereditárních nádorových syndromů (Lodish *et al.*, 2013). Mezi nejčastější dědičné syndromy patří hereditární syndrom karcinomu prsu a vaječníků zapříčiněný především zárodečnými mutacemi genů *BRCA1* a *BRCA2* (Krammer *et al.*, 2017), hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) označovaný jako tzv. Lynchův syndrom, způsobený nefunkčností systému DNA oprav (např. mutace genů *MLH1*, *MSH2* a *MSH6*) (Jun *et al.*, 2017) nebo familiální adenomová polypóza (FAP) vznikající v důsledku mutací genu *APC* (Adenomatous polyposis coli gene) (Li *et al.*, 2017). Na rozdíl od zárodečných mutací se mutace somatické vyskytují pouze v tělních nádorových buňkách. K těmto tzv. získaným mutacím tak dochází teprve v průběhu života a na jejich vzniku se významně podílí působení vnějších faktorů, např. ionizujícího záření či chemických karcinogenů (Lodish *et al.*, 2013). Z tohoto důvodu jsou somatické mutace často spojovány s rizikovými faktory (např. kouření, konzumace zpracovaného červeného masa, sluneční záření atd.) souvisejícími se životním stylem (Lodish *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015).

Podle rozsahu změny genetického kódu lze mutace rozdělit na chromozomální a bodové. Mezi mutace chromozomální patří změny počtu chromozomů (tzv. aneuploidie) nebo změny v úplnosti chromozomů (chromozomální delece, duplikace, translokace, inverze, atd.) (Lodish *et al.*, 2013). Chromozomální mutace jsou často nalézány u nádorů krve tvorných

buněk (leukemií), např. chronická myeloidní leukémie (Kanakasetty *et al.*, 2017). U solidních nádorů jsou naopak nejčastější mutace bodové, čítající záměny bází (substituce) či krátké inserce nebo delece několika málo bází (indels) (Stratton *et al.*, 2009).

Posledním hlediskem klasifikace mutací genetického kódu je konečný dopad na tvorbu proteinového produktu dělicí mutace na silent, missense a nonsense. Mezi tzv. silent neboli tiché mutace jsou řazeny záměny bází vedoucí k zařazení stejné aminokyseliny bez funkčního dopadu na proteinový produkt. Naopak podstata tzv. missense mutací spočívá v substituci bází, které vedou k zařazení jiné aminokyseliny a tím k funkční změně genového produktu. Poslední mutace této skupiny jsou tzv. nonsense mutace způsobené záměnou bází, které kódují STOP kodón předčasně ukončující translaci genového produktu, který tím svoji funkci ztrácí (Youn & Simon, 2011).

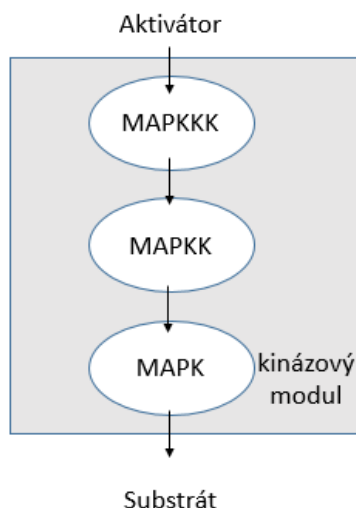
Jak bylo uvedeno výše, mutace způsobují v buňkách rozvrat homeostázy, především poruchy buněčné proliferace. K tomu dochází buď v důsledku patogenní aktivace genů, které proliferaci iniciují, nebo v důsledku patogenní inaktivace genů, které tuto proliferaci inhibují (Hanahan & Weinberg, 2000). V prvním případě hovoříme o tzv. protoonkogenech (mutačně aktivované formy označujeme termínem onkogeny) a v případě druhém o tzv. tumor-supresorových genech. Mezi protoonkogeny s nejčastějším výskytem mutačního postižení v nádorech patří například *KRAS*, *BRAF* a *EGFR* (viz dále). Mezi příklady nejčastěji mutovaných tumor-supresorů patří *TP53*, *APC* nebo *BRCA1* (Ding *et al.*, 2008; Erstad *et al.*, 2015).

2.2 Signální dráhy a význam mutací onkogenů v solidních nádorech

2.2.1 MAPK signální dráha

Všechny buňky mají vyvinuty účinné mechanismy tzv. buněčné signalizace, které umožňují buňkám komunikovat, udržet si stálé vnitřní prostředí a v neposlední řadě reagovat na podněty okolí přenosem signálu informačních molekul (proteiny) do jádra. Jak bylo uvedeno výše, genové mutace, v jejichž důsledku v buňce vznikají nefunkční proteinové produkty, vyřazují tyto systémy a ve svém důsledku vedou ke vzniku nádoru. Jedním ze signálních systémů, jejichž porucha byla dána do přímé souvislosti s buněčnou proliferací, je tzv. MAPK (Mitogen-activated protein kinase) signální dráha (Zhang & Liu, 2002; Martinelli *et al.*, 2017).

System MAP kináz lze definovat jako tříkinázový modul podílející se na tvorbě proteinové kaskády. K aktivaci první kinázy dochází malým GTP vazebným proteinem nebo přenosem fosfátové skupiny (tzv. fosforylace), každý další protein je pak aktivován fosforylací specifického motivu nadřazeným enzymem (Obrázek 1). Poslední kináza aktivuje substrát, kterým může být např. transkripční faktor, kináza či jiný protein (Widmann *et al.*, 1999).



Obrázek 1. Tříkinázový modul MAPK tvořící proteinovou kaskádu. Aktivátorem může být malý GTP vazebný protein nebo přenesená fosfátová skupina (proces fosforylace). Vzájemnou aktivací jednotlivých enzymů dochází k ovlivnění substrátu (transkripční faktory, proteiny, kinázy) a následnému vyvolání buněčné odpovědi (převzato a upraveno podle Widmann *et al.*, 1999). (MAPKKK: MAPK kináza kináza, MAPKK: MAPK kináza, MAPK: MAP kináza).

Enzymy rodiny MAPK jsou považovány za konzervované a jsou dále klasifikovány do tří hlavních skupin: ERK (Extracellular signal-regulated kinase), JNK (C-Jun N-terminal kinase) a p38 MAPK. Každá z výše uvedených drah se odlišuje regulačními procesy i aktivačními molekulami. Dráhy JNK (regulace transkripce) a p38 (regulace imunitních reakcí) reagují převážně na stresové molekuly a cytokiny, oproti tomu dráha ERK (kontrola buněčné proliferace) je spouštěna zejména růstovými faktory (Johnson & Lapadat, 2002). O této dráze bude podrobněji pojednáno v následující kapitole.

2.2.2 MAPK/ERK signální dráha

Signální dráha RAS-RAF-MEK-ERK, nazývaná také jako MAPK/ERK dráha, patří mezi nejlépe popsané MAPK dráhy. Pozornost je jí věnována neboť má zcela zásadní význam v procesu přenosu růstových signálů do jádra a tím představuje významný terapeutický cíl pro léčbu celé řady nádorových onemocnění.

První krok přenosu extracelulárního signálu do nitra buňky zahrnuje rozpoznání a vazbu informační molekuly receptorem nacházejícím se na buněčné membráně. Mezi

nejlépe charakterizované náleží rodina tzv. receptorů epidermálních růstových faktorů (EGFR), do které jsou řazeny receptorové tyrozin-kinázy (RTK) složené ze tří domén (extracelulární, membránová, intracelulární). Aktivačními signálními molekulami EGFR jsou zejména epidermální a růstové faktory (Epidermal growth factor, EGF; Transforming growth factor, TGF), jejichž vazba k extracelulární doméně vyvolá dimerizaci monomerních membránových proteinů s následnou autofosforylací cytoplasmatických částí vedoucí ke zvýšení tyrozin-kinázové aktivity. Fosforylované aminokyselinové zbytky (serin, tyrozin) jsou následně rozpoznány tzv. adaptorovými proteiny (např. Growth factor receptor-bound protein 2, Grb2), které se v neaktivní formě nachází volně v cytoplasmě v komplexu s tzv. GEF (Guanine nucleotid Exchange factor). Vazbou růstového faktoru je komplex Grb2-GEF aktivován a transportován na cytoplasmatickou membránu, kam je následně přivolána další molekula proteinové povahy – Ras protein (Franklin *et al.*, 2002; Zhang & Liu, 2002).

Proteiny rodiny Ras jsou klasifikovány jako tzv. GTPázy (Guanosin-5-trifosfatázy) vyznačující se vlastní GTPázovou aktivitou, jejichž úloha spolu s přispěním pozitivních a negativních zpětných vazeb spočívá zejména v integraci velkého množství signálů v buňce (Nakamura *et al.*, 2016). Po přenosu proteinu k cytoplasmatické membráně je navázán tzv. prenylační řetězec (složený z 15 uhlíků), protein se tak stává hydrofobnějším a je k membráně vázán s vyšší afinitou (Jansen *et al.*, 2017). Samotná aktivace Ras proteinu však spočívá v interakci s komplexem Grb2-GEF, přičemž katalytická aktivita GEF způsobí výměnu GTP za GDP a tím i aktivaci Ras proteinu (Martinelli *et al.*, 2017). Aktivované formy proteinu se pak váží s vyšší vazebnou afinitou k terminální části regulační domény Raf proteinu (MAPKKK) (Widmann *et al.*, 1999) a tím připojí inaktivní protein k plasmatické membráně (Yan *et al.*, 1998).

Skupina Raf kináz zahrnuje tři serin/threoninové protein-kinázy (A-Raf, B-Raf, C-Raf), přičemž pouze B-Raf je prokazatelně schopna aktivovat efektorový protein (Hu *et al.*, 2013). Aby mohla být efektorová molekula ovlivněna, je zapotřebí Raf protein nejprve aktivovat souborem dějů zahrnujících vazbu aktivní formy Ras proteinu do Ras vazebné domény (Ras-binding domain, RBD) nacházející se na N-konci regulační domény Raf proteinu. Vyvolaná sekundární interakce s doménou bohatou na cystein (Cystein-rich domain, CRD) je na Ras GTP statusu nezávislá (Wellbrock *et al.*, 2004). Vazba aktivní formy Ras proteinu způsobí dimerizaci kinázové domény a vazbu dalších proteinových molekul vedoucích k prostorovým změnám, kterými se Raf protein stává přístupnější fosforylaci a tím i aktivaci (Fabian *et al.*, 1993). Aktivní protein-kináza Raf následně přenáší signál skrze

fosforylaci dvou serinových aminokyselinových zbytků nacházejících se v aktivní doméně proteinu úrovně MAPKK (Martinelli *et al.*, 2017).

Jediným prokazatelným efektorovým enzymem protein-kinázy Raf je kináza MEK1/2 (Wellbrock *et al.*, 2004). Tento protein má opět funkci specifické kinázy, která fosforylaci threonin/tyrozinových zbytků aktivuje kinázu MAPK (v tomto případě ERK1/2) (Wellbrock *et al.*, 2004). Protein-kináza ERK zastává roli kontrolního bodu buněčného cyklu, ve své aktivované formě je přenesena do jádra, kde fosforylaci transkripčních faktorů vyvolá buněčnou reakci (Zhang & Liu, 2002; Haigis *et al.*, 2008).

V další části této práce budou popsány tři protoonkogeny (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*), které jsou důležitými komponentami výše zmíněné signální dráhy.

2.2.2.1 Protoonkogen *EGFR*

Jak vyplývá z výše uvedeného popisu MAPK/ERK dráhy, gen *EGFR* kóduje funkční receptorový RTK protein. Lokalizace receptoru byla popsána již v roce 1984, kdy byla zaznamenána nadměrná exprese genu u pacientů s nádorovým onemocněním plic (Hendler & Ozanne, 1984), dalším pokrokem se stal objev aktivační mutace genu kódujícího kinázovou doménu receptoru (Pao *et al.*, 2005).

Jak bylo popsáno dříve (Kapitola 2.2.2 MAPK/ERK signální dráha), v normálně fungujících buňkách je aktivace *EGFR* závislá na autofosforylaci vyvolané dimerizací membránových EGF-receptorů a následně zprostředkované intracelulárními doménami. Současně se ukazuje, že kinetika autofosforylace je podpořena prostorovou změnou vazebného místa v důsledku přítomnosti mutace v tyrozin-kinázové doméně, která vede k výraznému zvýšení afinity vazby ATP. Podstata terapií tak spočívá v inhibici této autofosforylace blokadou vazebného místa a její efekt je tak u buněk nesoucích mutovanou variantu genu přirozeně nejvyšší (Ercan *et al.*, 2015).

Aktivační mutace genu *EGFR* je zaznamenána u 30–50 % případů diagnostikovaného karcinomu plic (Kato *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2016), mezi nejčastější poškození je řazena deleční mutace vyskytující se v exonu 19 (E19, 45 %) a substituční mutace L858R (záměna argininu za leucin) nacházející se v exonu 21 (E21, 40 %) (Kim *et al.*, 2015a; Jin *et al.*, 2016). Vzácněji lze zaznamenat přítomnost substituce G79A (záměna alaninu za glycin) v exonu 18 (E18) nebo inzerci či delecii v exonu 20 (E20) (Kato *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015a).

I přes počáteční úspěšnou léčbu je u pacientů často pozorován vznik sekundární rezistence charakterizované progresí onemocnění následující po úvodní dobré odpovědi na léčbu. Příčinami může být nejen nadměrná exprese RTK, ale také výskyt dalších

(tzv. rezistentních) mutací. V případě anti-EGFR léčby kolorektálního karcinomu založené na blokaci extracelulární domény monoklonálními protilátkami je rezistence nejčastěji způsobena mutací v genech *KRAS*, *BRAF* atd., viz dále (Martinelli *et al.*, 2017). U anti-EGFR terapie karcinomu plic založené na blokaci intracelulární domény receptoru se nejčastěji jedná o rezistenci v důsledku přítomnosti tzv. sekundární *EGFR* mutace T790M (Yun *et al.*, 2008).

2.2.2.2 Protoonkogen *KRAS*

Jak již bylo uvedeno výše, protoonkogen *KRAS* je jedním z nejvýznamnějších přenašečů růstových signálů. Poškozením v oblastech regulujících enzymatickou aktivitu proteinu je vyvolána tvorba funkčně pozměněného produktu, který vytváří prostorovou překážku bránící hydrolýze GTP a tím návratu molekuly do inaktivního stavu. Mutací tak dochází k trvalé aktivaci signální kaskády nezávisle na nadřazených spouštěcích mechanismech (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2013).

Mutovaná forma *KRAS* genu je detekovatelná u většiny solidních nádorů, velmi častá je např. u karcinomů tlustého střeva a konečníku (Palomba *et al.*, 2012). U tohoto onemocnění představuje jeden ze základních faktorů přeměny zdravého epitelu přes mezistádium kolorektálního adenomu (forma benigního nádorového polypu tlustého střeva) až po vznik invazivního nádoru (Andreyev *et al.*, 2001).

Nejčastěji jsou bodové mutace lokalizované v exonech 2, 3 a 4 (Andreyev *et al.*, 2001), konkrétně v kodónu 12 (73 %) a 13 (20 %), méně často pak v kodónech 61 nebo 146 (7 %) (De Roock *et al.*, 2010; Palomba *et al.*, 2012), výjimečně jsou zaznamenány i dvojité mutace (De Roock *et al.*; 2010; Piton *et al.*, 2015). Z hlediska mutačních typů jsou nejčastější mutace substituční, zejména G12D a G13D (záměna kyseliny asparagové za glycin v kodónu 12 resp. 13), G12V (záměna valinu za glycin v kodónu 12) (Bazan *et al.*, 2005; Kuo *et al.*, 2014) nebo G12C (substituce cysteinu za glycin v kodónu 12) (COSMIC: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue>). Některé mutace bývají spojovány s agresivnějším průběhem onemocnění, např. mutace G12V je spolu s věkem a stádiem onemocnění považována za rizikový faktor a je spojována s relapsy či úmrtím (Andreyev *et al.*, 2001).

Mutovaný onkogen *KRAS* lze často detekovat i u dalších solidních nádorů. V případě adenokarcinomu plic náleží mezi nejčastější mutace substituční záměny G12C, G12V a G12D (Fiala *et al.*, 2013), u karcinomu pankreatu se jedná o mutace G12D, G12V a G12R (substituční záměna argininu za glycin v kodónu 12) (Gibbs *et al.*, 1984; COSMIC: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue>). Jak lze vyvodit z výše uvedeného přehledu,

nejčastějšími mutacemi (napříč různými onemocněními) jsou záměny valinu, resp. kyseliny asparagové, za glycin (G12V resp. G12D) (Capella *et al.*, 1991). Tato dvě poškození genetické informace se mohou (spolu s dalšími) vyskytovat také u nádorového onemocnění děložního čípku, endometria, trávicího traktu a tenkého střeva (COSMIC: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue>).

2.2.2.3 Protoonkogen *BRAF*

Jak již bylo zmíněno dříve, do rodiny Raf proteinů náleží tři protein-kinázy, přímá spojitost s nádorovým onemocněním však byla prokázána pouze u protein-kinázy B-Raf (Wellbrock *et al.*, 2004). Tento enzym byl poprvé popsán na myším modelu v roce 1983, lidské homology byly charakterizovány později (Rapp *et al.*, 1983). V roce 1984 byla prokázána serin/threonin kinázová aktivita onkoproteinů (Moelling *et al.*, 1984) a v současné době představuje onkogen *BRAF* cíl biologické léčby.

Nejčastější mutací onkogenu *BRAF* je substituční záměna kyseliny glutamové za glycin označovaná jako V600E (Di Nicolantonio *et al.*, 2008). Mutace onkogenu *BRAF* byla identifikována přibližně u 8 % všech nádorových onemocnění, nejčastěji se vyskytuje u nádorového onemocnění kůže (maligní melanom) (Davies *et al.*, 2002). V případě kolorektálního karcinomu byla nemutovaná forma onkogenu *KRAS* potvrzena u 99 % vzorků s potvrzenou mutací protoonkogenu *BRAF*. Z tohoto zjištění vyplývá vzájemné vyloučení přítomnosti mutací onkogenu *KRAS* a *BRAF* v jednom vzorku (De Roock *et al.*, 2010).

2.3 Klinické využití molekulárních markerů

Klasifikace nádorového onemocnění je založena na posouzení lokalizace nádoru, pronikání nádoru do okolních tkáňových struktur, zasažení místních i vzdálených uzlin a přítomnosti vzdálených metastáz. Nejčastěji využívaný systém TNM (Tumor, Node, Metastasis) dělí nádorová onemocnění do stádií I – IV. Stádia I a II jsou považována za relativně časná, bez invaze nádoru do uzlin či dalších orgánů. Zatímco relativně pokročilá stádia III a IV se vyznačují výskytem metastáz v uzlinách a jiných orgánech. (Greene *et al.*, 2002; Akkoca *et al.*, 2014). Zahájení léčby v časnějších stádiích onemocnění je spojováno s lepší prognózou a delším přežitím. V případě většiny solidních nádorů je vždy nejprve zvažována možnost chirurgického zákroku často následovaná radio- či chemoterapeutickou léčbou (Tong *et al.*, 2017). V případě, že stádium onemocnění či stav pacienta chirurgickou léčbu neumožňují, je zvolen jiný způsob včetně radioterapie nebo chemoterapie. Stále více je také nasazována biologická léčba, která je na rozdíl od chemoterapie založena na cíleném zásahu opravujícím nebo posilujícím imunitní systém (Vogel *et al.*, 2017).

V oblasti diagnostiky nádorového onemocnění jsou somatické mutace používány k odlišení maligních stavů. Jako příklad lze uvést mutace onkogeneun *KRAS* u onemocnění pankreatu, na základě jejíž přítomnosti je možné rozlišit zhoubné nádorové bujení od chronického zánětu (tzv. pankreatitidy), neboť tento marker se u pacientů se zánětem nevyskytuje (Salek *et al.*, 2007; Ginestà *et al.*, 2013).

Jak bylo popsáno výše, molekulární markery jsou nejčastěji využívány v terapeutické oblasti jako prediktory odpovědi na biologickou léčbu, s čímž také souvisí časný záchyt recidivy (návratu) či progresu (postupu) onemocnění (Yiu & Yiu, 2016; Trojan *et al.*, 2017). Dále mohou být molekulární markery využity k určení molekulárního podtypu nádoru. Jako příklad lze uvést mutace onkogenů *KRAS* a *BRAF*, které se liší podle svého umístění a mají vliv na prognózu přežití pacienta. Např. v proximální (pravé) části tlustého střeva častěji vznikají mutace onkogenu *BRAF*, které oproti mutacím onkogenu *KRAS*, které se častěji vyskytují v distální (levé části), vznikají jiným mechanismem a jsou spojovány s horší prognózou onemocnění (Minarikova *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016).

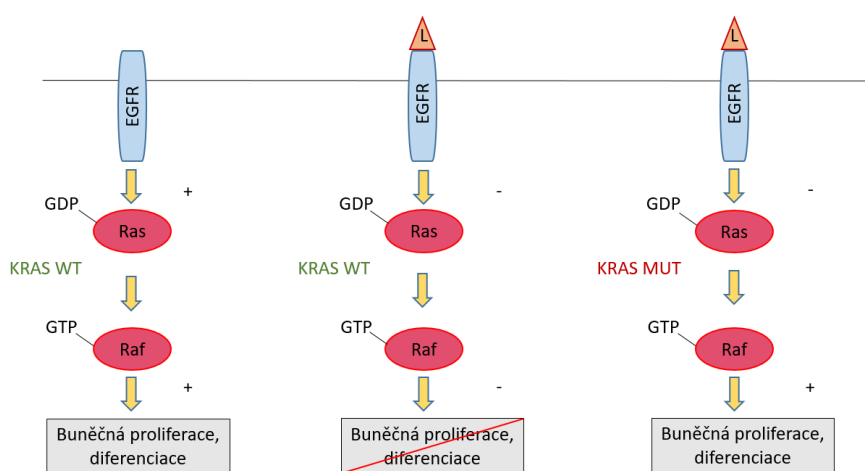
2.3.1 Klasifikace molekulárních markerů

Molekulární markery lze podle využití klasifikovat na markery prognostické a prediktivní. První soubor zahrnuje prognostické markery (určení prognózy) umožňující přesnější odhad progresu onemocnění a času přežití pacienta (Febbo *et al.*, 2011). Do této skupiny lze zařadit např. onkogeny *KRAS* a *BRAF*, přičemž oba geny jsou považovány za negativní prognostické markery, neboť jsou spojovány s kratší dobou přežití pacientů s mutací. V případě protoonkogenu *BRAF* se jedná např. o mutaci V600E (Di Nicolantonio *et al.*, 2008), v případě mutace onkogenu *KRAS* je známo celkem 8 nejčastějších mutací s prokázaným negativním vlivem na délku života pacienta. V případě tohoto markeru je riziko úmrtí vyšší až o 26 % (Andreyev *et al.*, 2001; Richman *et al.*, 2009). Oproti tomu u nádorového onemocnění slinivky nebyla prognostická hodnota onkogenu *KRAS* zaznamenána (Salek *et al.*, 2009).

Druhý soubor představují prediktivní markery (tzv. prediktory) předpovídající odezvu na léčbu, které lze dále rozdělit na pozitivní prediktory (pacienti s danou mutací na léčbu reagují) a negativní prediktory (pacienti s mutací na léčbu nereagují) (Febbo *et al.*, 2011). Jako příklad lze opět uvést onkogen *KRAS*, který je v případě nádorového onemocnění tlustého střeva a konečníku považován za negativní prediktivní marker (Amado *et al.*, 2008). Obdobně i mutace onkogenu *BRAF* je u tohoto onemocnění spojována s negativní odpovědí na biologickou léčbu monoklonálními protilátkami (Di Nicolantonio *et al.*, 2008).

Naopak v případech onemocnění maligním melanomem na léčbu reagují pacienti s mutovanou formou genu a u pacientů bez mutace není efekt pozorován (Chapman *et al.*, 2011).

Ve spojitosti s nádorovým onemocněním tlustého střeva a konečníku je v současné době nejvíce zkoumán onkogen *KRAS*, neboť představuje slibný cíl biologické léčby (Taly *et al.*, 2013), která je předepisována pouze pacientům s nemutovanou formou genu (Obrázek 2) (De Roock *et al.*, 2010). Ze všech pacientů, kteří na terapii (monoklonální protilátky cetuximab, panitumumab) nereagují je mutace onkogenu *KRAS* přítomna pouze u 30–40 % případů. Pacienti s nemutovanou formou genu mají pravděpodobně přítomno genetické poškození jiných částí signální dráhy.



Obrázek 2. Schematické zobrazení signální dráhy RAS při podání biologické léčby. Levé schéma znázorňuje plně funkční MAPK/ERK signální dráhu s nemutovanou formou genu *KRAS*, prostřední dráha s nemutovaným genem *KRAS* zachycuje účinnou biologickou léčbu prostřednictvím vazby monoklonální protilátky k EGF-receptoru s následným zabráněním buněčné proliferace a diferenciaci. Na posledním schématu je naznačena neúčinnost biologické léčby vazbou monoklonální protilátky k receptoru v přítomnosti mutované formy onkogenu *KRAS*. (L: ligand, *EGFR*: Receptor epidermálního růstového faktoru)

Jak vyplývá z výše uvedeného přehledu, skupiny molekulárních markerů se vzájemně prolínají a jsou v současné době důkladně zkoumány. Další kapitola bude věnována cirkulující nádorové DNA, která představuje významný molekulární marker zjistitelný z krevního vzorku pacienta.

2.3.1.1 Cirkulující nádorová DNA

Cirkulující nádorová DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) představuje speciální marker prezentující zdravotní stav jedince na molekulární úrovni (obsahující mutace primárního nádoru i metastáz) (Benesova *et al.*, 2013), jehož potenciál vede v několika posledních letech k výraznému rozvoji metod umožňujících jeho detekci. Prvním krokem analýzy ctDNA z krevní plazmy pacienta je izolace DNA, ze které mohou být následně

genetické markery zjišťovány dvěma možnými způsoby. První variantu představuje identifikace genetické změny v primárním nádoru s následným nalezením téže mutace v krevním vzorku (Taly *et al.*, 2013). Následným rozšířením je pak kvantifikační analýza podávající informaci o relativních změnách hladin ctDNA mezi dvěma vyšetřeními. Podle literatury jsou nejčastěji zjištěnými mutacemi jednonukleotidové substituce a deleční či inzerční mutace (Benesova *et al.*, 2013).

K uvolnění fragmentů DNA do krevního oběhu dochází apoptotickými a nekrotickými procesy, fragmenty jsou následně pohlceny fagocytujícími buňkami (tzv. makrofágy), kterými jsou pak uvolňovány do periferního oběhu. Principy uvolnění DNA do krve vysvětlují pozorovanou přítomnost nenádorové DNA v malém množství i u zdravých jedinců (Jahr *et al.*, 2001; Diehl *et al.*, 2005). U pacientů je zvýšené množství ctDNA vysvětlováno vyšším stupněm nekrotických procesů (Benesova *et al.*, 2013), nejvíce cirkulující DNA bylo prokázáno u jedinců s přítomnými metastázemi (Leon *et al.*, 1977; Fournié *et al.*, 1995). Konkrétní výsledky uvádějí průměrnou koncentraci zachycené ctDNA 219 ng/ml (rozmezí 10–1200 ng/ml) (Jahr *et al.*, 2001). Jak naznačuje uvedené rozmezí, detekovat genetické změny lze i z původně malého množství DNA (Taly *et al.*, 2013). Cirkulující nádorová DNA může být také považována za prognostický marker, neboť u pacientů po operaci s velkým množstvím detekované ctDNA bylo zaznamenáno úmrtí do 5 let (Bedin *et al.*, 2017).

V předchozích kapitolách byla opakovaně zmíněna metoda vyšetřování ctDNA z krevního vzorku (tekutá biopsie, liquid biopsy), která představuje alternativní způsob odběru biologického materiálu překonávající omezení opakovaných tkáňových biopsií (např. finanční nákladnost, časová náročnost, invazivní podstata metody atd.) (Murtaza *et al.*, 2013; Taly *et al.*, 2013). Využita může být ke sledování recidivy a progresu onemocnění či dynamického nástupu sekundární rezistence nádorových buněk (léková rezistence) (Murtaza *et al.*, 2013; Vojtechova *et al.*, 2016; Trojan *et al.*, 2017).

2.4 Techniky vyšetřování molekulárních markerů

Metody využívané k detekci genetických změn lze rozdělit podle typu vyšetřovaného markeru např. na metody cytogenetické nebo molekulárně-genetické, které jsou nejčastěji používány za účelem analýzy somatických mutací v solidních nádorech (analýza DNA). Dále lze metody rozdělit na techniky kvantitativní a kvalitativní nebo analogové či digitální. V další části literárního přehledu budou stručně uvedeny významné metodické přístupy podle dělení na techniky analogové a digitální.

Mezi analogové metody lze zařadit přístupy založené na bázi kvantitativní PCR (Quantitative PCR, qPCR), do kterých jsou dále zahrnovány postupy fungující na principu obohacení mutantní frakce (charakterizace odlišnou denaturační teplotou v průběhu PCR amplifikace) či techniky fungující na bázi kapilární elektroforézy (Capillary electrophoresis, CE). Oproti metodám analogovým se metody digitální vyznačují schopností detekce přítomné mutace pouze z jediné molekuly. Do těchto metod lze zařadit techniky sekvenování nové generace (Next-generation sequencing, NGS), případně digitální PCR (Digital PCR, dPCR).

2.4.1 Analogové metody

2.4.1.1 Metody kvantitativní PCR

Metody kvantitativní PCR (resp. real-time PCR) jsou založeny na principu klasické PCR amplifikační reakce, během které je navíc v každém cyklu zaznamenáván nárůst fluorescenčního signálu (Hindson *et al.*, 2011). Zdrojem fluorescence bývají zpravidla interkalační barviva (např. Ethidium Bromid či SYBRGreen). V pokročilejších systémech to pak jsou fluorescenčně značené sondy (např. Molecular Beacons, TaqMan sondy, Scorpion sondy, FRET sondy atd.) (Navarro *et al.*, 2015).

Výhodami metod na bázi real-time PCR jsou zejména minimalizace rizika kontaminace a tzv. multiplexování (amplifikace referenčního i cílového genu v jedné reakci) (Heid *et al.*, 1996; Timofeeva *et al.*, 2009). Díky tomu poskytuje metoda vysoce přesná data nejen kvantitativní, ale i kvalitativní povahy, a může být použita i k detekci neznámých sekvencí (zejména TaqMan sondy) (White *et al.*, 2009).

Alelicky-specifická PCR

AS-PCR (Allele-specific PCR) je řazena mezi metody využívané k detekci mutací běžných, vzácných, ale zejména mutací vyskytujících se ve vzorku v nízkém zastoupení (Lang *et al.*, 2011). Princip metody spočívá v komplementaritě 3' konce navrženého PCR primeru pouze k jedné alelické variantě, čímž dochází k amplifikaci mutovaných fragmentů DNA (Darawi *et al.*, 2013).

Citlivost AS-PCR je zaznamenána na úrovni 0,1–1 % mutantních fragmentů (Fox *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 2011) a proto je považována za spolehlivou a přesnou metodu (Fox *et al.*, 1998).

COLD-PCR

Metody, využívající obohacení mutantních frakcí, zahrnují postupy sloužící ke stanovení přítomné mutace zastoupené v malém množství. Tento přístup je založen na rozdílné denaturační teplotě sekvencí obsahujících mutace (nižší denaturační teplota)

a sekvencí bez mutací (vyšší denaturační teplota), čímž dochází k přednostní amplifikaci mutovaných fragmentů (Li *et al.*, 2008). Další možnost pak představují blokační sekvence, jejichž vazba způsobí selektivní inhibici WT (Wild Type) molekul DNA a tím přednostní amplifikaci molekul mutovaných (Milbury *et al.*, 2011; Castellanos-Rizaldos *et al.*, 2014).

Metody COLD-PCR (Coamplification at lower denaturation temperature PCR), založené na principu obohacení mutovaných frakcí, mohou být využity ve třech obměnách: Fast, Full a Ice. Full varianta je charakterizována obohacením všech přítomných mutací, oproti tomu Fast COLD-PCR vede k obohacení pouze mutace s nižší denaturační teplotou v porovnání s teplotou WT sekvence. Třetí možnost představuje Ice metoda odpovídající Full obměně s přidáním oligosekvencí určující efektivitu reakce při nízkém zastoupení mutantních forem (Li *et al.*, 2008).

Nevýhodami metod COLD-PCR jsou přesná kontrola denaturační teploty a potřeba kratších sekvencí (méně, než 200 bp), výhodami jsou naopak jednoduché provedení bez nutnosti specifických průb, primerů či enzymů (Li *et al.*, 2008). Citlivost metod COLD-PCR s detekční hladinou 0,01 % mutovaných fragmentů je přirovnána na úroveň citlivosti digitální PCR (How-Kit *et al.*, 2014; Sefrioui *et al.*, 2017).

CE

Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis, CE) je řazena mezi metody sloužící k oddělení látek (např. bílkoviny, nukleové kyseliny atd.) na základě elektrického náboje, velikosti molekul a s tím související rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli (Durney *et al.*, 2015). V případě CE je oddělení molekul prováděno uvnitř křemenné kapiláry naplněné polyakrylamidovým gelem tvořícím síto, kterým se analyzované látky pohybují. (Li *et al.*, 2014).

Oproti klasické kapilární elektroforéze je vzorek během analýzy tzv. denaturační kapilární elektroforézou (Denaturing capillary electrophoresis, DCE) vystaven denaturačnímu činidlu a/nebo teplotě, díky čemuž dochází k postupnému rozevírání řetězců DNA molekul a jejich následnému zpomalování při pohybu kapilárou. (Bjørheim & Ekstrøm, 2005).

Během posledních dvou desetiletí vzrůstá zájem o miniaturizovaná průtoková analyzační zařízení (tzv. kapilární elektroforéza na čipu), která bývají využita nejen pro analýzu nukleových kyselin, ale také např. aminokyselin a proteinů (Kaneda *et al.*, 2011).

2.4.2 Digitální metody

2.4.2.1 NGS

Dalšími metodami zjišťování somatických mutací jsou sekvenační postupy. Oproti první generaci sekvenačních technologií (detekce jedné DNA báze po druhé) umožňují metody sekvenování nové generace (Next-generation sequencing, NGS) rychlou produkci velkého množství osekvenovaných vzorků najednou a to díky paralelním reakcím umožňujícím sekvenaci tisíců až milionů vzorků současně. Pro metody NGS dnes existuje celá řada různých technologií, nicméně pro všechny platí společné kroky analýzy – tvorba sekvenační knihovny, samotné sekvenování a analýza dat. Technologie NGS lze dále rozdělit na metodiky využívající PCR amplifikaci DNA templátu (Roche, Illumina, Ion Torrent) a na postupy založené na sekvenaci jediné molekuly (HeliScope, PacBio (SMRT System), Oxford Nanopore) (Koubková *et al.*, 2014).

NGS metody umožňují tzv. hloubkové sekvenování, které představuje možnost zvýšení citlivosti metod (vyšším počtem čtení) a s tím související záchyt malého množství DNA mutovaných sekvencí v analyzovaném vzorku. Hloubkovým sekvenováním lze identifikovat např. ctDNA, tedy diagnostické a prognostické markery ze vzorků krevní plazmy pacientů (Kim *et al.*, 2015b). Další z aplikací NGS je tzv. exomové sekvenování (sekvenování všech kódujících oblastí) jehož přínos spočívá v objevu genů podílejících se na dědičných onemocněních, somatických mutací spojených s nádorovým onemocněním (Choi *et al.*, 2009) a také např. mutací využitelných v oblasti personalizované medicíny (Lonigro *et al.*, 2011).

2.4.2.2 Digitální PCR

Poslední zde uvedenou metodu představuje digitální PCR (Digital PCR, dPCR). Tato molekulárně diagnostická metoda byla poprvé popsána v roce 1999 (Vogelstein & Kinzler, 1999). Prováděna je paralelně ve stovkách až tisících miniaturních reaktorech najednou, kdy v každém reaktoru jsou všechna PCR činidla a fluorescenčně značené sondy (např. TaqMan) smíchány s vysoce naředěnou DNA tak, aby v každé reakci byla přítomna ideálně právě jedna molekula DNA templátu (Taly *et al.*, 2013). Po provedené amplifikaci je pak zjišťována přítomnost produktu v každé z paralelních reakčních směsí, přičemž pozitivní počet reakcí odráží původní množství templátových molekul DNA (Hindson *et al.*, 2011).

Digitální PCR nachází uplatnění v detekci somatických mutací, kde vykazuje citlivosti až na úrovni 0,01 % mutovaných alel. Z tohoto důvodu bývá stále častěji využívána pro detekci ctDNA z periferní krve pacienta (Taly *et al.*, 2013).

Výše popsané metody stanovování mutací se staly standardem pro vyšetření tkání, kde typická citlivost 1 % je dostačující pro bezpečné odhalení mutace. Nároky na citlivost detekčních metod se však, především v souvislosti s rozmachem využití ctDNA (viz Kapitola 2.3.1.1), stále zvyšují. Záměrem předkládané práce proto bylo vyvinutí metodiky vedoucí ke zvýšení citlivosti detekce a záchytu volné nádorové DNA u pacientů s pokročilým stádiem nádorového onemocnění tlustého střeva a konečníku a její praktické využití.

3. Cíle práce

- Experimentální vývoj a validace metody pro obohacení mutantních alel pro následnou detekci somatických mutací.
 - Zvýšení citlivosti detekce mutací, ukázáno na příkladu protoonkogenu *KRAS*.
- Zvýšení zachytu ctDNA u onkologických pacientů.
- Potvrzení přínosu metody na příkladu vyšetření dalších molekulárních markerů.

4. Materiál a metody

4.1 Použité vzorky DNA

Vzorky použité pro výzkum byly získány od pacientů s nádorovým onemocněním (nádorové onemocnění tlustého střeva a konečníku, nádorové onemocnění plic) ve III. nebo IV. stádiu onemocnění tkáňovými biopsiemi, cytologickými stěry a krevními odběry. Experimentální vývoj DCE (denaturační kapilární elektroforéza) systému s frakčním kolektorem byl proveden na uměle vytvořeném mutačním PCR standardu z tkáňové biopsie pacientů s potvrzenou *KRAS* mutací. Absolutní kvantifikace byla provedena na vzorcích genomické DNA s prokázanou *KRAS* mutací resp. na DNA standardu *KRAS* G12D (Horizon Discovery, Cambridge, UK). V případě optimalizace separační teploty dalších významných onkogenetických markerů byly využity vzorky tkáňové biopsie (protoonkogen *BRAF*), cytologického nátěru (protoonkogen *EGFR*- deleční mutace E19) či DNA standard *EGFR* L858R (protoonkogen *EGFR*- substituční mutace E21; Horizon Discovery, Cambridge, UK). Klinická část výzkumu byla provedena na vzorcích krevní plazmy pacientů s klinicky ověřeným onemocněním. DNA vzorky použité během výzkumu jsou uvedeny v Tabulce 1.

Všichni pacienti před odběrem vzorků poskytli informovaný souhlas s využitím biologického materiálu pro výzkumné účely a u všech vzorků byla již dříve potvrzena přítomnost dané mutace ve vzorku tkáně. Všechny použité vzorky pocházely z předchozích projektů klinického výzkumu řešených v rámci podpory Ministerstva Zdravotnictví ČR.

Za účelem provedení mutační analýzy ctDNA byly použity vzorky krevní plazmy získané z 8 ml nesrážlivé krve, vzorky byly následně ve zmrazeném stavu převezeny do laboratoře. CtDNA byla v laboratoři získána podle dříve popsaného postupu (Levy *et al.*, 2012) a následně byla poskytnuta k dalšímu zpracování.

Tabulka 1. Použité vzorky DNA

Vzorek	Pohlaví pacienta	Diagnóza	Stádium	Marker	Mutace	Poznámka
1	-	KRK	-	<i>KRAS</i>	G12V	TB
2	Ž	KRK	IIA	<i>KRAS</i>	G12D	TB
3	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12D/G13D	P
4	Ž	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12D/G13D	P
5	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G13D	P
6	Ž	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12V	P
7	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	-	P
8	Ž	KRK	IV	<i>KRAS</i>	-	P
9	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12D	P
10	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	-	P
11	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G13D	P
12	Ž	KRK	IV	<i>KRAS</i>	-	P
13	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12V	P
14	Ž	KRK	III	<i>KRAS</i>	G12V	P
15	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12S	P*
16	Ž	KRK	IV	<i>KRAS</i>	-	P
17	M	KRK	-	<i>KRAS</i>	G12V	P
18	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12D	P
19	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12V	P
20	M	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12R	P
21	M	KRK	III	<i>KRAS</i>	G13D	P
22	Ž	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12D	P
23	Ž	KRK	-	<i>BRAF</i>	-	TB, P
24	Ž	KRK	-	<i>BRAF</i>	-	P
25	Ž	KP	IV	<i>EGFR</i>	E19	CS
26	Ž	KP	IV	<i>EGFR</i>	E19	P
27	Ž	KP	IV	<i>EGFR</i>	E19	P
28	Ž	KP	IV	<i>EGFR</i>	E19	P
29	M	KP	IV	<i>EGFR</i>	E19	P
30	M	KP	IV	<i>EGFR</i>	E19	P
31	M	KP	IV	<i>EGFR</i>	E21	P
32	M	KP	IV	<i>EGFR</i>	E21	P
33	Ž	KRK	IV	<i>KRAS</i>	G12D	DNA standard- SW48 (Horizon Discovery, Cambridge, UK)
34	Ž	KRK	IV	<i>KRAS</i>	WT	DNA standard- SW48 (Horizon Discovery, Cambridge, UK)
35	-	-	-	<i>EGFR</i>	L858R	DNA standard (Horizon Discovery, Cambridge, UK)

(Pomlčka: údaje nejsou k dispozici, KRK: kolorektální karcinom, KP: karcinom plic, *KRAS*: Homolog onkogenu Kirsten rat sarcoma viru, *BRAF*: Onkogen rodiny Raf, *EGFR*: Receptor pro epidermální růstový faktor, G12V: substituční mutace Gly12Val, G12D: substituční mutace Gly12Asp, G13D: substituční mutace Gly13Asp, G12S: substituční mutace Gly12Ser, G12R: substituční mutace Gly12Arg, E19: deleční mutace v exonu 19, E21: substituční mutace v exonu 21, TB: tkáňová biopsie, P: krevní plazma, P*: více odběrů krevní plazmy, CS: cytologický stěr, SW48: buněčná linie, WT: Wild Type, nemutovaná forma DNA, L858R: substituční mutace Lys858Arg)

4.2 Použité chemikálie

V rámci experimentální části byly pro jednotlivé metodiky použity chemikálie uvedené v Tabulkách 2–5, pro každou použitou chemikálii je v tabulce uveden její název a stručný popis včetně výrobce uvedeného v závorce.

Tabulka 2. PCR

Chemikálie	Popis (Výrobce)
PPP Master Mix	dvakrát konc. Mg ²⁺ , 500 µl (Top Bio s.r.o., Vestec, ČR)
H ₂ O	PCR ultra H ₂ O, 1,5 ml (Top Bio s.r.o., Vestec, ČR)
K_ras_fl_left (100 µM)	forward primer, <i>KRAS</i> , fluorescein (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
K_ras_GC_right (100 µM)	reverse primer, <i>KRAS</i> , GC clamp (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
K_ras_left_TM (100 µM)	forward primer, <i>KRAS</i> , TAMRA (VBC Biotech, Vídeň, Rakousko)
BRAF_left_FL (100 µM)	forward primer, <i>BRAF</i> , fluorescein (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
BRAF_right_GC (100 µM)	reverse primer, <i>BRAF</i> , GC clamp (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
BRAF_left_TM (100 µM)	forward primer, <i>BRAF</i> , TAMRA (VBC Biotech, Vídeň, Rakousko)
E19H_R_FL (100 µM)	reverse primer, <i>EGFR</i> , fluorescein (VBC Biotech, Vídeň, Rakousko)
E19Lf_noveII (100 µM)	forward primer, <i>EGFR</i> (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
E_19H_r_TM (100 µM)	reverse primer, <i>EGFR</i> , TAMRA (VBC Biotech, Vídeň, Rakousko)
E_21H_L_GC (100 µM)	forward primer, <i>EGFR</i> , GC clamp (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
E_21H_R_FL (100 µM)	reverse primer, <i>EGFR</i> , fluorescein (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
E_21H_r_TM (100 µM)	reverse primer, <i>EGFR</i> , TAMRA (VBC Biotech, Vídeň, Rakousko)

Tabulka 3. Gelová elektroforéza

Chemikálie	Popis (Výrobce)
pufr Tris/Borate/EDTA (TBE)	výsledně dvakrát koncentrovaný pufr, 89 mM Tris-Borate, 2 mM EDTA. pH 8,3 (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
ethidium bromid (EB)	10mg/ml PCR EB ^{TB} (Top Bio s.r.o., Vestec, ČR)
Agarose DNA Grade Electran® for electrophoresis	Agaróza v prášku (VWR, Stříbrná Skalice, ČR)

Tabulka 4. Frakční kolektor

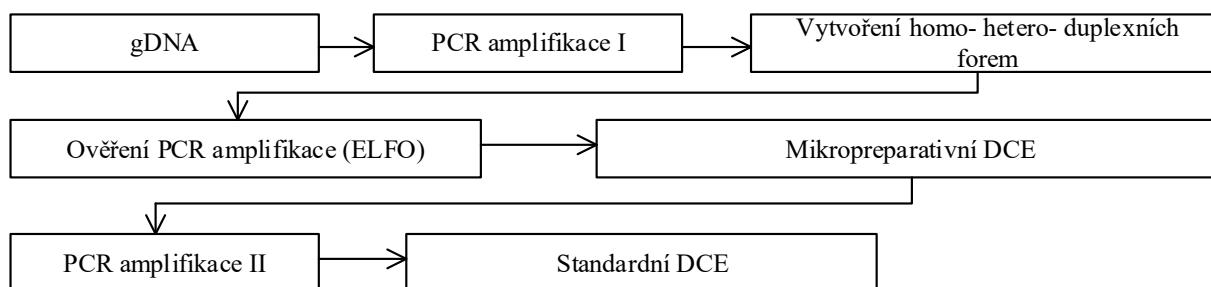
Chemikálie	Popis (Výrobce)
CE pufr DAX	Výsledně jedenkrát koncentrovaný reakční pufr pro aplikace na analyzátoch řady ABI3100(Avant)/3130/3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
polymer	separační polymer POP-4 TM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
H ₂ O	ultra čistá H ₂ O
etanol	absolutní etanol (96% v/v)
fluorescenční roztoky	fluorescenčně značený primer 1×10 ⁻⁴ M, D138256_1_fl sekvence: 5' - CCT GGG CAA CAA GAG CAA A - 3' (VBC Biotech, Vídeň, Rakousko)

Tabulka 5. DCE

Chemikálie	Popis (Výrobce)
CE pufr DAX	Výsledně jedenkrát koncentrovaný reakční pufr pro aplikace na analyzátoch řady ABI3100(Avant)/3130/3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
polymer	separační polymer POP-7™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
H ₂ O	ultra čistá H ₂ O

4.3 Použité metody

Na následujícím schématu (Obrázek 3) je zachycen postup analýzy. Nejprve byl získán vzorek pacienta, ze kterého byla vyizolována genomová DNA, která byla poskytnuta k dalšímu zpracování (PCR amplifikace I s následnou tvorbou heteroduplexů). Po amplifikaci byla ověřena kvalita amplifikované DNA gelovou elektroforézou, PCR vzorek byl dále podroben frakční kolekci (mikropreparativní DCE) a jednotlivé frakce byly znovu amplifikovány za podmínek sníženého počtu cyklů (PCR amplifikace II). Poslední krok analýzy vyžadoval detekci mutantní DNA na standardním kapilárním analytickém systému ABI PRISM 3100.



Obrázek 3. Schematický postup analýzy DNA vzorku s využitím mikropreparativního systému s frakčním kolektorem. (gDNA: genomická DNA, PCR: Polymerázová řetězová reakce, ELFO: Gelová elektroforéza, DCE: Denaturační kapilární elektroforéza).

4.3.1 PCR amplifikace I, PCR amplifikace II

Jak je uvedeno na předchozím schématu, vzorek DNA byl nejprve podroben PCR amplifikaci. Polymerázová řetězová reakce (PCR) představuje metodu, během které dochází k rychlé amplifikaci úseku DNA s mutačním místem. Jak bylo znázorněno na Obrázku 3, tato reakce byla během analýzy provedena dvakrát (PCR amplifikace I při 34 cyklech, PCR amplifikace II při 21 cyklech). Amplifikační reakce byla prováděna v různých objemech, jednotlivá činidla byla do reakce přidávána v místnosti určené pouze pro přípravu PCR premixu. Před použitím byly všechny chemikálie rozmrazeny, zvortexovány a krátce stočeny na minicentrifuze Mini Star (VWR, Stříbrná Skalice, ČR) za podmínek laboratorní teploty při 2000×g po dobu cca 15 s. Použité primery byly pro účely analýzy ředěny na konečnou

koncentraci 5 μM . Kvůli kontaminaci a ověření funkčnosti proběhlé reakce byly k analyzovaným vzorkům vždy přidány 3 negativní kontroly (NK) obsahující ultra čistou PCR H_2O (přidávána v různých fázích přípravy PCR reakce) a jedna kontrola pozitivní (PK) obsahující WT DNA. Směs byla zvortexována a krátce centrifugována za podmínek laboratorní teploty při $2000\times g$ po dobu cca 15 s, následně byl premix rozpipetován do jednotlivých zkumavek a byla přidána DNA. Před vložením zkumavek do termocykleru byly všechny vzorky zvortexovány a opět stočeny na minicentrifuze za již uvedených podmínek. PCR probíhala vždy v termocykleru C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Praha, ČR), ve kterém byl po ukončení amplifikační reakce spuštěn heteroduplexní program HT8MIN (Tabulka 6).

Uměle vytvořené mutační PCR standardy ze vzorků tkáňové biopsie byly zpravidla připravovány v objemu 10 μl , případně byly z důvodu potřebného množství připraveny ve dvojnásobném objemu při zachování stejného poměru přidávaných činidel. Reakční směs PCR amplifikace II v objemu 10 μl obsahovala 5 μl PPP Master Mixu, 1 μl forward primeru, 1 μl reverse primeru a 3 μl DNA, reakční směs PCR amplifikace II byla opět připravována v objemu 10 μl (5 μl PPP, 1 μl forward primeru, 1 μl reverse primeru, 2 μl PCR H_2O a 1 μl frakce vzorku). Vzorky krevní plazmy pacientů a standardní DNA, používané pro validaci frakčního kolektoru před optimalizací, byly amplifikovány podle výše zmíněného protokolu.

Během výzkumu byla optimalizována PCR reakce za použití standardní DNA. PCR amplifikace I byla provedena v objemu 60 μl (30 μl PPP, 6 μl forward primeru, 6 μl reverse primeru, 6 μl DNA standardu, premix byl ještě doplněn 12 μl PCR H_2O). Reakční směs PCR amplifikace II byla připravena opět v objemu 60 μl , v tomto případě však obsahovala 20 μl frakce, program termocykleru byl vybrán podle protokolu uvedeného v Tabulce 6. Tato optimalizace se dále týkala pouze vzorků krevní plazmy testovaných pacientů.

Ke každému vzorku krevní plazmy byl při 34 cyklech (Tabulka 6) amplifikován vzorek tkáňové biopsie téhož pacienta značený fluorescenčním barvivem tetramethylrhodaminem (TAMRA), v případě vzorků DNA standardu určených pro frakční kolekci byl amplifikován vzorek téhož DNA standardu. PCR reakční směs takto značených vzorků byla připravována v objemu 20 μl s přidáními 6 μl DNA (tkáňová biopsie), resp. ve 20 μl s přidáním 1 μl DNA standardu o původní koncentraci 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Tabulka 6. Protokol termocyklieru: marker *KRAS*.

Program	Krok	Teplota	Čas
HET54	1	95 °C	4:00
	2	94 °C	0:30
	3	54 °C	0:30
	4	72 °C	1:00
	5	Zpět na krok 2	34x
	6	72 °C	10:00
	7	12 °C	0:00
HET54 21 CYKLU	1	95 °C	4:00
	2	94 °C	0:30
	3	54 °C	0:30
	4	72 °C	1:00
	5	Zpět na krok 2	21x
	6	72 °C	10:00
	7	12 °C	0:00
HT8MIN	1	95 °C	8:00
	2	65 °C	30:00
	3	12 °C	0:00

Další částí výzkumu byla optimalizace experimentálního DCE systému s frakčním kolektorem pro účely detekce dalších onkogenetických markerů (viz dále). Optimalizace (PCR amplifikace I, PCR amplifikace II) probíhala na uměle vytvořeném PCR standardu genomické DNA a obě PCR reakce byly provedeny v objemu 10 μ l (5 μ l PPP, 1 μ l forward primeru, 1 μ l reverse primeru a 3 μ l DNA). PCR amplifikace I vzorků krevní plazmy pacientů testovaných na přítomné mutace (onkogen *BRAF*, *EGFR*) byla provedena v objemu 60 μ l se 6 μ l DNA, po frakční kolekci (PCR amplifikace II) činil reakční objem směsi 60 μ l s 20 μ l frakce vzorku (popsáno u pacientů testovaných na mutaci genu *KRAS*). Vzorky tkáňové biopsie pacientů (značených fluorescenčním barvivem TAMRA) byly do reakce vkládány při objemu 20 μ l se 6 μ l DNA. Program termocyklieru volený pro jednotlivé reakce byl vybírán podle počtu cyklů (onkogen *BRAF* – Tabulka 7, onkogen *EGFR* – Tabulka 8).

Tabulka 7. Protokol termocyklieru: marker *BRAF*.

Program	Krok	Teplota	Čas
HET59	1	95 °C	4:00
	2	94 °C	0:30
	3	59 °C	0:30
	4	72 °C	1:00
	5	Zpět na krok 2	34x
	6	72 °C	10:00
	7	12 °C	0:00
HET59 21 CYKLU	1	95 °C	4:00
	2	94 °C	0:30
	3	59 °C	0:30
	4	72 °C	1:00
	5	Zpět na krok 2	21x
	6	72 °C	10:00
	7	12 °C	0:00
HT8MIN	1	95 °C	8:00
	2	65 °C	30:00
	3	12 °C	0:00

Tabulka 8. Protokol termocyklieru: marker *EGFR*.

Program	Krok	Teplota	Čas
HET60	1	95 °C	4:00
	2	94 °C	0:30
	3	60 °C	0:30
	4	72 °C	1:00
	5	Zpět na krok 2	34x
	6	72 °C	10:00
	7	12 °C	0:00
HET60 21 CYKLU	1	95 °C	4:00
	2	94 °C	0:30
	3	60 °C	0:30
	4	72 °C	1:00
	5	Zpět na krok 2	21x
	6	72 °C	10:00
	7	12 °C	0:00
HT8MIN	1	95 °C	8:00
	2	65 °C	30:00
	3	12 °C	0:00

Práce s jednotlivými chemikáliemi PCR reakce probíhala rychle, pokud byla příprava reakce odhadnuta na delší dobu, byla použita chladicí destička. Pokud nemohla být PCR reakce provedena ihned po izolaci DNA nebo frakční kolekci, byly vzorky uchovávány při -30 °C .

4.3.2 Horizontální gelová elektroforéza v agarózovém gelu

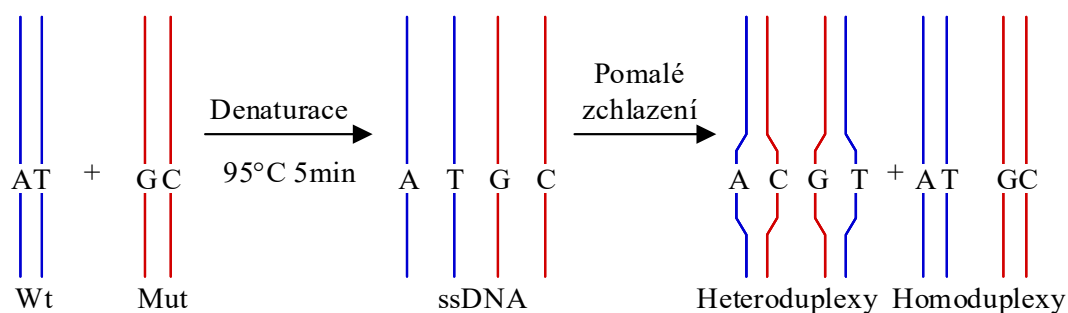
Po proběhlé PCR amplifikaci bylo nutné ověřit kvalitu amplifikované DNA gelovou elektroforézou. Princip této techniky spočívá v pohybu záporně nabitých molekul v elektrickém poli od katody k anodě, přičemž k oddělení molekul DNA dochází na základě rozdílných rychlostí jejich pohybu, který je nepřímo úměrný velikosti molekul. Ke zviditelnění DNA molekul bylo používáno interkalační barvivo ethidium bromid (EB). Gelová elektroforéza byla prováděna po dokončení PCR amplifikace I na 2% gelu (standardní postup laboratoře), u vzorků amplifikovaných při 21 cyklech nebyla vzhledem k nízkému počtu PCR cyklů prováděna. Gelová elektroforéza PCR vzorků krevní plazmy byla provedena vždy i přes předpokládanou nízkou koncentraci nádorových buněk.

Postup:

- 1) Do připravené elektroforetické vaničky vložit plastové boční stěny.
- 2) V Erlenmeyerově baňce odměřit 25 ml výsledně dvakrát koncentrovaného TBE pufru, přidat 500 mg agarózového prášku (2% gel).
- 3) Směs TBE pufru a agarózového prášku krouživými pohyby baňky promíchat, v mikrovlnné troubě uvést do varu, ochladit pod tekoucí vodou.
- 4) Přidat 5 μ l EB do směsi v baňce, krouživými pohyby obsah baňky promíchat.
- 5) Směs nalít do připravené elektroforetické vaničky, vzniklé vzduchové bubliny přemístit na okraj vaničky, vložit hřebínky.
- 6) Gel nechat po dobu 20–30 min ztuhnout při 5 °C.
- 7) Vyndat hřebínky, gel zalít výsledně dvakrát koncentrovaným TBE pufrem.
- 8) Vzorky pipetovat do jamek vzniklých hřebínky, do jedné jamky lze napipetovat kontrolu o známé koncentraci.
- 9) Elektroforetickou vaničku elektrickými kabely připojit ke zdroji, na zdroji nastavit 500 mA, 45 V, 40 min, spustit.
- 10) Po skončení gelové elektroforézy vložit elektroforetickou vaničku do UV transiluminátoru, vyfotografovat.

4.3.3 Detekce DNA mutací pomocí metody DCE

DNA mutace byly v této práci detekovány s využitím metody denaturační kapilární elektroforézy (DCE), jejíž princip spočívá v oddělení homo- a hetero- duplexních forem PCR fragmentů. Pokud byla ve vzorku přítomna mutace, denaturace směsi mutovaných a nemutovaných fragmentů s postupným pomalým ochlazováním vzorku vedla k formování uvedených izoform (Obrázek 4).



Obrázek 4. Homoduplexní a heteroduplexní izoformy DNA. Denaturace vzorku dvouvláknové DNA obsahující mutaci následovaná pomalým ochlazováním směsi vede k formování homo- a hetero- duplexních izoform molekuly DNA (převzato a upraveno podle Donohoe, 2005). (Wt: Wild Type, nemutovaná forma DNA, Mut: mutovaná forma DNA, ssDNA: jednovláknová DNA)

Jeden z primerů byl zpravidla opatřen GC svorkou, aby nedošlo k úplnému rozvolnění vláken ds DNA (dvouvláknová DNA) na ss DNA (jednovláknová DNA) během denaturace izoform PCR fragmentů při následné analýze kapilární gelovou elektroforézou (Bjørheim & Ekstrøm, 2005). Vlivem elektrického pole tak v principu dochází k pohybu vzorku kapilárou za současného působení denaturačního činidla a vysoké teploty, čímž je způsobeno rozvolňování vláken molekuly a zpomalení pohyblivosti vzorku v kapiláře s následnou separací fragmentů. Zcela zásadní je volba separační teploty tak, aby se heteroduplexní formy pohybovaly v polymeru ve výrazně více rozvolněných strukturách ve srovnání s homoduplexy a tím došlo k jejich rozlišení. Nalezení optimální separační teploty bylo pro výslednou detekci mutací zcela zásadním krokem (viz kapitola 5.1 Optimalizace mikropreparativního DCE systému) a na výsledném elektroforeogramu tak v případě heterozygotního vzorku bývají viditelné 4 píky (2 homozygotické, 2 heterozygotické) (Bjørheim & Ekstrøm, 2005).

Analýza DCE bývá zpravidla složena ze tří hlavních fází: pre-runu, elektrokinetického dávkování a samotné analýzy. Pre-run lze charakterizovat pohybem nabitých monomerů separačního polymeru ke konci kapiláry, ve které tak zůstane pouze čistá matrice. Zavedením kapilárních přístrojů bylo možné umístit separační polymer přímo do kapiláry, čímž bylo umožněno elektrokinetické dávkování vzorku (dávkování vzorku elektrickými impulzy) z mikrotitrační destičky nebo zkumavky do jednotlivých kapilár přístroje. Po nadávkování vzorku probíhá samotná analýza za podmínek částečné denaturace (tzv. run).

4.3.4 Standardní DCE

Na závěr každého experimentu byly z důvodu ověření účinnosti experimentálního systému amplifikované PCR vzorky resp. amplifikované frakce dávkovány na kapilární analyzátor ABI PRISM 3100, který je během jedné analýzy schopen detekovat několik signálů různých vlnových délek najednou. V rámci pokusu byly proto současně detekovány vzorky značené carboxyfluoresceinem (FAM) a tetramethylrhodaminem (TAMRA) umístěné v jedné reakční jamce.

PCR vzorky byly vždy nejprve rozmrazeny, ohřáty na laboratorní teplotu, zvortexovány a krátce stočeny na minicentrifuze Mni Star (VWR, Stříbrná Skalice, ČR) za podmínek laboratorní teploty při 2000×g po dobu cca 15 s. Vzorky byly nejprve 10× naředěny ultra čistou H₂O do ředící destičky, přičemž všechny vzorky určené k analýze byly zavedenými postupy laboratoře ve výsledku naředěny 100×. Do mikrotitrační destičky byly dále přidány vzorky NK, PK a vzorek, který byl kolektován. Jednalo-li se o vzorky kolekce krevní plazmy, byl přidán i 100× ředěný PCR produkt tkáňové biopsie nebo cytologického nátěru značený fluorescenčním barvivem TAMRA. Všechny vzorky kromě vzorků validačních byly pipetovány do dvou současně probíhajících reakcí. Mikrotitrační destička byla před analýzou krátce stočena na centrifuze Universal 32 (Hettich Lab Technology, Tettlingen, Německo) při laboratorní teplotě při 17×g po dobu 15 s. Analýza probíhala vždy na přístroji ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) vybaveným 16 kapilárami a před každou analýzou bylo do protokolu vypsáno umístění vzorků v mikrotitrační destičce. Dávkování vzorků probíhalo podle analyzovaného markeru (Tabulka 9).

Postup:

- 1) Do zkumavky 0,5 ml 100× naředit (H₂O) PCR vzorek značený TAMRA.
- 2) Do jamek ředící destičky napipetovat multikanálovou pipetou 9 μl H₂O.
- 3) Do každé jamky přidat 1 μl vzorku (vznikne 10× ředěný produkt).
- 4) Obsah jamek několikrát promíchat krouživými pohyby špičkou a opakovaným naplněním špičky o objemu cca 5 μl.
- 5) Do jamek mikrotitrační destičky napipetovat multikanálovou pipetou 9 μl H₂O respektive 9 μl PCR vzorku značeného fluorescenčním barvivem TAMRA.
- 6) Do jamek mikrotitrační destičky napipetovat 1 μl 10× zředěného PCR vzorku z ředící destičky.
- 7) Obsah jamek mikrotitrační destičky několikrát promíchat krouživými pohyby špičkou a opakovaným naplněním špičky o objemu cca 5 μl.
- 8) Mikrotitrační destičku zavřít gumovým septem a stočit na centrifuze za podmínek: laboratorní teplota, 17×g, 15 s.
- 9) Po stočení destičku zasadit do desky kapilárního přístroje ABI (ABI deska).
- 10) ABI desku s mikrotitrační destičkou vložit do přístroje, zkontrolovat objem separačního polymeru POP-7 a CE pufu DAX.
- 11) Na počítači do protokolu vyplnit umístění vzorků podle mikrotitrační destičky, nastavit dávkování podle analyzovaného markeru (Tabulka 9) a spustit.
- 12) Po dokončení analýzy zalepit ředící i mikrotitrační destičku izolepou a uchovávat při -20 °C.

Tabulka 9. Dávkování DCE

Marker	Teplota	Dávkování
KRAS	50 °C	1 kv, 10 s
		4 kv, 50 s
BRAF	49 °C	1 kv, 10 s
EGFR	56 °C	1 kv, 10 s

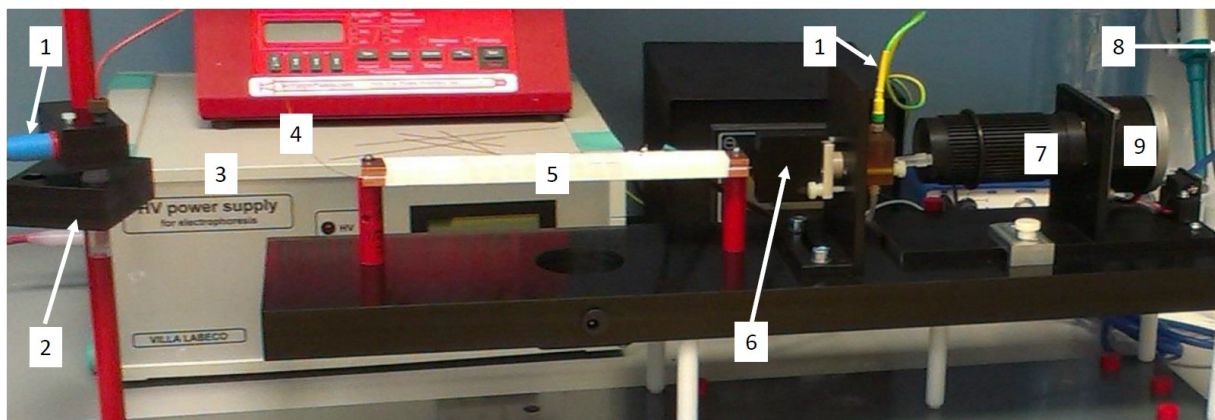
4.3.5 Mikropreparativní DCE systém

Za účelem zvýšení účinnosti kapilární elektroforézy a citlivosti detekce somatických mutací onkogenu *KRAS* v mutační oblasti exonu 2 byl využit experimentální přístroj na principu denaturační kapilární elektroforézy vybavený fluorescenčním detektorem a frakčním kolektorem. Speciálně pro tuto práci byl přístroj sestaven ve spolupráci

s vývojovým oddělením Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně. Tímto systémem bylo umožněno oddělení mutantních izoform DNA s následnou preparací takto oddělených frakcí pro další zpracování (např. další amplifikaci apod.).

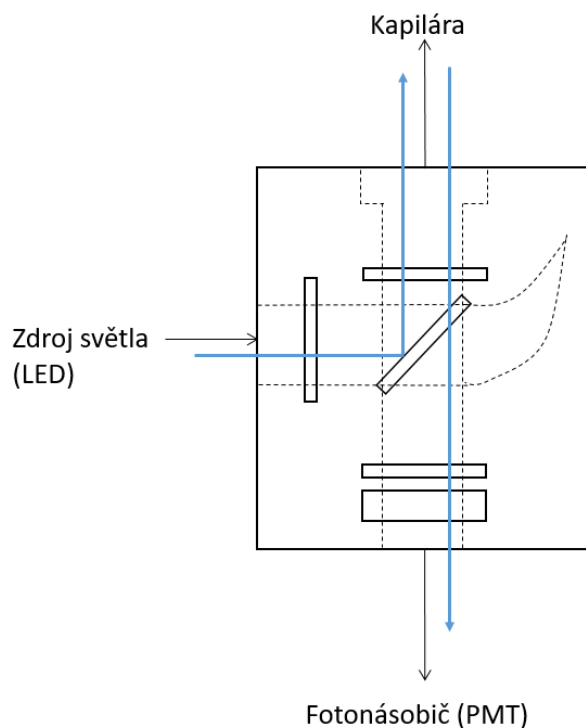
Použitím vytvořených fluorescenčních roztoků, uměle vytvořených PCR standardů, standardní DNA a reálných vzorků pacientů byla tato metoda zprovozněna, vyvinuta, optimalizována a validována pro citlivou detekci DNA mutací. Data z experimentálního systému byla vyhodnocována v programu ClarityLite (DataApex, Praha, ČR). Zachycené frakce byly vždy ověřeny na standardním kapilárním analyzátoru ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a výsledná data byla zpracována a vyhodnocena pomocí počítačového programu GeneMarker® (SoftGenetics, State College, PA, USA).

Experimentální systém se skládal z několika částí: první část byla sestavena z detekční oblasti s optickými vlákny, vlastní kapiláry a fluorescenčního detektoru, druhou částí byl pak rotační kolektor poháněný počítačově řízeným motorem (Obrázek 5).

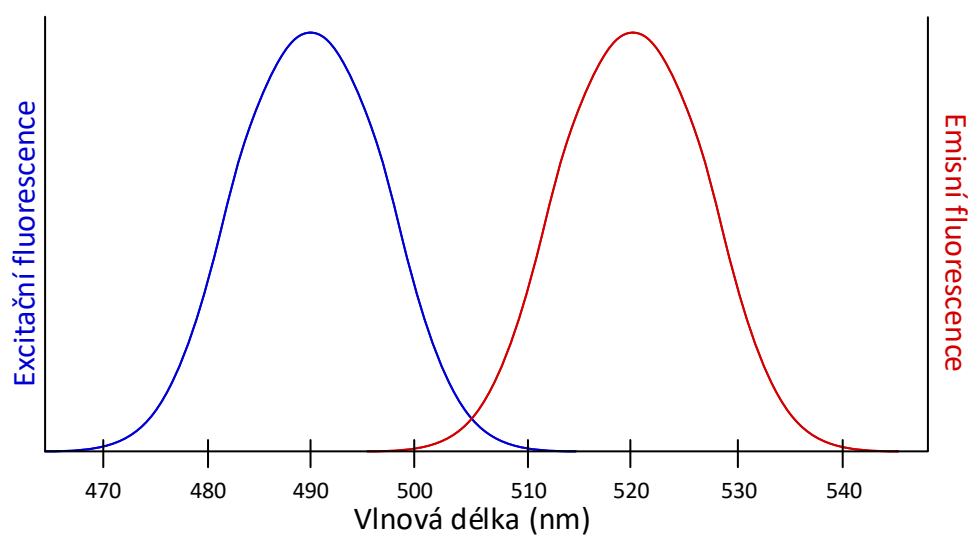


Obrázek 5. Mikropreparativní DCE systém s frakčním kolektorem: 1 – elektrody zdroje stejnosměrného napětí, 2 – dávkovací blok, 3 – zdroj stejnosměrného napětí, 4 – separační křemenná kapilára, 5 – termostatický ohřev křemenné kapiláry, 6 – detektor, 7 – kolektorový válec, 8 – počítač (program Clarity Lite), 9 – počítačově řízený motor kolektorového válce.

K detekci oddělení značených DNA fragmentů uvnitř křemenné kapiláry byl zvolen fluorescenční detektor představující nejčastěji používanou, velice citlivou metodu. Detekční jednotka sestavená ze světlo emitující LED diody, excitačního a emisního filtru, optických vláken a fotonásobiče je znázorněna na Obrázku 6. Optická vlákna byla využita k excitaci vzorku LED světlem s následným filtrováním emitovaného fluorescenčního signálu a jeho svedení do fotonásobiče (Prikryl & Foret, 2014). Excitačním filtrem byl zajištěn výběr nízké excitační vlnové délky, emisním filtrem bylo pak odstíněno excitační světlo a tím umožněna detekce pouze světla emisního. Posun excitačního a emisního spektra fluorescenčního barviva FAM (carboxyfluorescein) je znázorněn na Obrázku 7.

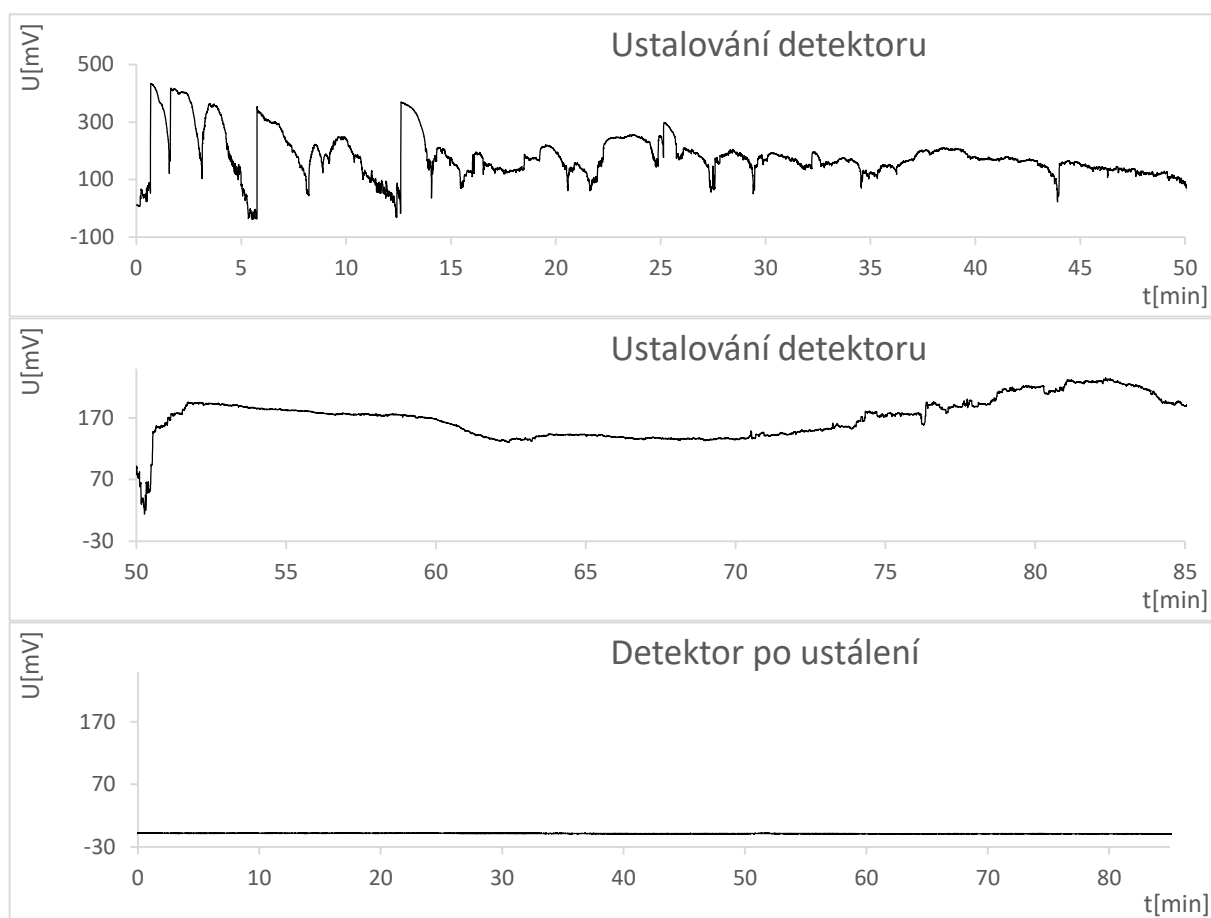


Obrázek 6. Schematické znázornění detekční jednotky složené ze světlo emitující LED diody, excitačního a emisního filtru a fotonásobiče. Modrými šipkami je naznačen průchod paprsku světla přes zrcadlo a jednotlivé filtry.



Obrázek 7. Posun excitačního a emisního spektra fluorescenčního barviva FAM. Modrou barvou je znázorněno excitační spektrum fluorescence, červenou barvou je znázorněno posunuté emisní fluorescenční spektrum (převzato a upraveno podle www.thermofisher.com). (FAM: carboxyfluorescein)

Správné zapojení a zprovoznění přístroje zahrnovalo připojení všech optických vláken a světlo emitující LED diody s následným upevněním kapiláry do přístroje. Po celou dobu výzkumu byla používána kapilára o průměru $0,75\ \mu\text{m}$ z oxidu křemičitého z vnější strany potažená polyimidem (Polymicro Technologies, Phoenix, AR, USA). Délka kapiláry byla experimentálně stanovena na optimální hodnotu 51 cm. Na kapiláře bylo manuálně vytvořeno $0,5\text{--}1\ \text{cm}$ široké detekční „okénko“ opálením vnějšího polyimidu po dobu $3\text{--}9\ \text{s}$ s následným očištěním etanolem. Okénko se nacházelo $7,5\ \text{cm}$ od konce kapiláry, po úpravách přístroje bylo posunuto na vzdálenost $5,5\ \text{cm}$ od konce kapiláry. Na vytvořené okénko byl připevněn detektor s optickým vláknem. Promývání separační kapiláry a její plnění polymerní separační matricí bylo prováděno manuálně s použitím 705N Syringe $50\ \mu\text{l}$ (Hamilton, Reno, NV, USA). V programu ClarityLite bylo sledováno ustalování detektoru (Obrázek 8) trvající zpočátku i několik hodin, v pokročilejší fázi experimentálního vývoje nebyla detekční jednotka vypínána. Na závěr byl zapnut termostat, který se na požadovanou teplotu ustaloval až 30 minut (Obrázek 9).



Obrázek 8. Ustalování detektoru po výměně separační kapiláry. Horní záznam znázorňuje kolísání signálu těsně po výměně separační křemenné kapiláry, prostřední naznačuje ustalování signálu do rovné hladiny, dolní zobrazuje záznam detektoru po ustálení.



Obrázek 9. Tendence ustalování separační teploty experimentálního systému s nastavenou teplotou 49,0 °C.

Ke konci aparatury byl přiveden pomocí syringe pumpy pufr, kterým byl omýván konec kapiláry tak, aby během jímání frakcí nedošlo k přerušení separačního napětí. Během frakční kolekce byla hydrofobní povahou konce kapiláry formována malá kapička, která byla následně nasáta do sběrných trubiček nacházejících se na rotačním kolektoru za koncem křemenné kapiláry. Pro správný odběr frakce musela být sběrná trubička vždy zarovnána s koncem separační kapiláry. Frakčním kolektorem je umožněna manipulace s mikrolitrovými objemy (Müller *et al.*, 1995), separované DNA fragmenty tak byly naředěny, avšak toto naředění nemělo výrazný vliv na úspěšnost následné PCR amplifikace takto jímaných frakcí.

PCR vzorky byly vždy nejprve rozmrazeny, zvortexovány a krátce stočeny na minicentrifuze Mini Star (VWR, Stříbrná Skalice, ČR) za podmínek laboratorní teploty při 2000×g po dobu cca 15 s, pokud nebyly přímo používány, byly uchovávány v chladícím zařízení při 5 °C. Všechna činidla byla vždy vytemperována na laboratorní teplotu a vyměněna za nepoužitá. Křemenná kapilára byla po celou dobu analýzy zahřívána termostatickým blokem (PMA, Kassel, Německo) nastaveným na požadovanou teplotu (Tabulka 10). Během frakční kolekce byly nastaveny parametry na syringe pumpě NE 300 „Just Infusion“™ (New Era Pump Systems, NY, USA) na průtok pufru v objemu 15 µl/min (bez jímání frakcí) nebo 25 µl/min (jímání frakcí). Před začátkem každé fáze analýzy byl také nastaven zdroj stejnosměrného napětí (Villa Labeco s.r.o., Spíšská Nová Ves, SR) (Tabulka 11). V průběhu experimentální činnosti byla separační kapilára v přístroji vyměňována za novou.

Pracovní postup:

- 1) Termostat nastavit na požadovanou teplotu (Tabulka 6).
- 2) Do zkumavky 1,5 ml napipetovat CE pufr DAX.
- 3) Syringe naplnit CE pufrem DAX v plném objemu 6 ml, v pumpě vyměnit syringe naplněnou ultra čistou H₂O za syringe naplněnou pufrem, přenastavit průměr syringe na 12,45 mm.
- 4) Separační kapiláru propláchnout studenou ultra čistou H₂O a CE pufrem DAX.
- 5) Do kapiláry pomocí syringe manuálně naplnit separační polymer POP-4 v objemu cca 40 µl.
- 6) Na kolektor upevnit skleněné sběrné trubičky.
- 7) Na pumpě nastavit požadovaný průtok CE pufru DAX na hodnotu 15 µl/min, spustit.
- 8) Na zdroji nastavit elektrické napětí 10 kV, spustit pre-run, nechat probíhat po dobu 5 min.
- 9) Kolektovaný vzorek rozmrazit, zvortexovat, krátce stočit na minicentrifuze za podmínek: 2000×g, cca 15 s, laboratorní teplota.
- 10) Po dokončení pre-runu přerušit elektrický proud, připevnit zkumavku se vzorkem do dávkovacího bloku, spustit dávkování vzorku při nastaveném elektrickém napětí 10 kV, nechat probíhat po dobu 2 min.
- 11) Po 2 min dávkování vzorku přerušit elektrický proud, na zdroji přenastavit elektrické napětí na 15 kV, odstranit vzorek, spustit analýzu, spustit záznam detekční jednotky.
- 12) Během analýzy sledovat pokles elektrického proudu pro kontrolu správného průběhu reakce.
- 13) Před začátkem frakční kolekce přenastavit pumpu na požadovaný průtok 25 µl/min.
- 14) Frakční kolekci zahájit při zpozorování Wild Type píku v programu Clarity Lite.
- 15) Po ukončení frakční kolekce vypnout zdroj, pumpu, záznam detektoru.
- 16) Z kolektoru postupně odebrat skleněné sběrné trubičky s frakcemi.
- 17) Vyprázdnit sběrné trubičky plným objemem 10 µl pipety do předem připravených a popsaných zkumavek.
- 18) Separační kapiláru propláchnout studenou vodou.
- 19) Syringe naplnit ultra čistou H₂O v plném objemu 20 ml, v pumpě vyměnit syringe naplněnou CE pufrem DAX za syringe naplněnou H₂O, přenastavit průměr syringe na 19,05 mm, průtok nastavit na 95 µl/hod, spustit.

Tabulka 10. Termostat.

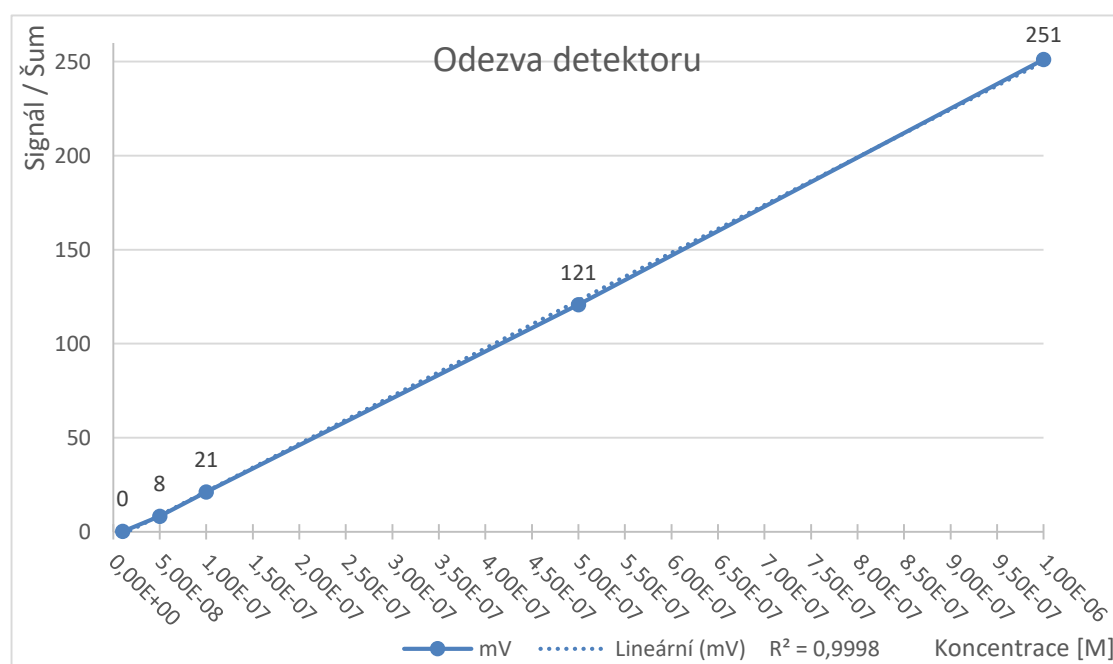
Marker	Teplota
KRAS	49 °C
BRAF	47,5 °C
E19	54 °C
E21	54 °C

Tabulka 11. Zdroj.

Fáze analýzy	Dávkování
pre-run	10 kV, 5 min
dávkování	10 kV, 2 min
run	15 kV

4.3.5.1 Experimentální vývoj mikropreparativního DCE systému

První fáze vývoje byla věnována sledování odezvy detekční jednotky pomocí prolévání separační kapiláry kalibrační řadou fluorescenčně značených roztoků (Obrázek 10). Roztoky byly naředěny z fluorescenčně značeného primeru o počáteční koncentraci 1×10^{-4} M na koncentrace 1×10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 1×10^{-7} M, 5×10^{-8} M a 1×10^{-8} M. Ředění bylo vždy provedeno ve flow-boxu (Dynex, Praha, ČR) a z důvodu vyšší odezvy signálu (fluorescenčního kvantového výtěžku při pH 9) bylo vždy provedeno do reakčního CE pufru DAX. Mezi jednotlivými fluorescenčními roztoky byla kapilára promyta ultra čistou H_2O . Tyto pokusy byly vždy dvakrát zopakovány, včetně nového naředění fluorescenčních roztoků.



Obrázek 10. Křivka znázorňující odezvu detektoru na přítomnost fluorescenčních roztoků o různých koncentracích (zleva: 1×10^{-8} M, 5×10^{-8} M, 1×10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M). Každý bod grafu představuje intenzitu signálu fluorescenčního roztoku vztahenou k rušivým signálům pozadí.

Ve druhé fázi vývoje byla metoda testována na uměle vytvořených *KRAS* mutačních PCR standardech pocházejících ze vzorků tkáňové biopsie (vždy somatická onkogenní mutace v heterozygotní formě) ředěných 1:1 s ultra čistou H₂O.

Nejprve byla bez použití frakčního kolektoru optimalizována separační teplota na vzorku s již dříve potvrzenou substituční mutací Gly12Val (G12V). Cílem bylo nalezení teploty, během které dojde k úplnému rozdělení homo- a hetero- duplexních forem molekuly DNA. Teplota byla zkoušena v rozmezí 40,0 až 51,0 °C. V rozmezí 40,0 až 48,0 °C po 2,0 °C, ve zbytku rozsahu po 0,5 °C. Za optimální teplotu dalších pokusů s *KRAS* mutačními vzorky bylo zvoleno 49 °C (viz kapitola 5.1 Optimalizace mikropreparativního DCE systému). Pokus za optimální teploty byl na stejném vzorku alespoň třikrát zopakován, později byla stanovená optimální teplota potvrzena zopakováním pokusu na vzorku s potvrzenou substituční mutací Gly12Asp (G12D). Během následné experimentální práce byla ověřována správná funkčnost systému pravidelným opakováním dělení známého vzorku při optimální teplotě.

Ve druhé části byla za optimálních podmínek provedena DCE separace vzorku se známou mutací genu *KRAS* (G12V) s následným získáním mutantních fragmentů pomocí frakčního kolektoru. V průběhu pokusů bylo několikrát provedeno oddělení s následnou izolací frakcí nemutované formy DNA, na které byla kontrolována kontaminace separační kapiláry. Další oddělený a kolektovaný vzorek obsahoval mutaci G12D, na tomto vzorku byly provedeny další pokusy.

4.3.5.2 Klinická validace a optimalizace experimentálního systému

Po experimentálním vývoji metodiky byla provedena validace experimentálního DCE systému na 15 reálných vzorcích krevní plazmy pocházejících od 14 pacientů s již dříve potvrzenou mutací onkogenu *KRAS*. Využit byl standardní pracovní postup, přičemž validační vzorky určené pro frakční kolekci nebyly před vlastním dávkováním ředěny.

Následně bylo testování zaměřeno na optimalizaci citlivosti experimentálního přístroje (tzv. kvantifikace) a na optimalizaci PCR amplifikace I a II s použitím DNA standardu o známé koncentraci (*KRAS* G12D o původní koncentraci 50 ng/μl). Ředění DNA standardu (poměr MUT:WT molekulám DNA) bylo provedeno vždy ve flow-boxu, vzorky i ředící činidla byly nejprve rozmrazeny a promíchány pipetou. Jako první krok byly zásobní DNA standardy (mutovaný standard G12D i standard nemutované DNA) naředěny na směsi 1:10, 1:100, 1:1000 a 1:10000 (MUT:WT). Ve druhém kroku byly vzorky 1:100, 1:1000 a 1:10000 podrobeny frakční kolekci (viz kapitola 5.2.3.1 Kvantifikace standardní DNA), přičemž

kolekce vzorků s pozitivním výsledkem byly z důvodu reprodukovatelnosti dat dvakrát opakovány.

4.3.5.3 Kvantifikace genomickou DNA

Po frakční kolekci a kvantifikaci vzorků standardní DNA byla stanovená citlivost přístroje ověřena kvantifikací provedenou ze vzorků genomické DNA. Zvolena byla WT DNA v kombinaci s jednou mutantní frakcí re-amplifikovaného mutačního PCR standardu s potvrzenou mutací G12V, oba vzorky byly vybrány podle odpovídající intenzity píků (50 % nemutované DNA, 50 % mutované DNA). Oba vzorky byly naředěny 10× ultra čistou H₂O, z čehož byla dále vytvořena řada roztoků s různým poměrem MUT:WT molekulám DNA: 2:8 (MUT:WT), 1:9, 1:19, 1:49 a 1:99. Ze vzorku 1:99 (MUT:WT) byly následně naředěny další 4 směsi s odhadovaným obsahem 0,5 %, 0,25 %, 0,12 % a 0,05 % mutované DNA. Některé tyto vzorky byly dále kolektovány (viz kapitola 5.2.3.2 Kvantifikace genomickou DNA).

Do druhé série pokusů věnovaných kvantifikaci genomickou DNA byla zahrnuta 5× zředěná WT DNA v kombinaci s mutantní frakcí s potvrzenou *KRAS* mutací G12D (oba vzorky byly opět vybrány podle intenzity píků). DNA byla naředěna v poměru molekul 1:19 (MUT:WT), 1:49 a 1:99. Ze směsi 1:99 byly následně naředěny 4 roztoky s odhadovaným obsahem 0,5 %, 0,25 %, 0,12 % a 0,05 % mutované DNA. Některé vzorky byly vybrány pro další analýzu za použití frakčního kolektoru a standardního postupu (viz kapitola 5.2.3.2 Kvantifikace genomickou DNA).

Na závěr experimentální činnosti byl mikropreparativní systém validován na dalších 6 vzorcích krevní plazmy pacientů s prokázanou mutací genu *KRAS*, celá analýza byla provedena za nově zoptimalizovaných podmínek.

4.3.5.4 Optimalizace pro další DNA mutační markery

Po předešlé detekci mutací onkogenu *KRAS* byl přístroj optimalizován pro účely zachycení dalších onkogenetických markerů (*BRAF*, *EGFR*). Do prvního kroku bylo zahrnuto stanovení optimální separační teploty onkogenu *BRAF* na vzorku tkáňové biopsie (optimální teplota byla stanovena na 47,5 °C), ve druhé fázi byly izolovány jednotlivé frakce a na závěr byla provedena analýza dvou vzorků krevní plazmy.

Poslední testovaný marker představoval onkogen *EGFR*. Optimalizace experimentálního systému byla zaměřena nejprve na podmínky detekce deleční mutace v exonu 19 (E19) ve vzorku cytologického nátěru s již dříve potvrzenou mutací, následně byla detekována substituční mutace v exonu 21 (E21) za použití DNA standardu *EGFR* L858R.

Optimalizace byla provedena po vzoru předchozích dvou onkogenů, přičemž optimální teplota obou markerů (E19 i E21) byla stanovena na 54 °C. Jako poslední bylo analyzováno 7 vzorků krevní plazmy pacientů.

4.3.6 Vyhodnocení dat

Výsledky DCE experimentálního systému byly vyhodnocovány v průběhu jednotlivých pokusů v programu ClarityChrom Chromatography Data Station verze 5.0.5.098 (DataApex, Praha, ČR), později v programu ClarityLite verze 5.0.4.158 (DataApex, Praha, ČR). Pokud během pokusu podmínky neodpovídaly optimálním, celý experiment byl zastaven a zopakován. Jednotlivé výsledky byly vyhodnocovány v průběhu samotného pokusu, následně byly všechny výsledky ukládány a zpětně vyhodnocovány za účelem vzájemného porovnání a vyhodnocení reprodukovatelnosti dat.

Výsledky kapilární elektroforézy z přístroje ABI PRISM byly vyhodnocovány v počítačovém programu GeneMarker®, verze 2.4.2. a 2.4.0 (SoftGenetics, State College, PA, USA). Analýzy krevních vzorků byly posuzovány podle výsledků tkáňových biopsií značených fluorescenčním barvivem TAMRA analyzovaných v rámci stejného pokusu ve stejné jamce. Výsledky pokusu byly vždy nezávisle posouzeny a potvrzeny druhou osobou.

5. Výsledky

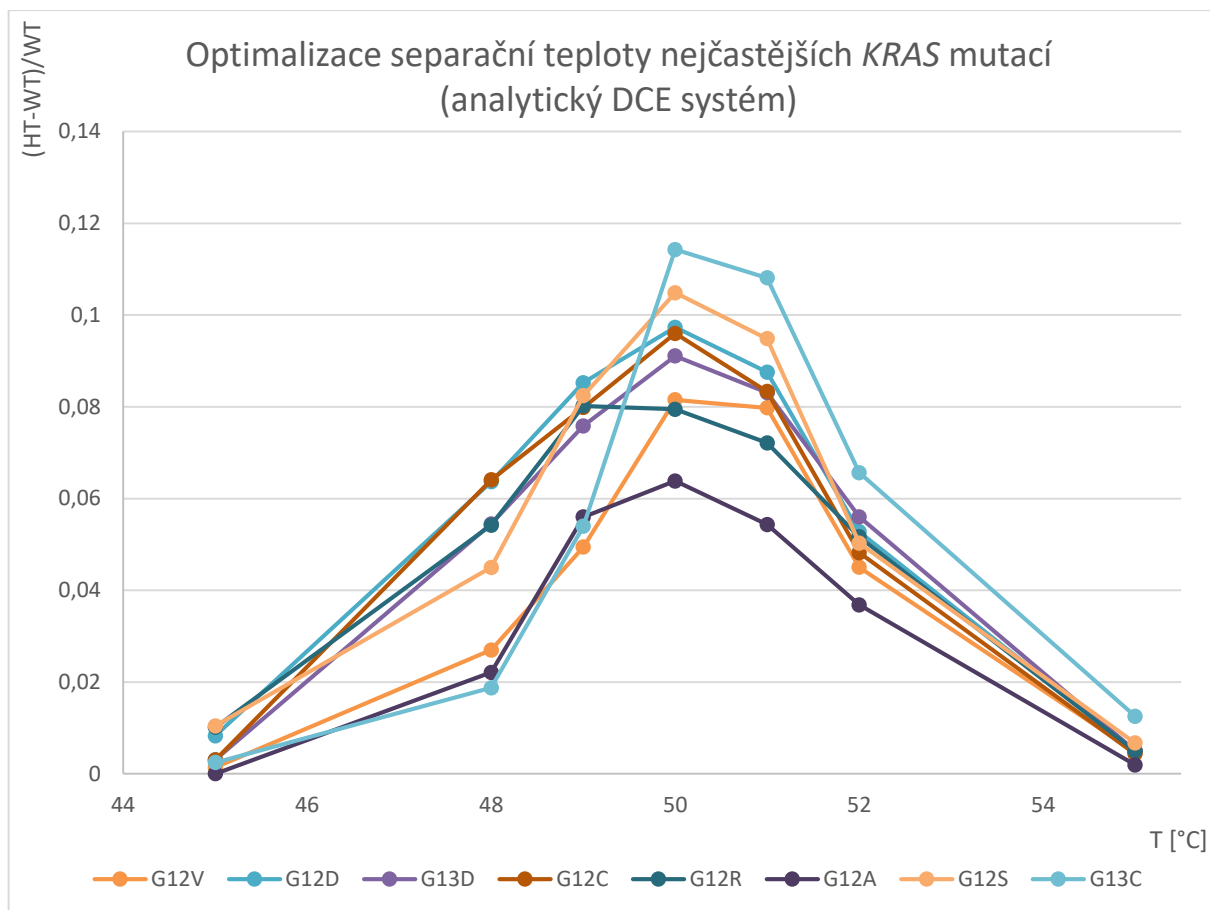
5.1 Optimalizace mikropreparativního DCE systému

Nejprve byl v laboratoři přístroj sestaven, po správném zapojení všech součástí bylo v rámci zprovoznění přístroje sledováno ustalování detektoru, který představoval jednu z nejdůležitějších součástí celého systému. Sledována byla především tendence ustalování signálu detektoru od výměny separační kapiláry až po úplné ustálení, ke kterému došlo až po několika hodinách (Kapitola 4.3.5 Mikropreparativní DCE systém, Obrázek 8).

Druhou důležitou součástí experimentálního systému představovala termostatická jednotka, která byla z důvodu správné teplotní kontroly celého systému nejprve řádně proměřena, včetně teplotní stability systému. Termostat byl během výzkumu zapínán vždy pouze jednou denně před každou řadou pokusů, přičemž ustalování teploty probíhalo cca 20 min. Během pokusů bylo v rámci tolerance zaznamenáno vychýlení teploty o 0,2 °C (Kapitola 4.3.5 Mikropreparativní DCE systém, Obrázek 9).

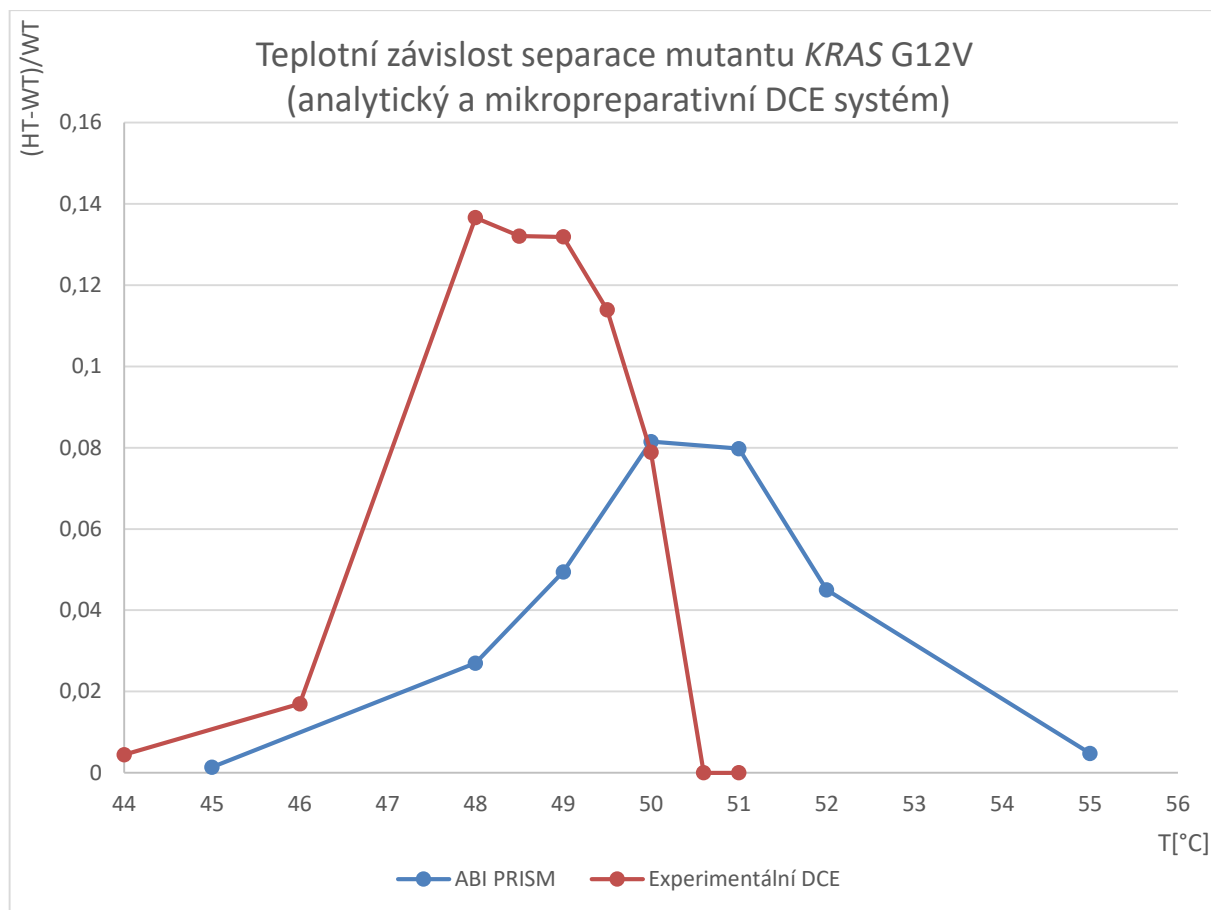
Po zprovoznění a následném ustálení detekční a termostatické jednotky experimentálního systému byla pozornost věnována odezvám detektoru testovaného na přítomnost fluorescenčně značených roztoků o různých koncentracích. Zkoumáno bylo 5 roztoků, jejichž signál podle očekávání prokazoval lineárně vzrůstající tendenci (Kapitola 4.3.5 Mikropreparativní DCE systém, Obrázek 10).

Po stanovení odezvy detekční jednotky byla optimalizována separační teplota mikropreparativního systému, neboť ta je pro průběh duplexní analýzy nezbytná. Teplota experimentálního DCE systému byla přejata z analytického systému ABI PRISM 3100 a následně byla optimalizována. Optimální separační teplota onkogenu *KRAS* byla na kapilárním analytickém systému (ABI PRISM 3100) určena na základě analýzy 8 nejčastějších mutací, všechny mutace byly separovány při 7 různých teplotách za identických podmínek. Na základě výsledků byla optimální teplota analytického systému stanovena na 50,0 °C (Obrázek 11).



Obrázek 11: Vyhodnocení separační účinnosti jako relativního rozdílu pohybu mutované a nemutované alely u nejčastějších mutačních typů onkogenu *KRAS* na analytickém DCE systému (ABI PRISM 3100). Na grafu je, pro většinu mutantních forem, viditelná maximální separace v blízkosti teploty 50 °C. (G12V: Gly12Val, G12D: Gly12Asp, G13D: Gly13Asp, G12C: Gly12Cys, G12R: Gly12Arg, G12A: Gly12Ala, G12S: Gly12Ser, G13C: Gly13Cys, WT: Wild Type, nemutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA)

Oproti analytickému systému byla separační teplota mikropreparativního DCE systému vybaveného frakčním kolektorem vymezena na základě analýzy mutace G12V (Gly12Val) při 7 různých teplotách. Výsledná teplota byla ověřena analýzou vzorku obsahujícího mutaci G12D (Gly12Asp) a stanovena byla na 49,0 °C. Porovnání separačních teplot analytického DCE systému a mikropreparativního DCE systému s frakčním kolektorem je znázorněno na Obrázku 12.

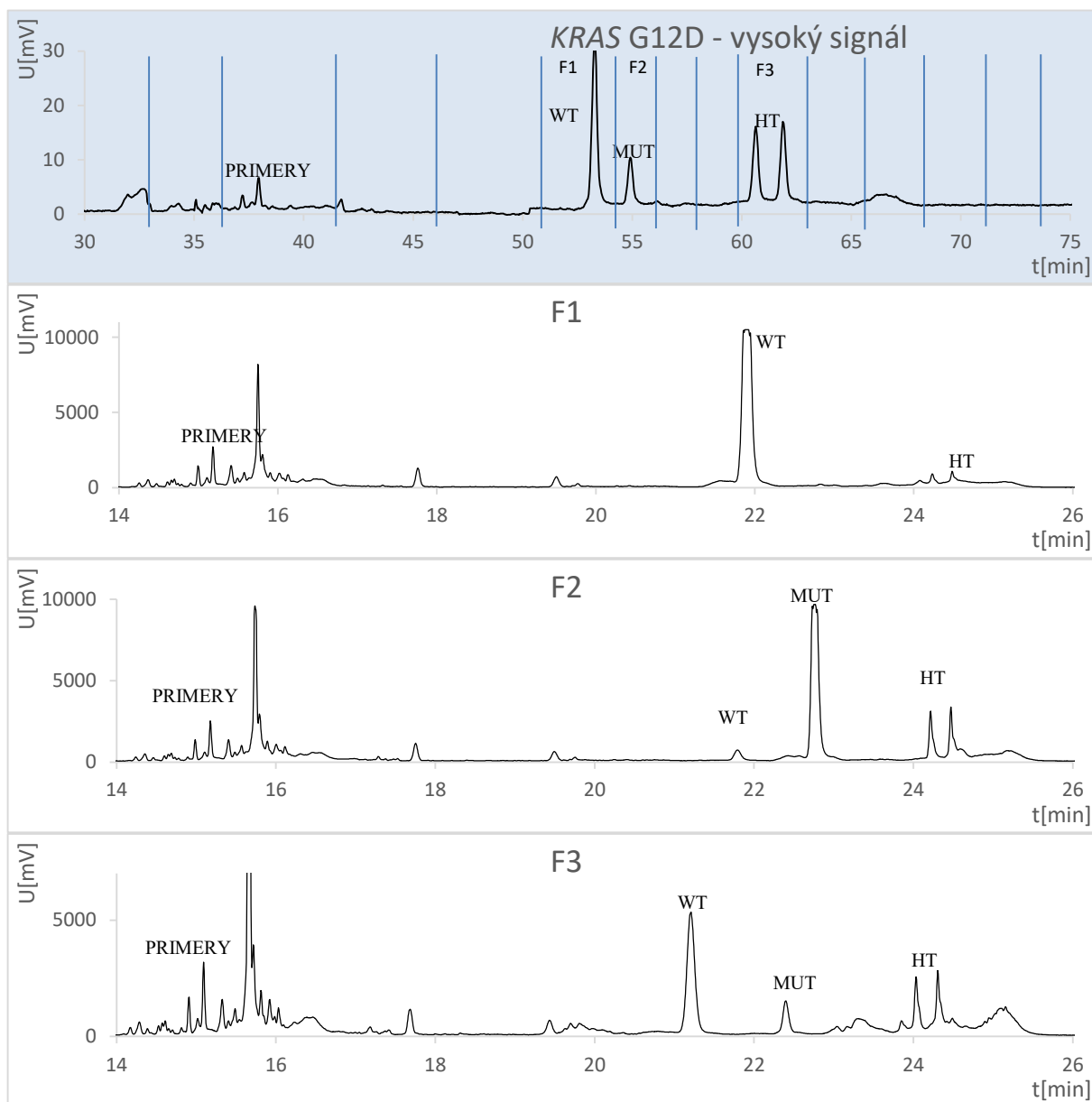


Obrázek 12: Porovnání optimální separační teploty mutace G12V onkogenu *KRAS* na analytickém systému ABI PRISM (modře) a experimentálním DCE systémem s frakčním kolektorem (hnědě). Znáznorněn je relativní rozdíl pohybu mutované a nemutované alely v závislosti na teplotě. Na grafu je viditelný rozdíl optimální teploty obou přístrojů. (G12V: Gly12Val, WT: Wild Type, nemutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA)

5.2 Frakční kolekce

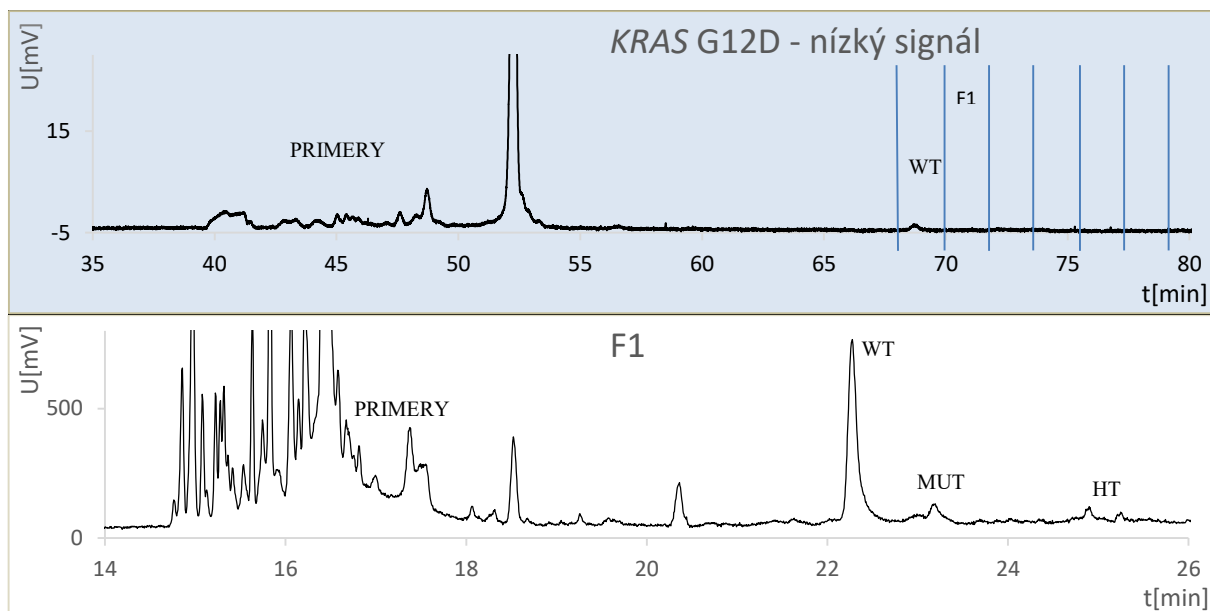
Na počátku výzkumu byl k vývoji a optimalizaci metody použit vzorek tkáňové biopsie s potvrzenou *KRAS* mutací (G12V resp. G12D) poskytující během separačního runu vysoký signál. Vyhodnocením výsledků jednotlivých frakcí byl na počátku kolekce zjištěn záchyt frakcí neobsahujících DNA, dále byly v uvedeném pořadí přítomny frakce se samotným nemutovaným fragmentem, s mutovanou formou DNA přítomnou v jedné frakci a následně s izolovanými heteroduplexy (v následujících frakcích byla zaznamenána přítomnost všech 4 píků najednou). Ke konci kolekce bylo zaregistrováno postupné snižování signálu všech píků, až k úplnému vymizení.

Pro přesnější představu jsou na Obrázku 13 znázorněny jednotlivé izolované fragmenty s uvedenými výsledky vybraných důležitých frakcí po analýze na standardním kapilárním přístroji ABI PRISM (pro lepší názornost byl vybrán vzorek s *KRAS* mutací G12D).



Obrázek 13. Znárodnění principu frakční kolekce na vzorku tkáňové biopsie s detekovanou substituční mutací G12D v kodónu 12 onkogenu *KRAS*. Horní záznam označený modrou barvou představuje signál detektoru mikropreparativního DCE systému, modrými čarami jsou odděleny jednotlivé izolované fragmenty. Tři frakce označené na horním záznamu „F1, F2, F3“ jsou na dalších záznamech uvedeny po analýze na kapilárním přístroji ABI PRISM (F1: frakce s nemutovanou DNA, F2: frakce s mutovanou DNA, F3: frakce s heteroduplexy). (G12D: Gly12Val, WT: Wild Type, nemutovaná forma DNA, MUT: mutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA)

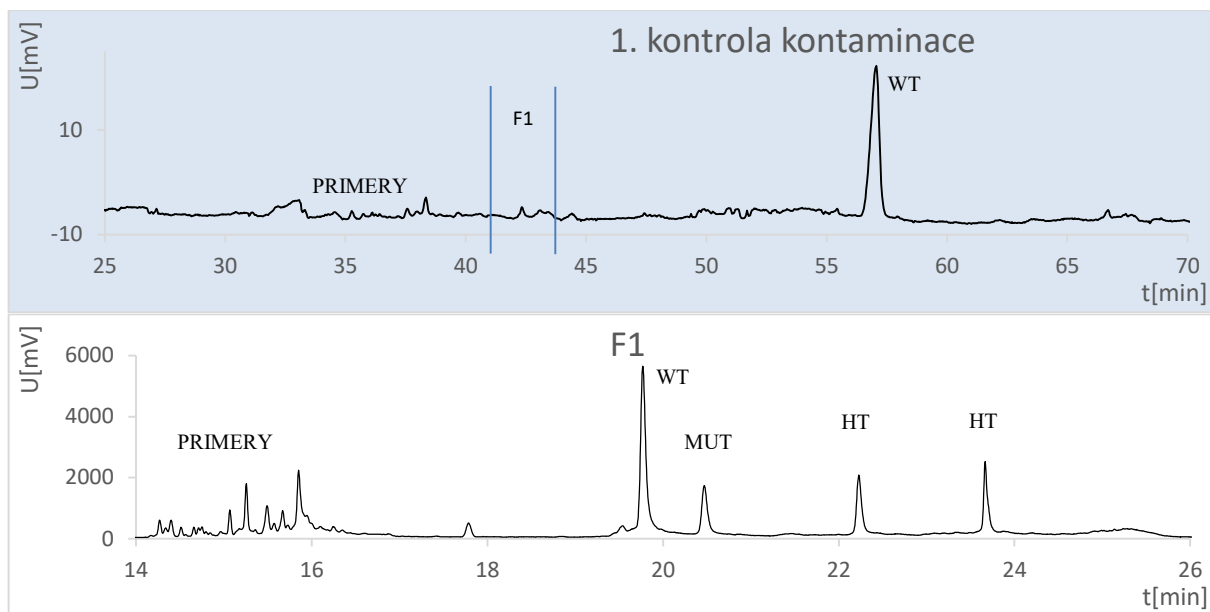
Pro názorné předvedení použití technologie v případech, kdy mutantní fragmenty nejsou při analýze standardní DCE detekovatelné, byla izolace jednotlivých fragmentů vzorku pro další zpracování úspěšně provedena nejen ze vzorků poskytujících vysoký signál, ale také ze vzorků s nízkým nebo žádným signálem (Obrázek 14).



Obrázek 14. Znárodnění kolekce vzorku krevní plazmy s detekovanou substituční mutací G12D v kodónu 12 onkogenu *KRAS*. Horní záznam byl pořízen z detektoru během frakční kolekce, modrými čarami jsou naznačeny jednotlivé fragmenty. Dolní záznam „F1“ prezentuje jedinou pozitivní frakci po analýze na kapilárním přístroji ABI PRISM. (G12D: Gly12Val)

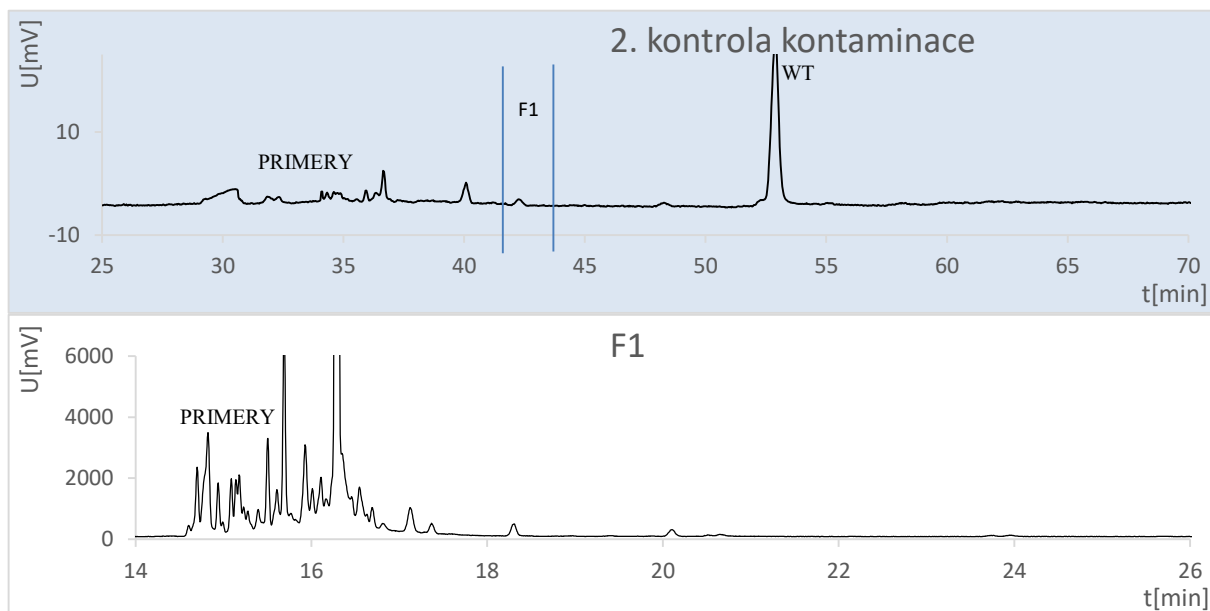
5.2.1 Kontaminace

Při práci s PCR metodou vykazující extrémní citlivost vždy existuje případné riziko kontaminace, v daném případě se jednalo o kontaminaci separační křemenné kapiláry. Proto byla v počátečních fázích výzkumu provedena kontrola kontaminace kolekcí WT DNA pocházející z PK PCR amplifikace I. Jak naznačují výsledky zachycené na Obrázku 15, kontaminace byla objevena pouze v počátečních frakcích, v dalších frakcích byla prokázána tendence snižování signálu kontaminace. Na základě výsledků lze dále předpokládat úplné vymizení kontaminace ještě před zaznamenáním signálu testovaného vzorku.



Obrázek 15. První kontrola kontaminace separační kapiláry. První záznam označený modrou barvou zachycuje záznam detektoru mikropreparativního DCE systému, modré čáry ohraničují izolovanou frakci. Dolní záznam označený „F1“ znázorňuje izolovanou frakci po analýze na kapilárním přístroji ABI PRISM. (WT: Wild Type, nemutovaná forma DNA, MUT: mutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA, PK: pozitivní kontrola PCR amplifikace I)

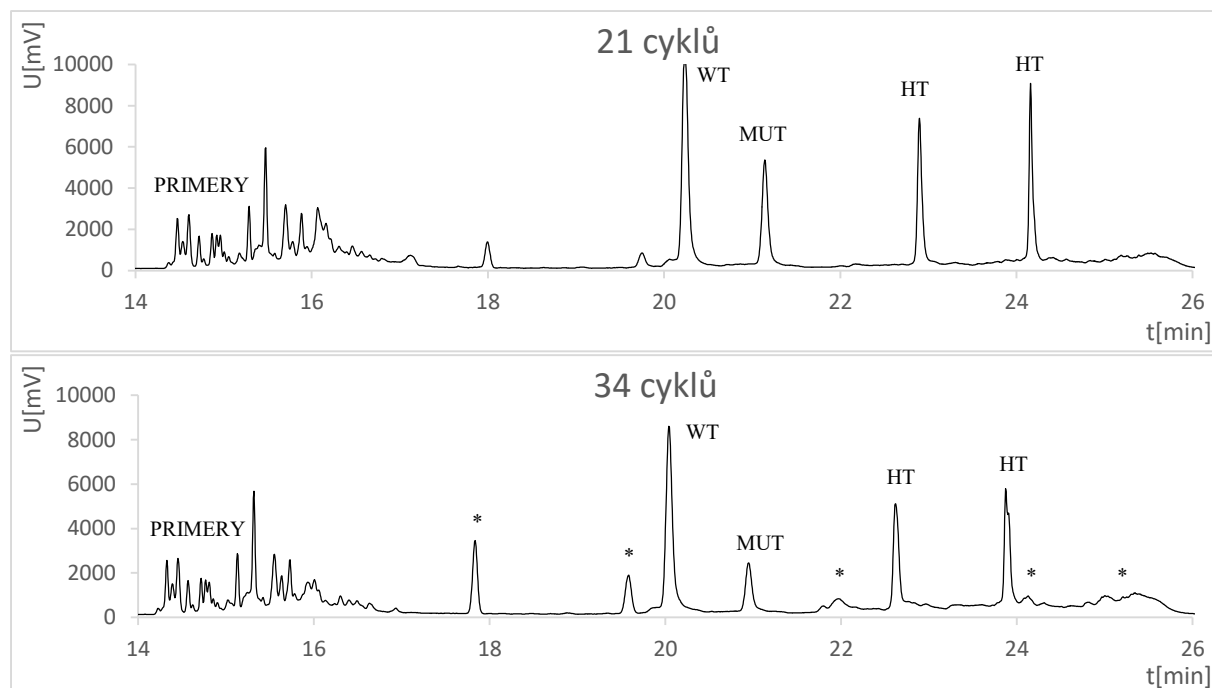
Po ověření reálné možnosti kontaminace byly do protokolu mikropreparativní DCE přidány před každým nadávkováním vzorku preventivní proplachy křemenné kapiláry vodou. Následně byla přítomnost kontaminace překontrolována novou frakční kolekcí WT DNA. Výsledky zachycené na Obrázku 16 dokazují snížení resp. eliminaci kontaminace.



Obrázek 16. Druhá kontrola kontaminace křemenné kapiláry. První záznam (modrá barva) zachycuje signál detektoru experimentálního systému, modré čáry označují oddělenou frakci. Dolní záznam „F1“ představuje záznam izolované frakce po analýze na analytickém systému ABI PRISM. (WT: Wild Type, nemutovaná forma DNA)

5.2.2 Počet cyklů PCR amplifikace II

Jako další preventivní opatření předcházející kontaminaci byl pro finální metodu snížen počet PCR cyklů. Na Obrázku 17 jsou porovnány výsledky PCR reakce při 21 a 34 cyklech, přičemž z důvodu větší amplifikace nespécifických vedlejších produktů byl za optimální zvolen počet 21 cyklů.



Obrázek 17. PCR amplifikace II provedená při 21 a 34 cyklech. Hvězdičkou je označen signál nespécifických vedlejších produktů. (WT: Wild Type, nemutovaná forma DNA, MUT: mutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA)

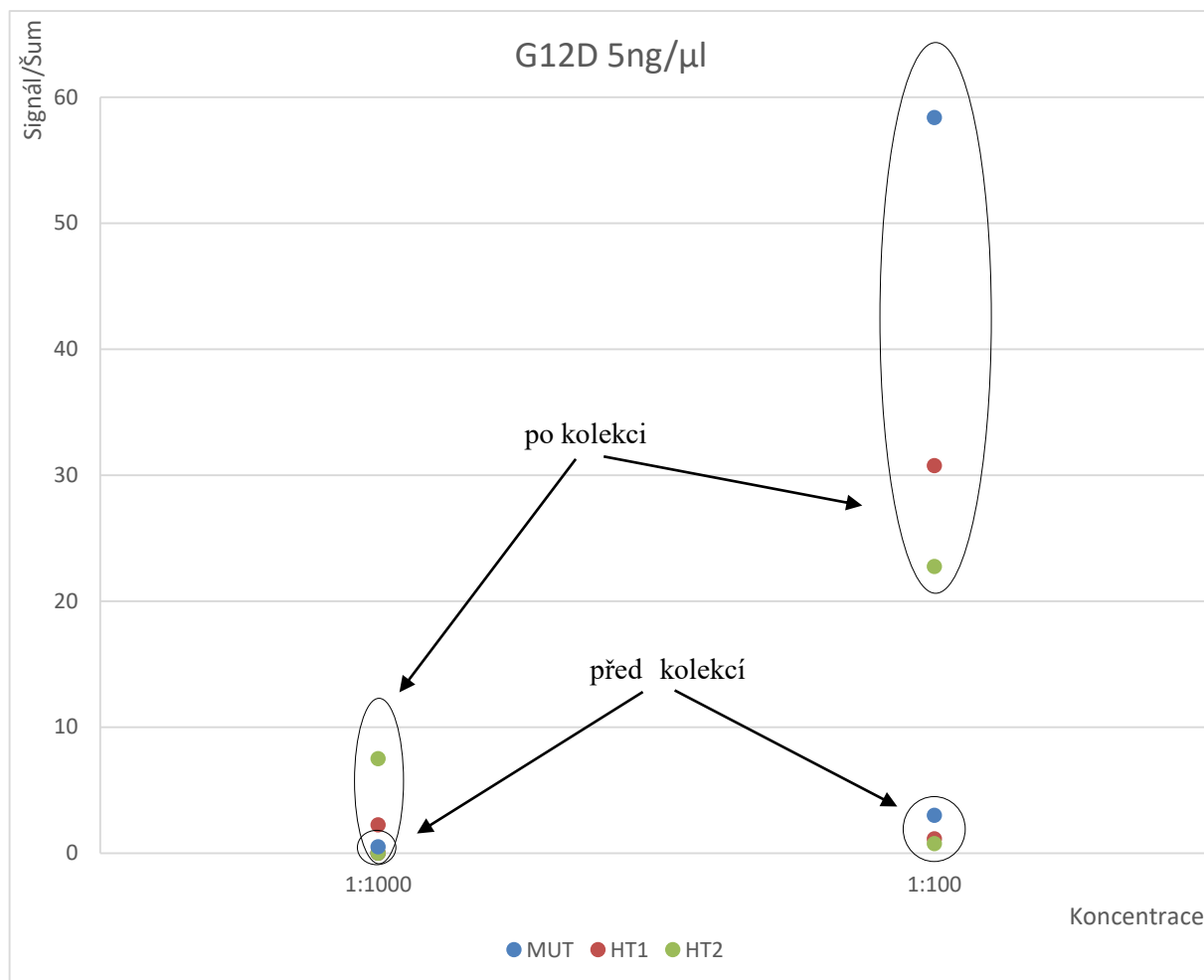
5.2.3 Kvantifikace

5.2.3.1 Kvantifikace standardní DNA

Po optimalizaci mikropreparativního DCE systému s frakčním kolektorem byla z důvodu přesného stanovení analytické citlivosti experimentálního systému provedena kvantifikace standardní DNA (mutace G12D) se známým poměrem zastoupených mutovaných fragmentů ve vzorku.

Jak lze vyvodit z Obrázku 18, mutovaný fragment byl zachycen ve všech vzorcích, včetně vzorku s prokázaným zastoupením 0,1 % mutantních kopií DNA (1 mutovaný fragment v 1000 nemutovaných), čímž došlo oproti konvenčním kapilárním analyzátorům s typickou citlivostí 1 %, ke zvýšení citlivosti analýzy o 1 řád.

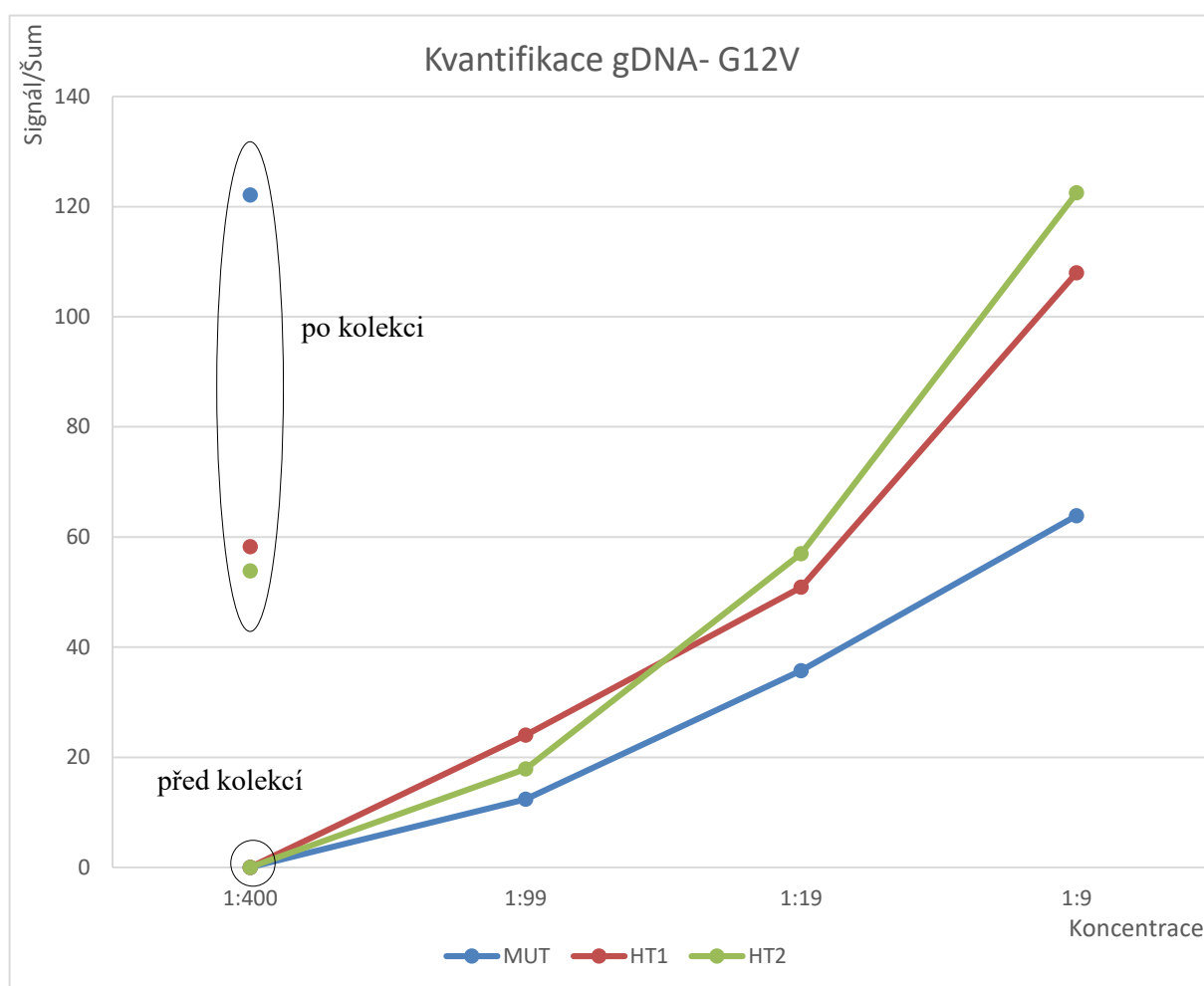
Zde uvedené výsledky jsou v souladu s předpokládanou citlivostí metody stanovenou na základě pracovní hypotézy (viz kapitola 6 Diskuze). Zpozorován byl mj. vliv vstupního množství DNA vzorku, neboť při vyšších koncentracích byl zaznamenán zvýšený signál nespecifických vedlejších produktů.



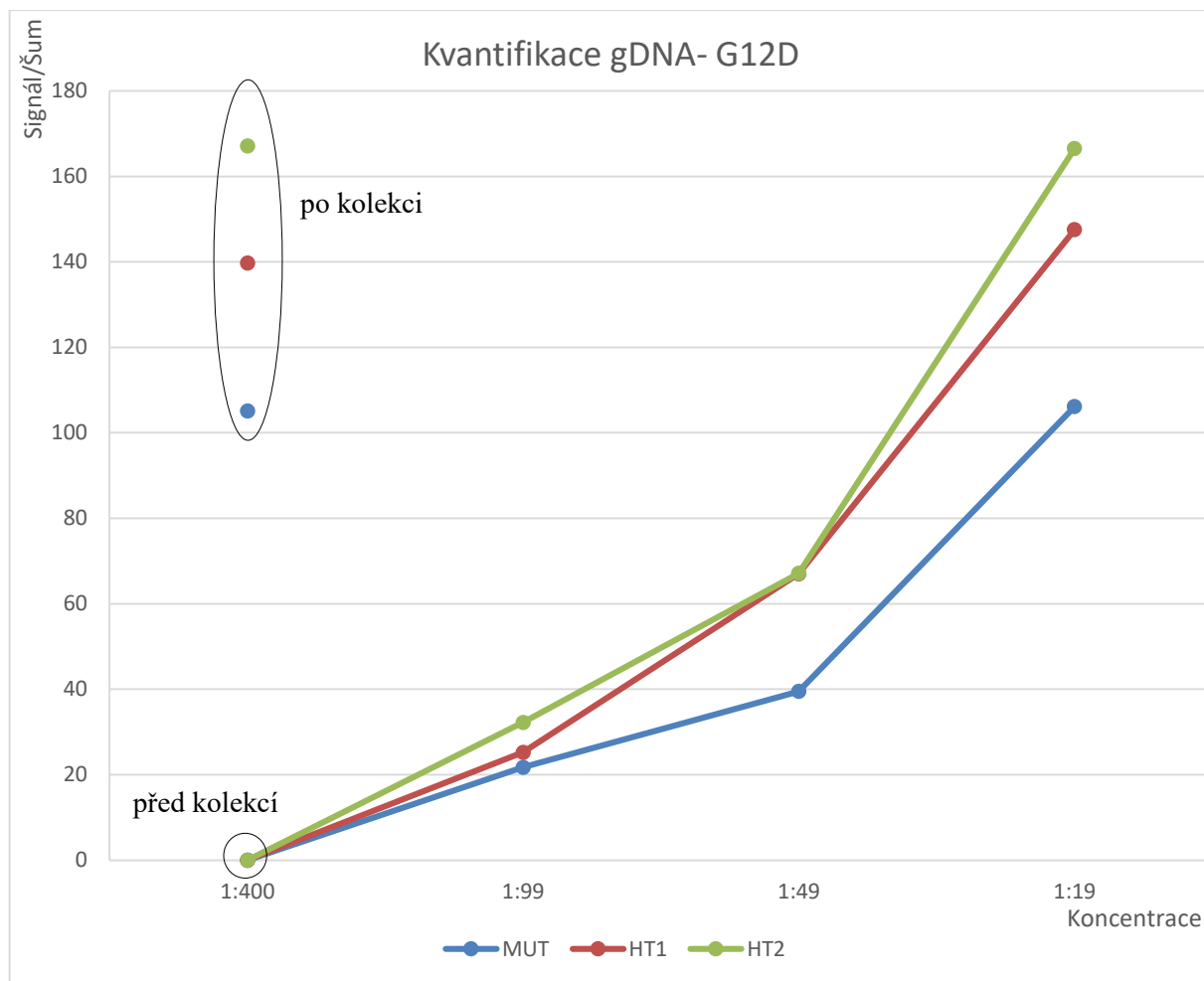
Obrázek 18. Kvantifikace standardní DNA s mutací G12D onkogenu *KRAS*. Na grafu je pro názornější zobrazení přínosu frakční kolekce zachycena intenzita signálu mutovaných fragmentů DNA (MUT, HT1, HT2) v závislosti na koncentraci vzorku před frakční kolekcí i po kolekci. Hodnoty jsou uvedeny po analýze na kapilárním přístroji ABI PRISM. (G12D: Gly12Asp, MUT: mutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA)

5.2.3.2 Kvantifikace genomickou DNA

Ověření předchozího měření citlivosti bylo provedeno na vzorcích pocházejících z reálných nádorů s předpokládaným 50% obsahem mutovaných fragmentů. U obou typů mutací (G12V, G12D) byla po frakční kolekcí prokázána mutace ve vzorku s odhadnutým obsahem 0,25 % mutované DNA. Potvrzena byla tedy nižší citlivost experimentálního systému, než jaká byla zjištěna předchozím měřením na vzorku standardní DNA. Data před frakční kolekcí a po frakční kolekcí jsou zaznamenána na Obrázku 19 (mutace G12V) a na Obrázku 20 (mutace G12D).



Obrázek 19. Kvantifikace genomickou DNA s prokázanou *KRAS* mutací G12V. Na grafu je znázorněno obohacení mutančních frakcí vzorku po frakční kolekcí, dále je také zachycena stoupající intenzita signálu mutovaných fragmentů DNA (MUT, HT1, HT2) v závislosti na koncentraci směsi. Spojené body grafu představují hodnoty před frakční kolekcí, samotné body označené kroužkem znázorňují intenzitu signálu po frakční kolekcí. (gDNA: genomická DNA, G12V: Gly12Val, MUT: mutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA)

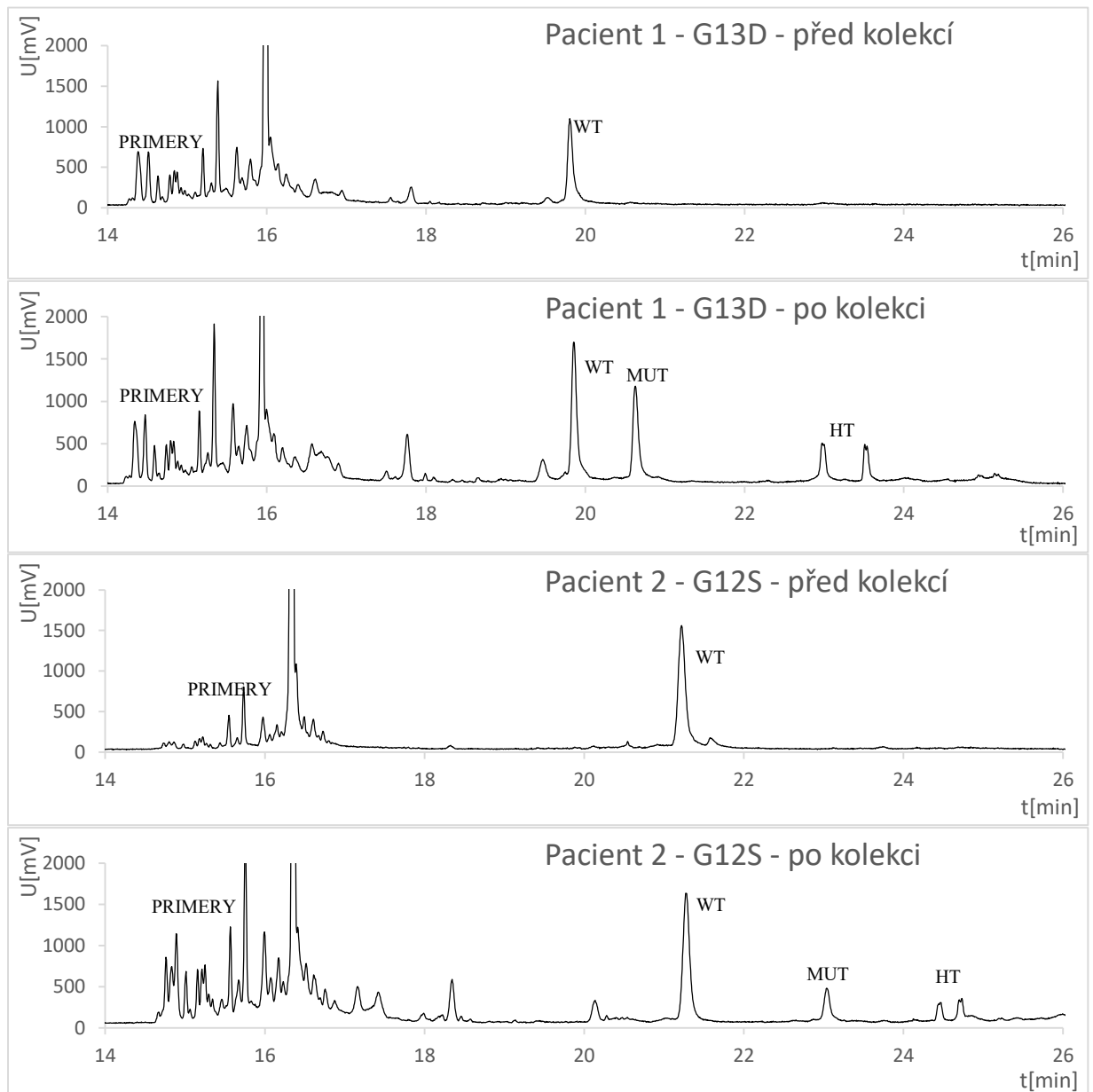


Obrázek 20. Kvantifikace genomickou DNA s prokázanou *KRAS* mutací G12D. Křivka grafu zachycuje signál píků představujících mutované fragmenty DNA (MUT, HT1, HT2). Porovnány jsou hodnoty vzorků jednotlivých koncentrací před frakční kolekcí a po ní. Na grafu lze mimo obohacení mutantní frakce po frakční kolekcí opět pozorovat stoupající tendenci signálu v závislosti na zvyšující se koncentraci vzorku. (gDNA: genomická DNA, G12D: Gly12Asp, MUT: mutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA)

5.2.4 Klinická část výzkumu

Do této validační studie byly zařazeny krevní vzorky pacientů ve stádiu IV (přítomny metastázy), u kterých je vysoká pravděpodobnost výskytu ctDNA v krevní plazmě (Leon *et al.*, 1977; Fournié *et al.*, 1995). Z dalších literárních zdrojů však vyplývá, že u některých pacientů jsou naopak celková množství cirkulujících ctDNA fragmentů na velmi nízké úrovni (Jahr *et al.*, 2001; Taly *et al.*, 2013). Z tohoto důvodu má zcela zásadní roli analytická citlivost použité metody. Vzorky použité na validační studii byly ctDNA-negativní při použití standardní DCE metody v citlivosti cca 1 %.

Z celého počtu 21 vzorků byla ctDNA detekována u 12 z nich (různé mutace), což představuje 57% účinnost metody. Na Obrázku 21 jsou uvedeny 2 příklady reálných vzorků pacientů se zachycenou ctDNA.



Obrázek 21. Výsledky analýzy 2 reálných krevních vzorků pacientů s detekovanou mutací onkogenu *KRAS* (krevní plazma). Horní záznam znázorňuje vzorek pacienta po první analýze (před frakční kolekci), dolní záznam po frakční kolekci. Oba výsledky jsou uvedeny po analýze na kapilárním přístroji ABI PRISM. (G13D: Gly13Asp, G12S: Gly12ser, WT: Wild Type, nemutovaná forma DNA, MUT: mutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA)

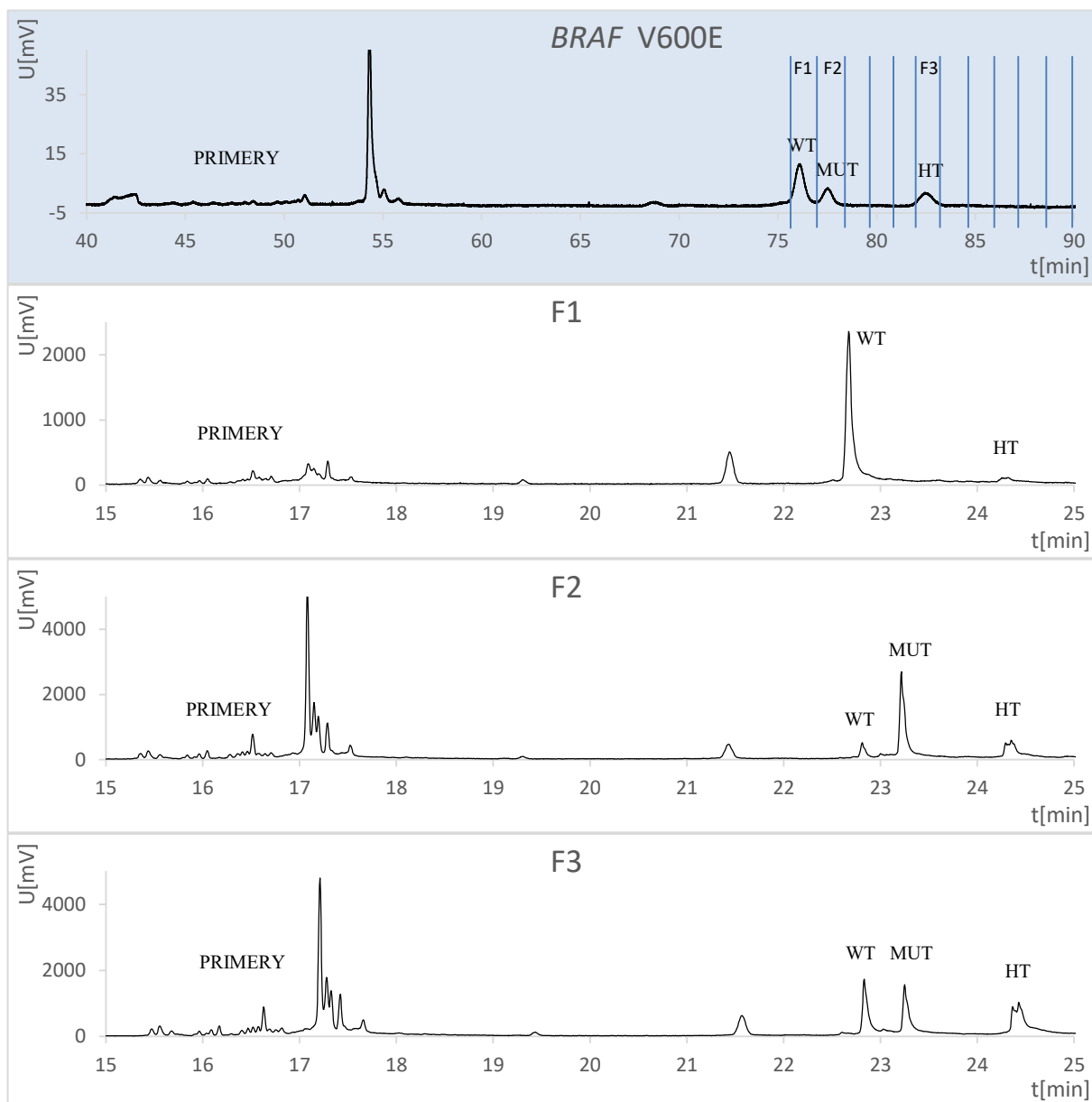
5.2.5 Optimalizace dalších významných molekulárních markerů

5.2.5.1 *BRAF*

Po zprovoznění a klinické validaci zařízení byla provedena optimalizace mikropreparativního DCE systému za účelem detekce somatické mutace (V600E) v genu *BRAF* (vzorek tkáňové biopsie s potvrzenou mutací). Jak bylo uvedeno v úvodní části, tato mutace má zcela zásadní význam, neboť jako u jediné protein-kinázy rodiny Raf byla prokázána přímá spojitost s nádorovým onemocněním a v současné době se tak stává cílem biologické léčby.

Vzorek tkáňové biopsie byl na experimentálním systému rozdělen, nicméně oproti onkogenu *KRAS* nebyly z důvodu nižší citlivosti přístroje detektorem zobrazeny 4 píky, ale pouze 3 (oba heteroduplexní píky byly zobrazeny jako jeden), dále byla provedena izolace fragmentů s následnou amplifikací a analýzou na kapilárním přístroji ABI PRISM. Také u tohoto markeru byly zachyceny prázdné frakce, ale také frakce obsahující nemutované i mutované fragmenty DNA (Obrázek 22).

Po optimalizaci systému byla provedena validační analýza 2 vzorků krevní plazmy reálných pacientů (metastatický kolorektální karcinom), u kterých byla tato mutace zachycena v nádorové tkáni a je tedy vysoká pravděpodobnost její přítomnosti v krevním oběhu. Oba vzorky byly vyhodnoceny negativně, přítomnost ctDNA v krvi nebyla prokázána (výsledky nejsou vyobrazeny).



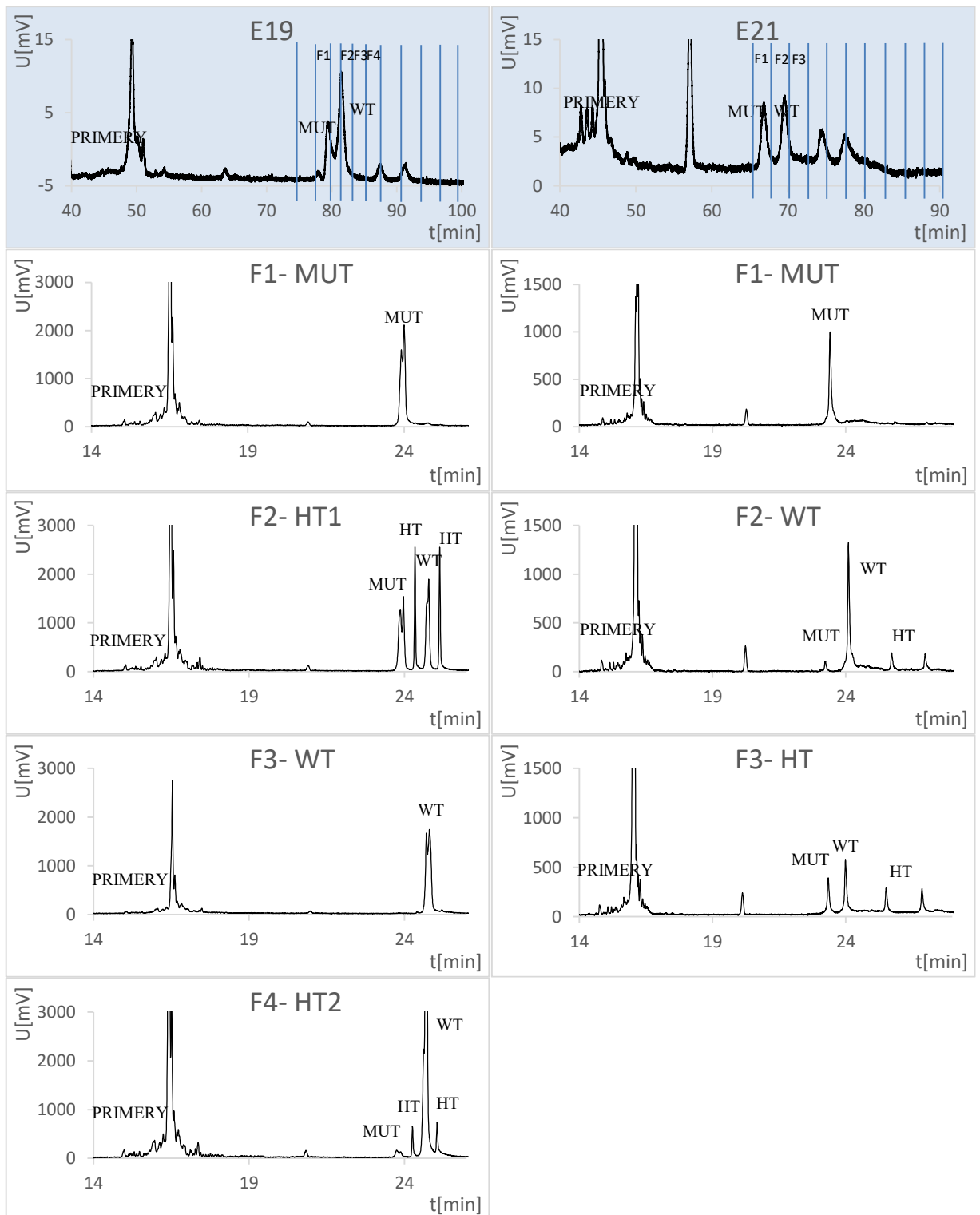
Obrázek 22: Záznam frakční kolekce vzorku tkáňové biopsie s potvrzenou mutací V600E onkogenu *BRAF*. První záznam zobrazuje separaci fragmentů DNA na mikropreparativním DCE systému (modré čáry představují odběr frakcí). Další 3 záznamy zachycují klíčové frakce po analýze kapilárním přístrojem ABI PRISM: ve frakci F1 byl izolován nemutovaný fragment, frakce F2 obsahuje pouze mutovaný fragment, frakce F3 zachycuje oba heteroduplexy (spojení dvou heteroduplexních píků do 1 je zapříčiněno o 1 °C vyšší teplotou přístroje ABI PRISM). (Wild Type, nemutovaná forma DNA, MUT: mutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA)

5.2.5.2 *EGFR*

Posledním testovaným markerem byl onkogen *EGFR*, neboť tento marker je v případě karcinomu plic pozitivním prediktorem léčebné odpovědi na anti-*EGFR* biologickou léčbu. Jak bylo uvedeno dříve, pacienti s mutovanou formou genu mají profit z léčby monoklonálními protilátkami.

V případě tohoto onkogenu byla detekce zaměřena na dvě nejčastější mutace (deleční mutace E19, substituční mutace E21). Obdobně separaci markeru *BRAF* i v tomto případě nebyly z důvodu nižší citlivosti experimentálního přístroje detektorem zachyceny 4 píky, ale tentokrát pouze 2 (zobrazeny byly pouze píky MUT a WT).

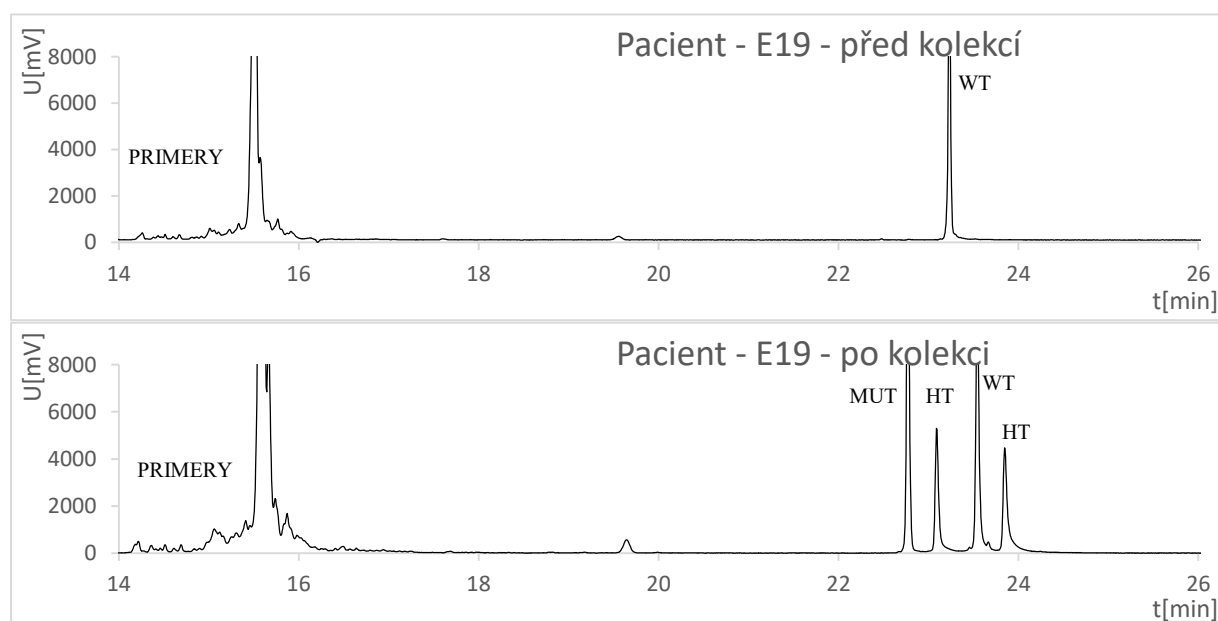
I u tohoto markeru byly izolovány nejen prázdné frakce, ale také frakce obsahující mutované i nemutované fragmenty DNA. V případě mutace E19 byly pozorovány 4 klíčové frakce, v případě substituční mutace E21 byla (oproti genu *KRAS* či *BRAF*) pouze prokázána záměna pořadí frakcí obsahujících mutované (frakce MUT) a nemutované fragmenty (frakce WT). Výsledky jsou zachyceny na Obrázku 23.



Obrázek 23. Frakční kolekce markeru E19 a E21. V levém sloupečku jsou uvedeny záznamy prezentující výsledky markeru E19, v pravém jsou znázorněny výsledky analýzy věnované markeru E21. Modré záznamy jsou pořízeny z detektoru, ostatní záznamy pochází z přístroje ABI PRISM. Modrými čarami jsou znázorněny odběry frakcí, pro lepší přehled názvy grafů obsahují klíčový fragment. (*EGFR*: Receptor epidermálního růstového faktoru, WT: Wild Type, nemutovaná forma DNA, MUT: mutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA)

Po izolaci frakcí markeru E19 a E21 s pozitivním výsledkem byla provedena validace systému na 7 vzorcích krevní plazmy (karcinom plic) s očekávanou mutací genu *EGFR* (5 vzorků s mutací E19, 2 vzorky s mutací E21). Jak bylo uvedeno dříve, separační podmínky obou markerů byly shodné a následná vyšetření vzorků krevní plazmy mikropreparativním DCE systémem tak proběhla u všech vzorků za stejných podmínek. Ze 7 vyšetřovaných vzorků byla po PCR amplifikaci II a analýze na přístroji ABI PRISM prokazatelně zjištěna přítomnost mutace E19 pouze u 2 pacientů, přítomnost mutace E21 nebyla detekována ani v jednom z obou případů (Obrázek 24).

Na vzorku krevní plazmy pacienta s mutací E19 byla prokázána funkčnost mikropreparativního systému nejen z pohledu detekce různých molekulárních markerů (onkogen *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*) z různých typů vzorků (tkáňová biopsie, cytologický nátěr, krevní plazma), ale také z pohledu přítomnosti jiného nádorového onemocnění (kolorektální karcinom, karcinom plic).



Obrázek 24. Analýzy vzorku krevní plazmy s pozitivní mutací E19. První záznam představuje vzorek krevní plazmy pacienta po první analýze (před frakční kolekcí), druhý záznam po frakční kolekcí, oba záznamy jsou uvedeny po analýze na kapilárním přístroji ABI PRISM. (E19: deleční mutace genu *EGFR* v exonu 19, WT: Wild Type, nemutovaná forma DNA, MUT: mutovaná forma DNA, HT: heteroduplexy, mutovaná forma DNA).

6. Diskuze

Nádorová onemocnění jsou v celosvětovém měřítku jednou z nejčastějších příčin úmrtí (Ferlay *et al.*, 2015), proto je důležitá jejich včasná diagnóza. Ta je klíčová pro následnou volbu nejvhodnější léčebné metody, kterou může být např. chirurgický zákrok, radioterapie, chemoterapie, biologická léčba či jejich vzájemné kombinace (Tong *et al.*, 2017; Vogel *et al.*, 2017). Neoddělitelnou součástí protinádorové léčby je kromě sledování a vyhodnocování odpovědi pacienta na léčbu, také detekce případné recidivy (návratu) či progresu (postupu) onemocnění vedoucí ke změnám v podávané léčbě (Yiu & Yiu, 2016). Ke stanovení diagnózy či sledování léčby jsou nejčastěji používány zobrazovací techniky zahrnující především počítačovou tomografii (CT), magnetickou rezonanci (MR) či ultrazvuk (UZ) (Catalano *et al.*, 2017). V případě pozitivního nálezu následuje odběr vzorku tkáně (tzv. tkáňová biopsie), avšak v poslední době je stále více zkoumána možnost vyšetřování molekulárních DNA markerů (somatických mutací) uvolňovaných z nádoru do krevního oběhu. Pro vyšetřování této cirkulující nádorové DNA (Circulating tumor DNA, ctDNA) se ustálilo označení „tekutá biopsie“, která se oproti tkáňové biopsii vyznačuje především nesrovnatelně šetrnějším způsobem odběru (Murtaza *et al.*, 2013). Dále také, na rozdíl od odběru tkáně, podává informaci o celkovém stavu onemocnění, včetně přítomnosti nádorových buněk v různých částech těla pacienta, čímž je umožněno případné odhalení progresu (Benesova *et al.*, 2013).

V rámci práce byl sestaven a vyvinut nový systém, což znamená, že nelze použít standardní formu diskuze ke zhodnocení a porovnání jednotlivých cílů práce s výsledky stejných metod v jiných laboratořích. Zhodnoceny tedy budou zejména vlastní výsledky ve spojitosti s přínosem analýzy ať už z pohledu přístupu k pacientovi nebo po stránce finanční nákladnosti. Vyšetření touto metodou totiž vykazuje mnohem šetrnější přístup k pacientovi, což v praxi znamená pouze odběr krevního vzorku a zároveň je finančně méně náročné, neboť ze současných výsledků vyplývá, že celková analýza je mnohem levnější.

Základním parametrem metod používaných pro vyšetření ctDNA z krevní plazmy je vysoká citlivost umožňující detekci somatických mutací, které jsou ve vzorku přítomny v menšinovém zastoupení. Cílem této práce byl proto experimentální vývoj a validace nové metody umožňující obohacení mutantních frakcí za účelem zvýšení zachytu ctDNA z krevní plazmy. Tohoto obohacení je dosaženo oddělením DNA fragmentu s jeho následnou amplifikací. Obohacené frakce byly dále analyzovány metodou denaturační kapilární

elektroforézy (Denaturing capillary electrophoresis, DCE) fungující na základě rozdílných denaturačních vlastností mutovaných a nemutovaných fragmentů.

Za účelem izolace mutantních frakcí byl použit experimentální mikropreparativní DCE systém sestavený ve spolupráci s Ústavem analytické chemie AV ČR v Brně. Jednoduché a poměrně úsporné řešení detekce a správného načasování odběru DNA fragmentů představovala fluorescenční detekce za použití nízkonákladové LED. Dále byla použita optická vlákna vedoucí excitační a detekční záření a ke sběru detekované fluorescence byla zvolena fotodioda. Tento nízkonákladový detektor vykazoval v případě fluorescenční značky FAM (carboxyfluorescein) analytickou citlivost na úrovni 10^{-8} M, což bylo prokázáno proléváním fluorescenčně značeného primeru. Tato citlivost je sice o 3 až 4 řády nižší ve srovnání s analytickými přístroji (např. DNA sekvenátory ABI PRISM), avšak experimentální DCE systém představuje pouze jednu část dlouhého řetězce činností v procesu analýzy vzorků. Ve výsledku je třeba porovnávat celkovou analytickou citlivost popsaného procesu, nikoliv pouze jednoho konkrétního kroku. Přínos fluorescenčního detektoru se zmíněnou nižší citlivostí spočívá zejména v upřesnění správného načasování odběru jednotlivých frakcí určených k dalšímu zpracování a jeho horší citlivost tak nemá negativní vliv na výsledky celé analýzy.

Na základě poznatků získaných v průběhu testování metodiky a optimalizace postupů byl tento systém průběžně upravován. Mezi hlavní úpravy lze zařadit upevnění detektoru provedené kvůli kolísání signálu, zprovoznění automatického ovládání kolektorového válce určeného ke sběru jednotlivých frakcí, nebo zlepšení teplotní kontroly, jejíž nestabilita zprvu vedla k nízké reprodukovatelnosti výsledků. Bylo zjištěno, že tato nestabilita nastává výhradně v průběhu 20–30 minut od spuštění termostatického bloku a proto bylo za nejvhodnější postup zvoleno zapínání termostatické jednotky pouze jednou denně (před prvním pokusem). Zaznamenané kolísání hodnot i po ustálení, v rozmezí $\pm 0,2$ °C, je z pohledu reprodukovatelnosti dat zcela postačující a na získané výsledky nemá žádný vliv.

Za účelem testování oddělení a izolace mutantních fragmentů byly z analytického DCE systému (ABI PRISM) převzaty podmínky analýzy (chemikálie, parametry dávkování, teploty atd.) a na mikropreparativním systému byly dále optimalizovány. Mezi hlavní úpravy patřilo zejména použití jiného separačního polymeru, neboť polymer POP-4 (mikropreparativní systém) se oproti polymeru POP-7 (analytický systém ABI PRISM) vyznačuje menší viskozitou. Nižší vazkost tak umožnila ruční plnění polymeru do separační kapiláry experimentálního systému, zatímco do kapilárního přístroje ABI PRISM je polymer plněn pod vysokým tlakem a vyšší viskozita tak nepředstavuje problém. Zředění polymeru POP-7

reakčním pufrem sice umožnilo jeho snadné ruční plnění do kapiláry, nicméně tím došlo ke zhoršenému rozdělení mutantních DNA fragmentů. Z tohoto důvodu byl nakonec pro další pokusy použit alternativní polymer POP-4 (přesné složení výrobce nezveřejňuje).

S touto změnou souvisela i nutnost provedení nové optimalizace separační teploty, k čemuž byly vybrány vzorky obsahující hlavní mutace onkogenu *KRAS* – G12V a G12D, které se v populaci vyskytují nejčastěji (Capella *et al.*, 1991; databáze COSMIC – <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue>). Na základě změny separačního polymeru byl zaznamenán posun optimální teploty o -1 °C (50 °C na ABI PRISM a 49 °C na mikropreparativním DCE systému). Ve shodě s výsledky získanými na analytickém přístroji bylo i zde potvrzeno, že v případě onkogenu *KRAS* je tato teplota vhodná pro rozlišení všech významných mutantních variant vyskytujících se v exonu 2, konkrétně v kodónu 12 a 13. Obdobně byly pro separaci mikropreparativním DCE systémem následně optimalizovány i postupy detekce dalších významných molekulárních markerů *BRAF* a *EGFR*.

V průběhu izolace frakcí docházelo k výraznému naředění odebíraných fragmentů, jejichž výsledná koncentrace se tak pohybovala zhruba o dva až tři řády pod úroveň detekce analytických systémů. Z těchto závěrů lze vyvodit nutnost další amplifikace používaného genetického materiálu. S potřebou „re-amplifikace“ mutantních fragmentů po izolaci na experimentálním systému však souviselo zvýšené riziko kontaminace. I přesto, že před každou analýzou bylo provedeno plnění kapiláry separačním polymerem, ojediněle se mohly fragmenty putující kapilárou (v předchozí analýze) zadržet v tenké vrstvě polymeru, která zůstávala u stěny kapiláry. Při následné výměně polymeru přesto mohly DNA fragmenty v této vrstvě zůstat a uvolnit se až během další analýzy, čímž docházelo ke kontaminaci izolovaných frakcí. Vzhledem k PCR re-amplifikaci tak mohou i jednotlivé molekuly kontaminujících DNA fragmentů způsobit falešné výsledky. Přítomnost možné kontaminace byla experimentálně prokázána a to v případě izolace frakcí během analýzy, při které nebyl dávkován žádný vzorek. Tato analýza tak představovala zásadní krok, který umožnil používání experimentálního systému. Kontaminaci lze ze separační kapiláry eliminovat několika různými způsoby, kterými jsou např. prodloužení aplikace vysokého napětí před samotným dávkováním vzorku, analýza bez nadávkovaného vzorku, proplach kapiláry ultra čistou vodou či použití separační kapiláry pouze jednou. Nejefektivněji lze kontaminaci odstranit elektrickým proudem, který vyvolá pohyb zbytků fragmentů z kapiláry ven. Experimentální systém je však schopen udržet elektrický proud pouze po dobu 110 minut a vzhledem k času potřebnému pro kolekci nebylo možné tuto fázi analýzy prodloužit. Proto bylo jako účinné

řešení zvoleno intenzivní proplachování kapiláry ultra čistou vodou, jako další preventivní krok byl upraven protokol PCR amplifikace II a to snížením počtu PCR cyklů z 34 na 21.

Za účelem zhodnocení účinnosti experimentálního systému a stanovení citlivosti záchytu mutovaných forem DNA byla nejprve provedena absolutní kvantifikace s použitím zakoupených DNA standardů odvozených od buněčných linií. Postupně byly analyzovány vzorky s uměle připraveným zastoupením mutantní formy na úrovni 10 %, 1 % a 0,1 %. Přítomnost mutantní formy DNA byla ve všech případech jednoznačně prokázána a to i u vzorku, kde úroveň 0,1 % představuje záchyt 1 mutované alely v 1000 kopiích alel nemutovaných. V souladu se stanovenou pracovní hypotézou byl tak limit detekce analytického systému, po obohacení mutantní frakce za použití mikropreparativního DCE systému, zvýšen o jeden řád (tedy z 1 % na 0,1 %).

Po stanovení analytické citlivosti experimentálního systému byly zjištěné výsledky ověřeny použitím reálných vzorků genomické DNA vykazujících přítomnost nejčastějších mutantních forem onkogenu *KRAS*. Použité vzorky byly ve všech případech izolovány z nádorových tkání pacientů s diagnostikovaným nádorovým onemocněním tlustého střeva a konečníku, kde současně provedená histopatologická vyšetření potvrdila přítomnost nádorových buněk na úrovni blízké 100%. Vzhledem k heterozygotní povaze těchto mutací se dalo očekávat přibližně 50% zastoupení mutovaných alel ve vzorku (v každé buňce je mutována vždy jedna alela). Přidáním Wild Type (WT) DNA byla i z těchto vzorků vytvořena řada s různým zastoupením mutovaných alel. Touto kvantifikací byla citlivost stanovena na úrovni 0,25% zastoupení mutovaných fragmentů DNA (např. za účelem stanovení přítomnosti volné nádorové DNA v krvi pacienta během léčby). Poslední krok experimentálního vývoje metody představovala klinická část výzkumu zahrnující validaci mikropreparativního systému na vzorcích krevní plazmy pacientů. Jak již bylo zmíněno, hlavní aplikační oblastí systému je záchyt cirkulující nádorové DNA na základě detekce specifických somatických mutací v krevním vzorku pacienta.

Pro první část validační studie byly využity vzorky z předchozího klinického projektu (<https://vavai.tacr.cz/isvav/project/33161/>) zaměřeného na detekci přítomné ctDNA v krevní plazmě pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem (stádium IV), u kterých byla při vyšetření vzorku nádorové tkáně zjištěna přítomnost jedné z osmi nejčastějších mutací onkogenu *KRAS*. V tomto projektu byla metodou standardní DCE potvrzena přítomnost mutace v krevní plazmě u 70 z celkového počtu 91 pacientů. Zbývajících 21 vzorků vyhodnocených jako ctDNA-negativní bylo použito pro validaci experimentálního systému. Z celkového počtu 21 vzorků byla na základě přítomné *KRAS* mutace prokázána přítomnost

ctDNA u 12 z nich (57 %, 12/21). V návaznosti na předchozí klinický projekt lze tedy konstatovat zvýšení záchytu ctDNA z původních 77 % (70/91) na 90 % (82/91) pacientů. Zde prezentované výsledky jsou srovnatelné s řadou specializovaných metod využívaných k detekci ctDNA, jedná se např. o metody založené na bázi real-time PCR nebo digitální PCR. Zde uvedené výsledky zároveň potvrzují pracovní hypotézu předpokládající zvýšení záchytu pacientů ve IV stádiu onemocnění. Na této úrovni citlivosti lze hovořit i o možnosti záchytu onemocnění v časnějších stádiích, kdy může být nádor ještě operovatelný, což dává pacientovi výraznější naději na delší přežití.

Ve druhé části validační studie byla provedena kontrola funkčnosti metody pro detekci mutačních forem onkogenů *BRAF* a *EGFR*. Na vzorcích tkáňové biopsie (onkogen *BRAF*) a cytologického nátěru (onkogen *EGFR*) byla provedena optimalizace separačních teplot a následně proběhla analýza vzorků krevní plazmy pacientů. U pacientů s dříve potvrzenou mutací onkogenu *BRAF* nebyla pravděpodobně ctDNA v krvi přítomna a oba vzorky byly vyhodnoceny jako negativní, oproti tomu v krevních vzorcích pacientů s dříve potvrzenou mutací markeru E19 (onkogen *EGFR*) byla přítomnost ctDNA potvrzena u dvou pacientů z pěti. U obou pacientů s očekávanou mutací E21 (onkogen *EGFR*) opět nebyla přítomnost ctDNA prokázána. I přes to, že nebyly detekovány odpovídající markery u všech vzorků pacientů, kde byla jejich přítomnost očekávána, byla funkčnost zkoumané metody potvrzena nejen při detekci různých nádorových markerů (*KRAS*, *EGFR*, *BRAF*) či různých typů mutací jednoho markeru, ale také ke sledování léčby pacientů s různými nádorovými onemocněními (nádorové onemocnění tlustého střeva a konečníku, nádorové onemocnění plic).

Kromě výše uvedeného lze přínos vyvinuté metody zhodnotit z pohledu finanční dostupnosti, kdy analýza založená na obohacení mutantních frakcí je nákladově srovnatelná s běžnými mutačními vyšetřeními nádorových tkání, zatímco metody digitální PCR či NGS jsou řádově dražší.

Praktický význam práce spočívá především v oblasti sledování léčby pacientů s nádorovým onemocněním tlustého střeva a konečníku, což umožňuje zvolení vhodných léčebných postupů zejména v případech, kdy pacienti, např. z důvodu lékové rezistence, na zvolenou léčbu neodpovídají. Přínosem zkoumaného metodického přístupu je využití takového biologického vzorku, jehož odběr je pro pacienta zákrokem mnohem méně invazivním. Vyvinutá metoda tak umožňuje častější kontroly sledovaných pacientů

v porovnání se současnými postupy (týdenní či měsíční odběry krve v porovnání s kontrolami zobrazovacími technikami prováděnými jednou za 6 až 12 měsíců).

V této práci byla popsána metoda zvyšující citlivost analytického systému a je tedy zřejmé, že uvedený postup obohacení mutantních DNA fragmentů může být použit i ve spojitosti s dalšími metodami, např. NGS či real-time PCR. Mikropreparativní DCE systém by v kombinaci s těmito metodami umožnil analýzu ještě citlivější, v tomto případě však na úkor finanční nenáročnosti. I přes toto omezení se s velkou pravděpodobností stane předmětem dalšího výzkumu navazujícího na tuto práci. Obdobně tak citlivost fluorescenčního detektoru či automatizace celého systému za účelem sjednocení používané separační matrice či separační teploty, by se měly stát předmětem dalšího výzkumu.

7. Souhrn

Tato práce se zabývala experimentálním vývojem a validací metody umožňující obohacení mutantních frakcí za účelem zvýšení záchytu ctDNA z krevní plazmy. Experimentální systém byl pro účely této práce sestaven ve spolupráci s Ústavem analytické chemie AV ČR v Brně. Po sestavení a dovezení do laboratoře byl přístroj zprovozněn, optimalizován a validován na vzorcích s již dříve potvrzenou mutací onkogenu *KRAS*. V závěru celé práce byl mikropreparativní systém optimalizován na dalších vyšetřovaných markerech *BRAF* a *EGFR*.

Po provedené mikropreparaci mutované frakce bylo zpozorováno obohacení mutantu, oproti stávající citlivosti detekčních metod tak byla citlivost analytického systému, za použití mikropreparativního DCE systému, zvýšena z 1 % na 0,1 %, tedy o 1 řád. Zvýšení analytické citlivosti experimentálního systému prokázané analýzou standardní DNA bylo následně potvrzeno na reálných vzorcích genomové DNA.

Klinická část výzkumu zahrnovala validaci mikropreparativního DCE systému na 21 vzorcích krevní plazmy pacientů, z celkového počtu 21 pacientů byla volná nádorová DNA detekována u 12. Lze tedy konstatovat, že se zvýšením citlivosti detekčních metod byl také zpozorován zvýšený záchyt pacientů v pokročilém stádiu onemocnění.

Na závěr celé práce byla provedena kontrola funkčnosti metody na vzorcích obsahujících mutační formy onkogenů *BRAF* a *EGFR*. Po optimalizaci systému byla opět provedena validace systému na vzorcích krevní plazmy pacientů.

Výsledky této práce dokazují možnost využití mikropreparativního systému k obohacení mutovaných fragmentů DNA, což otevírá možnost uplatnění v oblasti sledování léčby pacientů nejen s nádorovým onemocněním tlustého střeva a konečníku, který je při včasné diagnóze dobře léčitelný, ale také např. pacientů s nádorovým onemocněním plic. Pro další zvýšení citlivosti by však bylo vhodné místo analytického systému ABI PRISM zvolit digitální metody.

8. Seznam použité literatury

Akkoca, A.N., Yanik, S., Ozdemir, Z.T., Cihan, F.G., Sayar, S., Cincin, T.G., Cam, A., Ozer, C. (2014): TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7: 2828–2835.

Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., *et al.* (2008): Wild-Type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26: 1626–1634.

Andreyev, H., Norman, A., Cunningham, D., Oates, J., Dix, B., Icopetta, B., Young, J., Walsh, T., Ward, R., Hawkins, N., *et al.* (2001): Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br. J. Cancer.* 85: 692–696.

Bazan, V., Agnese, V., Corsale, S., Calò, V., Valerio, M.R., Latteri, M.A., Vieni, S., Grassi, N., Cicero, G., Dardanoni, G., *et al.* (2005): Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study. *Ann. Oncol.* 16: iv50-iv55.

Bedin, C., Enzo, M.V., Bianco, P.D., Pucciarelli, S., Nitti, D., Agostini, M. (2017): Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer.* 140: 1888–1898.

Benesova, L., Belsanova, B., Suchanek, S., Kopeckova, M., Minarikova, P., Lipska, L., Levy, M., Visokai, V., Zavoral, M., Minarik, M. (2013): Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Anal. Biochem.* 433: 227–234.

Bjørheim, J., Ekstrøm, P.O. (2005): Review of denaturant capillary electrophoresis in DNA variation analysis. *Electrophoresis.* 26: 2520–2530.

Capella, G., Cronauer-Mitra, S., Peinado, M.A., Perucho, M. (1991): Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the C-K-ras gene in human tumors. *Environ. Health Perspect.* 93: 125–131.

Castellanos-Rizaldos, E., Milbury, C.A., Guha, M., Makrigiorgos, G.M. (2014): COLD-PCR enriches low-level variant DNA sequences and increases the sensitivity of genetic testing. *Methods Mol. Biol.* 1102: 623–639.

Catalano, O.A., Coutinho, A.M., Sahani, D.V., Vangel, M.G., Gee, M.S., Hahn, P.F., Witzel, T., Soricelli, A., Salvatore, M., Catana, C., *et al.* (2017): Colorectal cancer staging: comparison of whole-body PET/CT and PET/MR. *Abdom Radiol.* 42: 1141–1151.

Darawi, M.N., Ai-Vyrm, C., Ramasamy, K., Hua, P.P.J., Pin, T.M., Kamaruzzaman, S.B., Majeed, A.B.A. (2013): Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms. *BMC Med. Genet.* 14.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 417: 949–954.

- De Roock, W., Claes, B., Bernasconi, D., De Schutter, J., Biesmans, B., Fountzilas, G., Kalogeras, K.T., Kotoula, V., Papamichael, D., Laurent-Puig, P., *et al.* (2010): Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 11: 753–762.
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., De Dosso, S., Mazzucchelli, L., Frattini, M., Siena, S., *et al.* (2008): Wild-Type BRAF Is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26: 5705–5712.
- Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, L.A., Goodman, S.N., David, K.A., Juhl, H., *et al.* (2005): Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 16368–16373.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., *et al.* (2008): Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature.* 455: 1069–1075.
- Donohoe, E. (2005): Denaturing high-performance liquid chromatography using the WAVE DNA fragment analysis system. *Methods Mol. Med.* 108: 173–187.
- Durney, B.C., Criehtfield, C.L., Holland, L.A. (2015): Capillary electrophoresis applied to DNA: determining and harnessing sequence and structure to advance bioanalyses (2009–2014). *Anal. Bioanal. Chem.* 407: 6923–6938.
- Ercan, D., Choi, H.G., Yun, C.-H., Capelletti, M., Xie, T., Eck, M.J., Gray, N.S., Janne, P.A. (2015): EGFR mutations and resistance to irreversible pyrimidine-based EGFR Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 21: 3913–3923.
- Erstad, D.J., Tumusiime, G., Cusack, J.C. (2015): Prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 22: Implications for the Clinical Surgeon: 3433–3450.
- Fabian, J.R., Daar, I.O., Morrison, D.K. (1993): Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7170–7179.
- Febbo, P.G., Ladanyi, M., Aldape, K.D., De Marzo, A.M., Hammond, M.E., Hayes, D.F., Iafrate, A.J., Kelley, R.K., Marcucci, G., Ogino, S., *et al.* (2011): NCCN task force report: evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Network.* 9: S1–S32.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int. J. Cancer.* 136: E359–E386.
- Fiala, O., Pesek, M., Finek, J., Benesova, L., Belsanova, B., Minarik, M. (2013): The dominant role of G12C over other KRAS mutation types in the negative prediction of efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet.* 206: 26–31.

- Fournié, G.J., Courtin, J.-P., Laval, F., Chalé, J.-J., Pourrat, J.P., Pujazon, M.-C., Lauque, D., Carles, P. (1995): Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett.* 91: 221–227.
- Fox, J., England, J., White, P., Ellison, G., Callaghan, K., Charlesworth, N., Hehir, J., McCarthy, T., Smith-Ravin, J., Talbot, I., *et al.* (1998): The detection of K-ras mutations in colorectal cancer using the amplification-refractory mutation system. *Br. J. Cancer.* 77: 1267–1274.
- Franklin, W.A., Veve, R., Hirsch, F.R., Helfrich, B.A., Bunn, P.A. (2002): Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin. Oncol.* 29: 3–14.
- Gibbs, J.B., Sigal, I.S., Poe, M., Scolnick, E.M. (1984): Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 5704–5708.
- Ginestà, M.M., Mora, J., Mayor, R., Farré, A., Peinado, M.A., Busquets, J., Serrano, T., Capellá, G., Fabregat, J. (2013): Genetic and epigenetic markers in the evaluation of pancreatic masses. *J. Clin. Pathol.* 66: 192–197.
- Greene, F.L., Page, D.L., Fleming, I.D., Fritz, A.G., Balch, C.M., Haller, D.G., Morrow, M. (2002): *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag. ISBN 0-387-95271-3.
- Haigis, K.M., Kendall, K.R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M.C., Glickman, J.N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K.M., *et al.* (2008): Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat. Genet.* 40: 600–608.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57–70.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986–994.
- Hendler, F.J., Ozanne, B.W. (1984): Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J. Clin. Invest.* 74: 647–651.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., *et al.* (2011): High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 83: 8604–8610.
- How-Kit, A., Lebbé, C., Bousard, A., Daunay, A., Mazaleyrat, N., Daviaud, C., Mourah, S., Tost, J. (2014): Ultrasensitive detection and identification of BRAF V600 mutations in fresh frozen, FFPE, and plasma samples of melanoma patients by E-ice-COLD-PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* 406: 5513–5520.
- Hu, J., Stites, E.C., Yu, H., Germino, E.A., Meharena, H.S., Stork, P.J.S., Kornev, A.P., Taylor, S.S., Shaw, A.S. (2013): Allosteric activation of functionally asymmetric RAF kinase dimers. *Cell.* 154: 1036–1046.

Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., *et al.* (2011): Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* 364: 2507–2516.

Choi, M., Scholl, U.I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I.R., Zumbo, P., Nayir, A., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Sanjad, S., *et al.* (2009): Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 19096–19101.

Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.-D., Knippers, R. (2001): DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 61: 1659–1665.

Jansen, J.M., Wartchow, C., Jahnke, W., Fong, S., Tsang, T., Pfister, K., Zavorotinskaya, T., Bussiere, D., Cheng, J.M., Crawford, K., *et al.* (2017): Inhibition of prenylated KRAS in a lipid environment. *PLoS One.* 12.

Jin, Y., Chen, M., Yu, X. (2016): Differences among lesions with exon 19, exon 21 EGFR mutations and wild types in surgically resected non-small cell lung cancer. *Sci. Rep.* 6.

Johnson, G.L., Lapadat, R. (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 298: 1911–1912.

Jun, S.-Y., Lee, E.-J., Kim, M.-J., Chun, S.M., Bae, Y.K., Uk Hong, S., Choi, J., Kim, J.M., Jang, K.-T., Kim, J.Y., *et al.* (2017): Lynch syndrome-related small intestinal adenocarcinomas. *Oncotarget.* 8: 21483–21500.

Kanakasetty, G.B., Kuntejowdahalli, L., Thanky, A.H., Dasappa, L., Jacob, L.A., Mallekavu, S.B., Kumari, P. (2017): Predictive and prognostic implications of variant philadelphia translocations in CML. Experience From a Tertiary Oncology Center in Southern India *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* 17: 52–59.

Kaneda, S., Ono, K., Fukuba, T., Nojima, T., Yamamoto, T., Fujii, T. (2011): A rapid method for optimizing running temperature of electrophoresis through repetitive On-chip CE operations. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 4271–4281.

Kato, Y., Peled, N., Wynes, M.W., Yoshida, K., Pardo, M., Mascaux, C., Ohira, T., Tsuboi, M., Matsubayashi, J., Nagao, T., *et al.* (2010): Novel epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for non-small cell lung cancer: immunohistochemistry as a possible screening method for epidermal growth factor receptor mutations. Immunohistochemistry as a Possible Screening Method for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations. *J. Thorac. Oncol.* 5: 1551–1558.

Kim, H.J., Kang, S.H., Chung, H.W., Lee, J.S., Kim, S.J., Yoo, K.H., Lee, K.Y. (2015a): Clinical features of lung adenocarcinomas with epidermal growth factor receptor mutations and miliary disseminated carcinomatosis. *Thorac. Cancer.* 6: 629–635.

Kim, K., Seong, M.-W., Chung, W.-H., Park, S.S., Leem, S., Park, W., Kim, J., Lee, K., Park, R.W., Kim, N. (2015b): Effect of next-generation exome sequencing depth for discovery of diagnostic variants. *Genomics Inform.* 13: 31–39.

Koubková, L., Vojtěšek, B., Vyzula, R. (2014): Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klin. Onkol.* 27 (Suppl 1): S61–S68.

- Krammer, J., Pinker-Domenig, K., Robson, M.E., Gönen, M., Bernard-Davila, B., Morris, E.A., Mangino, D.A., Jochelson, M.S. (2017): Breast cancer detection and tumor characteristics in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res. Treat.*
- Kuo, Y.-B., Chen, J.-S., Fan, C.-W., Li, Y.-S., Chan, E.-C. (2014): Comparison of KRAS mutation analysis of primary tumors and matched circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer. *Clin. Chim. Acta.* 433: 284–289.
- Lang, A.H., Drexel, H., Geller-Rhomberg, S., Stark, N., Winder, T., Geiger, K., Muendlein, A. (2011): Optimized allele-specific real-time PCR assays for the detection of common mutations in KRAS and BRAF. *J. Mol. Diagn.* 13: 23–28.
- Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., Yaros, M.J. (1977): Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 37: 646–650.
- Levy, M., Benesova, L., Lipska, L., Belsanova, B., Minarikova, P., Veprekova, G., Zavoral, M., Minarik, M. (2012): Utility of cell-free tumour DNA for post-surgical follow-up of colorectal cancer patients. *Anticancer Res.* 32: 1621–1626.
- Li, Z., Liu, C., Dou, X., Ni, Y., Wang, J., Yamaguchi, Y. (2014): Electromigration behavior of nucleic acids in capillary electrophoresis under pulsed-field conditions. *J. Chromatogr. A.* 1331: 100–107.
- Li, J., Wang, L., Mamon, H., Kulke, M.H., Berbeco, R., Makrigiorgos, G.M. (2008): Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat. Med.* 14: 579–584.
- Li, H., Zhang, L., Jiang, Q., Shi, Z., Tong, H. (2017): Identification a nonsense mutation of APC gene in Chinese patients with familial adenomatous polyposis. *Exp. Ther. Med.* 13: 1495–1499.
- Lodish, H.F., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M.P. (2013): *Molecular cell biology*. 7th ed. New York: W.H. Freeman and Co. ISBN 978-1-4292-3413-9.
- Lonigro, R.J., Grasso, C.S., Robinson, D.R., Jing, X., Wu, Y.-M., Cao, X., Quist, M.J., Tomlins, S.A., Pienta, K.J., Chinnaiyan, A.M. (2011): Detection of somatic copy number alterations in cancer using targeted exome capture sequencing. *Neoplasia.* 13: 1019–1025.
- Martinelli, E., Morgillo, F., Troiani, T., Ciardiello, F. (2017): Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK. *Cancer Treat. Rev.* 53: 61–69.
- Milbury, C.A., Li, J., Makrigiorgos, G.M. (2011): Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Res.* 39: e2-e2.
- Minarikova, P., Benesova, L., Halkova, T., Belsanova, B., Suchanek, S., Cyrany, J., Tuckova, I., Bures, J., Zavoral, M., Minarik, M. (2016): Longitudinal molecular characterization of endoscopic specimens from colorectal lesions. *World J. Gastroenterol.* 22: 4936.

- Moelling, K., Heimann, B., Beimling, P., Rapp, U.R., Sander, T. (1984): Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. *Nature*. 312: 558–561.
- Müller, O., Foret, F., Karger, B.L. (1995): Design of a high-precision fraction collector for capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 67: 2974–2980.
- Murtaza, M., Dawson, S.-J., Tsui, D.W.Y., Gale, D., Forshe, T., Piskorz, A.M., Parkinson, C., Chin, S.-F., Kingsbury, Z., Wong, A.S.C., *et al.* (2013): Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 497: 108–112.
- Nakamura, Y., Hibino, K., Yanagida, T., Sako, Y. (2016): Switching of the positive feedback for RAS activation by a concerted function of SOS membrane association domains. *Biophys Physicobiol.* 13: 1–11.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M.J., Solera, J. (2015): Real-time PCR detection chemistry. *Clin. Chim. Acta.* 439: 231–250.
- Palomba, G., Colombino, M., Contu, A., Massidda, B., Baldino, G., Pazzola, A., Ionta, M., Capelli, F., Trova, V., Sedda, T., *et al.* (2012): Prevalence of KRAS, BRAF, and PIK3CA somatic mutations in patients with colorectal carcinoma may vary in the same population: clues from Sardinia. *J. Transl. Med.* 10: 178–186.
- Pao, W., Wang, T.Y., Riely, G.J., Miller, V.A., Pan, Q., Ladanyi, M., Zakowski, M.F., Heelan, R.T., Kris, M.G., Varmus, H.E. (2005): KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med.* 2: 57–61.
- Piton, N., Lonchamp, E., Nowak, F., Sabourin, J.-C. (2015): Real-life distribution of KRAS and NRAS mutations in metastatic colorectal carcinoma from French routine genotyping. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 24: 1416–1418.
- Prikryl, J., Foret, F. (2014): Fluorescence detector for capillary separations fabricated by 3D printing. *Anal. Chem.* 86: 11951–11956.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D. (2013): RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer.* 11: 761–774.
- Rapp, U.R., Goldsborough, M.D., Mark, G.E., Bonner, T.I., Groffen, J., Reynolds, J., F.H., Stephenson, J.R. (1983): Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 4218–4222.
- Richman, S.D., Seymour, M.T., Chambers, P., Elliott, F., Daly, C.L., Meade, A.M., Taylor, G., Barrett, J.H., Quirke, P. (2009): KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: Results from the MRC FOCUS trial. *J. Clin. Oncol.* 27: 5931–5937.
- Salek, C., Benesova, L., Zavoral, M., Nosek, V., Kasperova, L., Ryska, M., Strnad, R., Traboulsi, E., Minarik, M. (2007): Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 13: 3714–3720.

- Salek, C., Minarikova, P., Benesova, L., Nosek, V., Strnad, R., Zavoral, M., Minarik, M. (2009): Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 29: 1803–1810.
- Sefrioui, D., Mauger, F., Leclere, L., Beaussire, L., Di Fiore, F., Deleuze, J.-F., Sarafan-Vasseur, N., Tost, J. (2017): Comparison of the quantification of KRAS mutations by digital PCR and E-ice-COLD-PCR in circulating-cell-free DNA from metastatic colorectal cancer patients. *Clin. Chim. Acta.* 465: 1–4.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J., Futreal, P.A. (2009): The cancer genome. *Nature.* 458: 719–724.
- Taly, V., Pekin, D., Benhaim, L., Kotsopoulos, S.K., Le Corre, D., Li, X., Atochin, I., Link, D.R., Griffiths, A.D., Pallier, K., *et al.* (2013): Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin. Chem.* 59: 1722–1731.
- Timofeeva, M., Jäger, B., Rosenberger, A., Sauter, W., Wichmann, H.-E., Bickeböller, H., Risch, A. (2009): A multiplex real-time PCR method for detection of GSTM1 and GSTT1 copy numbers. *Clin. Biochem.* 42: 500–509.
- Tong, D., Liu, F., Li, W., Zhang, W. (2015): The impacts of surgery of the primary cancer and radiotherapy on the survival of patients with metastatic rectal cancer. *Oncotarget.*
- Trojan, J., Klein-Scory, S., Koch, C., Schmiegel, W., Baraniskin, A. (2017): Clinical application of liquid biopsy in targeted therapy of metastatic colorectal cancer. *Case Rep. Onco. Med.* 2017: 1–3.
- Vogel, A., Hofheinz, R.D., Kubicka, S., Arnold, D. (2017): Treatment decisions in metastatic colorectal cancer – Beyond first and second line combination therapies. *Cancer Treat. Rev.* 59: 54–60.
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1999): Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 9236–9241.
- Vojtechova, G., Benesova, L., Belsanova, B., Minarikova, P., Levy, M., Lipska, L., Suchanek, S., Zavoral, M., Minarik, M. (2016): Monitoring of circulating tumor cells by a combination of immunomagnetic enrichment and RT-PCR in colorectal cancer patients undergoing surgery. *Adv. Clin. Exp. Med.* 25: 1273–1279.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., Marais, R. (2004): The RAF proteins take centre stage. *Mol. Cell Biol.* 875–885.
- White, R.A., Blainey, P.C., Fan, H.C., Quake, S.R. (2009): Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC Genomics.* 10: 116–127.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79: 143–180.
- Wu, S., Powers, S., Zhu, W., Hannun, Y.A. (2015): Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature.* 529: 43–47.

- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., Hancock, J.F. (1998): Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 24052–24056.
- Yang, J., Du, X. Lin., Li, S. Ting., Wang, B. Yuan., Wu, Y. Ying., Chen, Z. Ling., Lv, M., Shen, Y. Wei., Wang, X., Dong, D. Feng., *et al.* (2016): Characteristics of differently located colorectal cancers support proximal and distal classification: A population-based study of 57,847 Patients. *PLoS One.* 11: e0167540.
- Yiu, A.J., Yiu, C.Y. (2016): Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Research.* 36: 1093–1102.
- Youn, A., Simon, R. (2011): Identifying cancer driver genes in tumor genome sequencing studies. *Bioinformatics.* 27: 175–181.
- Yun, C.-H., Mengwasser, K.E., Toms, A.V., Woo, M.S., Greulich, H., Wong, K.-K., Meyerson, M., Eck, M.J. (2008): The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 2070–2075.
- Zhang, W., Liu, H.T. (2002): MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 12: 9–18.