



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Význam stanovení vybraných znaků pomocí
PCR metod v tekuté biopsii pacientů s
karcinomem prostaty**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Adriana Cilečková
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Adriana Cilečková
Název práce	Význam stanovení vybraných znaků pomocí PCR metod v tekuté biopsii pacientů s karcinomem prostaty
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav klinické a molekulární patologie LF Univerzity Palackého a FN Olomouc
Vedoucí práce	doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	Diplomová práce se zabývá významem stanovení vybraných znaků pomocí PCR metod v tekuté biopsii pacientů s karcinomem prostaty. V teoretické části jsou shrnuty poznatky nejen o prostatě, karcinomu prostaty, jeho kastročně rezistentní formě, ale také o androgenovém receptoru (AR), kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR), digitální PCR (ddPCR) a tekuté biopsii. Pro samotnou práci byla stěžejní kultivace buněčných linií VCaP a LNCaP a potvrzení přítomnosti amplifikace u VCaP. Dále byly provedeny experimenty za účelem analýzy počtu kopií genů androgenového receptoru a zesilovače transkripce androgenového receptoru u vybraných buněčných linií s využitím qPCR a ddPCR. Byla rovněž provedena pilotní analýza počtu kopií androgenového receptoru pomocí ddPCR ve volné cirkulující DNA pacientů s pokročilým karcinomem prostaty.
Klíčová slova	karcinom prostaty, tekutá biopsie, nádorové buňky, PCR metody, androgenový receptor
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Adriana Cilečková
Title of thesis	The importance of evaluation of selected markers using PCR methods in a liquid biopsy of prostate cancer patients
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc
Supervisor	doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	The diploma thesis deals with the importance of evaluation of selected markers using PCR methods in a liquid biopsy of prostate cancer patients. The theoretical part of this thesis summarizes the knowledge not only about the prostate, prostate cancer, its castration-resistant form, but also about the androgen receptor (AR), quantitative real-time PCR (qPCR), droplet digital PCR (ddPCR) and liquid biopsy. Cultivation of VCaP and LNCaP cell lines and confirmation of the presence of AR amplification in VCaP were crucial to the work itself. Next experiments were performed to analyze the copy number of the androgen receptor and its enhancer in selected cell lines using qPCR and ddPCR. Preliminary ddPCR analysis of the androgen receptor was also performed in cell-free DNA of patients with advanced prostate cancer.
Keywords	prostate cancer, liquid biopsy, tumor cells, PCR methods, androgen receptor
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za pomoci Evy Pimrové, Mgr. Zlaty Huškové, Mgr. Evy Szczyrbové, Mgr. Jany Knillové, Ph.D., Mgr. Jany Stránské, Ph.D. a doc. Jana Bouchala. Použila jsem pouze literaturu uvedenou v seznamu. “

V Olomouci dne

.....

Bc. Adriana Cilečková

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě podporovali během celého studia a také při psaní této práce. Velké díky patří моým rodičům za trpělivost a psychickou podporu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu doc. Janu Bouchalovi za odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce a také Mgr. Zlatě Huškové, Mgr. Evě Szczyrbové, Mgr. Janě Knillové, Ph.D. a Mgr. Janě Stránské, Ph.D. za odborné rady a konzultace.

Obsah

Seznam zkratk.....	8
1 Úvod a cíle	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Prostata.....	12
2.2 Karcinom prostaty	14
2.2.1 Definice a epidemiologie	14
2.2.2 Etiologie	16
2.2.3 Možnosti diagnostiky karcinomu prostaty	17
2.2.4 Stádia onemocnění	18
2.2.5 Terapie karcinomu prostaty	19
2.2.6 Kastrálně rezistentní karcinom prostaty	20
2.2.7 Terapie kastrálně rezistentního karcinomu prostaty.....	21
2.3 Androgenový receptor	21
2.3.1 Zesilovač transkripce androgenového receptoru	23
2.4 Polymerázová řetězová reakce	23
2.4.1 Kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase	25
2.4.2 Digitální PCR	25
2.5 Tekutá biopsie.....	25
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1 Přístroje a materiály	27
3.1.1 Přístrojové vybavení	27
3.1.2 Spotřební materiál a další pomůcky.....	28
3.1.3 Chemikálie a roztoky.....	28
3.1.4 Primery, próby a komerční testy	31
3.1.5 Biologický materiál	31
3.1.6 Počítačové programy	32
3.2. Metody	33
3.2.1 Kultivace a příprava buněčných linií.....	33
3.2.2 Izolace DNA.....	33
3.2.3 Kvantitativní real-time PCR.....	34
3.2.4 Určení počtu kopií genů pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.....	35
3.2.5 Kontrola produktů PCR reakce pomocí gelové elektroforézy.....	36
3.2.6 Digitální PCR	36
3.2.7 Pacientské vzorky	37
3.3 Výsledky.....	40

3.3.1 Kultivace a příprava buněčných linií.....	40
3.3.2 Návrh primerů pro zesilovač transkripce androgenového receptoru	40
3.3.3 Ověření počtu kopií androgenového receptoru u linií a výběr testu pro zesilovač transkripce	40
3.3.4 Ověření citlivosti PCR vyšetření počtu kopií androgenového receptoru	42
3.3.5 Analýza počtu kopií v genomové DNA buněčných linií pomocí qPCR.....	43
3.3.6 Analýza počtu kopií androgenového receptoru v buněčných linií pomocí ddPCR	45
3.3.7 Analýza počtu kopií androgenového receptoru v cirkulující DNA pacientů s pokročilým karcinomem prostaty.....	49
3.4 Diskuse	52
4 Závěr	55
5 Použitá literatura	56

Seznam zkratek

AF-1	aktivační funkce 1
AF-2	aktivační funkce 2
AR	androgenový receptor
ARA	cyproteron acetát
ARE	z angl. androgen response element
ARTA	z angl. androgen receptor targeting
BHP	benigní hyperplazie prostaty
bp	pár bází, z angl. base pair
CAG	polyglutamin
ccfDNA/RNA	volná cirkulující DNA/RNA
CN	počet kopií, z angl. copy number
CNP	z angl. copy number polymorphism
CNV	z angl. copy number variant
CRPC	z angl. castration-resistant prostate cancer
CTCs	cirkulující nádorové buňky
DBD	DNA-vázající doména
ddPCR	z angl. droplet digital polymerase chain reaction
DHT	dihydrotestosteron
DMEM	kultivační médium z angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
dPCR	z angl. digital polymerase chain reaction
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNase	z angl. deoxyribonuclease
dNTP	směs deoxyribonukleotidů
DRE	z angl. digital rectal examination
DTT	dichlordifenyltrichlorethan

EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina
FBS	fetální bovinní sérum
fPSA	volná forma prostatického specifického antigenu
Fw	z angl. forward primer
gDNA	genomová DNA
GGC	polyglycin
HSPC	z angl. hormone-senzitive prostate cancer
IGF	z angl. insulin-like growth factor
kb	kilobáze
KLK3	kalikrein 3
LBD	ligand-vázající doména
PAP	prostatická kyselá fosfatáza
PBS	fosfátový pufr, z angl. phosphate buffer saline
PCa	karcinom prostaty
PCA3	prostatický rakovinný antigen 3
PCR	polymerázová řetězová reakce
PERS	peroxodisíran amonný
Pk	pozitivní kontrola
proPSA	prekurzor prostatického specifického antigenu
PSA	prostatický specifický antigen
qPCR	kvantitativní PCR
RECIST	z angl. response evaluation criteria in solid tumors
RNA	ribonukleová kyselina
RNase A	z angl. ribonuclease A
RPMI 1640	kultivační médium, z angl. Roswell Park Memorial Institute
RQ	z angl. relative quantity
Rv	z angl. reverse primer

TBE	tris-borát EDTA pufr
TEMED	tetramethylethyldiamin
TNM	z angl. Tumor, Nodes and Metastases Classification
tPSA	vázaná forma prostatického specifického antigenu
TRUST	transrektální ultrasonografie
NCBI	z angl. National Center for Biotechnological Information
NGS	sekvenování nové generace
NTD	N-koncová doména

1 Úvod a cíle

Karcinom prostaty se v posledních letech stal významným medicínským, ale i společenským problémem. Po karcinomu plic a karcinomu tlustého střeva je třetí nejčastější příčinou smrti na nádorové onemocnění u mužů v České republice.

Pro normální i maligní růst prostaty je nezbytná androgenní signalizace (Heinlein et al., 2004). Standardní léčbou pokročilého karcinomu prostaty je přitom androgen deprivace. Většina pacientů později získá rezistenci a vzniká u nich kastračně rezistentní karcinom prostaty. Nejběžnější mechanismus rezistence je amplifikace lokusu AR. Predikce vzniku kastrační rezistence a progresu do konečného stádia onemocnění by mohla pomoci lékařům při výběru vhodné terapie a případném použití moderních léčiv. V důsledku toho jsou vyhledávány biologické markery, které by usnadnily předpověď průběhu léčby a účinnosti androgenové deprivace.

Jedním z moderních přístupů je tekutá biopsie, která umožňuje neinvazivní analýzu cirkulujících nádorových buněk a volné cirkulující DNA (Sumiyoshi et al., 2019).

Cíle diplomové práce byly následující:

- Vypracování literární rešerše na zadané téma.
- Kultivace a příprava buněčných linií VCaP a LNCaP.
- Izolace nukleových kyselin z genomové DNA vybraných buněčných linií.
- Izolace nukleových kyselin z krevní plazmy pacientů s karcinomem prostaty (cirkulující nádorová DNA).
- Analýza počtu kopií v genomové DNA buněčných linií a patientských vzorků pomocí ddPCR.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Prostata

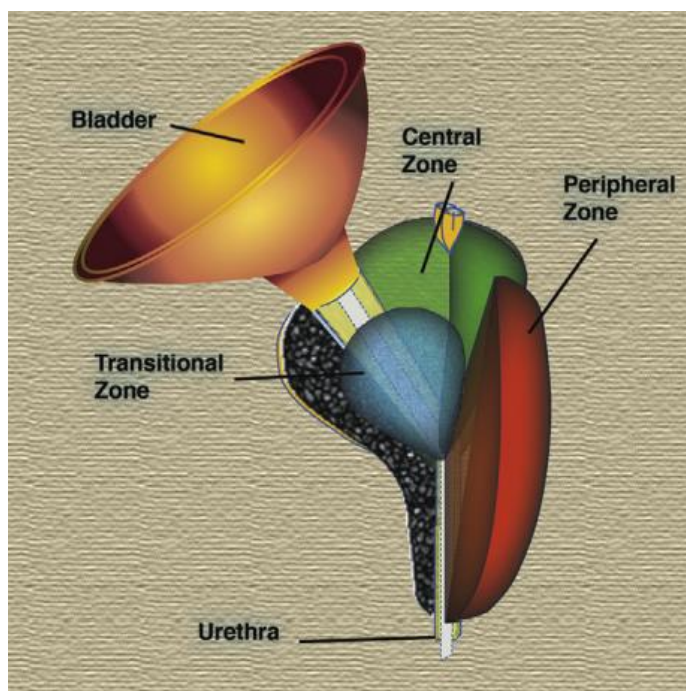
Prostata, označovaná též jako předstojná žláza, je nepárovým, svalově žláznatým orgánem mužského pohlavního ústrojí. Je uložena pod močovým měchýřem hluboko v malé pánvi. U zdravého jedince odpovídá prostata velikosti jedlého kaštanu, je symetrická, elastická a není bolestivá.

Střední částí předstojné žlázy prochází močová trubice z močového měchýře do penisu. Nad prostatou jsou uloženy semenné váčky, které do ní vstupují společně se semennými provazci z varlat. Její povrch je hladký, jež je tvořen tenkým vazivovým pouzdem. Skládá se z 30-50 rozvětvených tubuloalveolárních žlázek, hladké svaloviny a vazivového stroma. Horní, širší část prostaty (basis prostatae) naléhá na hrdlo močového měchýře. Spodní, úzká část prostaty zvaná hrot (apex prostatae) přechází v zevní svěrač (Bezdíčková, Slezáková, 2010; Dylevský, 2006).

Z pohledu anatomického se prostata skládá z pěti laloků: pravého, levého, předního, zadního a středního. V průběhu života srůstají a v dospělosti již zcela splynou. V urologické praxi se proto používá rozdělení prostaty podle McNeala (Obr. 1) na tři zóny: periferní, centrální a tranzitorní (přechodní) (McNeal, 1984). Tranzitorní zóna tvoří přibližně 5 % prostaty a obsahuje slizniční žlásky. U starších mužů může být tranzitorní oblast místem vzniku benigní hyperplazie prostaty (BHP) (Elišková, Naňka, 2006). Centrální (vnitřní) zóna se nachází v oblasti kolem ejakulačních vývodů, představuje asi 25 % objemu žlázy a vzniká v ní asi čtvrtina karcinomů prostaty. Z pohledu velikosti je nejrozšířenější zóna periferní. Tvoří cca 70 % objemu. V této zóně vzniká většina karcinomů prostaty (Aaron et al., 2016).

Stěžejním úkolem prostaty je ochrana kvality spermatu a hraje tedy významnou roli pro mužskou plodnost. Prostata produkuje spermatickou tekutinu, mléčně zakalený řídký sekret s pH přibližně 6,4. Při ejakulaci dochází k vypuzování sekretu do uretry a tvoří asi 30 % celkového množství ejakulátu. Ten vznikne smísením spermií se spermatickou tekutinou pocházející z prostaty. Množství ejakulátu se pohybuje v rozmezí od 2 do 6 ml a v 1 ml je obsaženo přibližně 40-250 milionů spermií. Ejakulát zajišťuje zejména výživu a pohyblivost spermií. Dalším důležitým úkolem prostaty je, že uzavírá otvor mezi močovým měchýřem a močovou trubicí při svém stahování, kdy dochází k vstřikování tekutiny do močové trubice (Elišková, Naňka, 2006; Rokyta, 2015).

Sekret obsahuje řadu bílkovin, zejména imunoglobuliny kyselou fosfatázu, proteázy (např. prostatický specifický antigen), polyaminy (spermin a spermidin), prostaglandiny, kyselinu citronovou a zinek. Všechny tyto složky sekretu mají vliv na oplodnění. Například proteázy zajišťují, aby sperma bylo dostatečně řídké. Pro zvýšení pohyblivosti u spermií je nezbytný spermin a spermidin a pro stimulaci svaloviny dělohy je důležitý právě prostaglandin. Kyselina citronová slouží jako pufr, který udržuje pH daného prostředí. Právě hormon testosteron dohlíží na vývoj prostaty v období dospívání. Velká část testosteronu je tvořena ve varlatech, ovšem malé množství testosteronu je také tvořeno v nadledvinkách. Součástí prostatické tekutiny je také výše zmiňovaný enzym PSA (prostatický specifický antigen). Tento enzym zajišťuje uvolňování semene a transport spermií k vajíčku při pohlavním styku. Hladina PSA se při patologických změnách zvyšuje. S rostoucím věkem u mužů je nezbytné sledovat stav jejich prostaty. Je důležité posoudit, zda se žláza nezvětšuje a nezpůsobuje tak obtížné močení anebo nedochází ke zhoubnému bujení. Hodnoty PSA hrají velmi významnou roli při diagnostice právě benigní hyperplazie prostaty či rakoviny prostaty.



Obr. 1: Schématické znázornění lidské prostaty ukazující močovou trubici a močový měchýř ve vztahu ke třem hlavním žlázovým zónám prostaty (centrální zóna, periferní zóna a přechodní zóna). Převzato z Aaron et al., 2016.

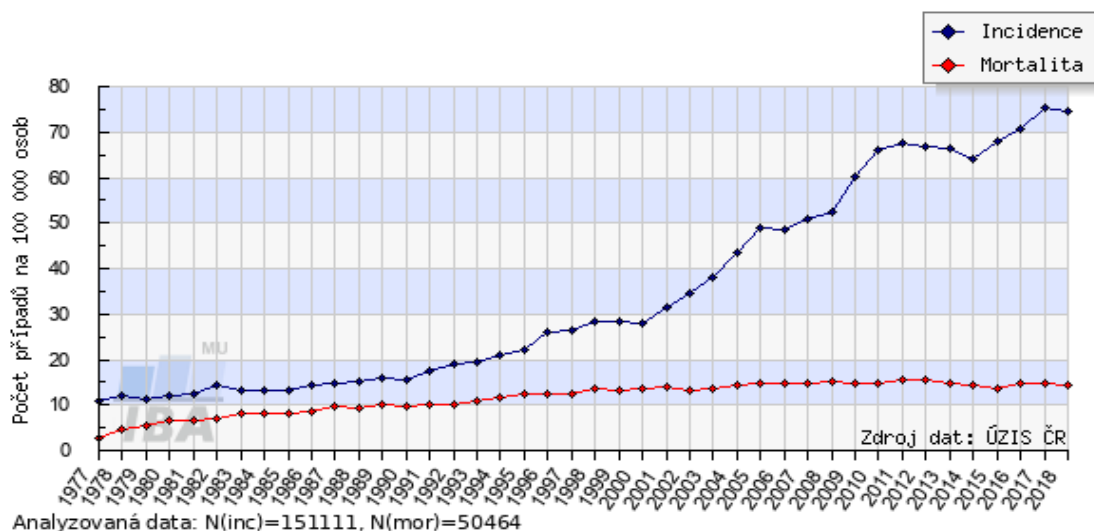
2.2 Karcinom prostaty

2.2.1 Definice a epidemiologie

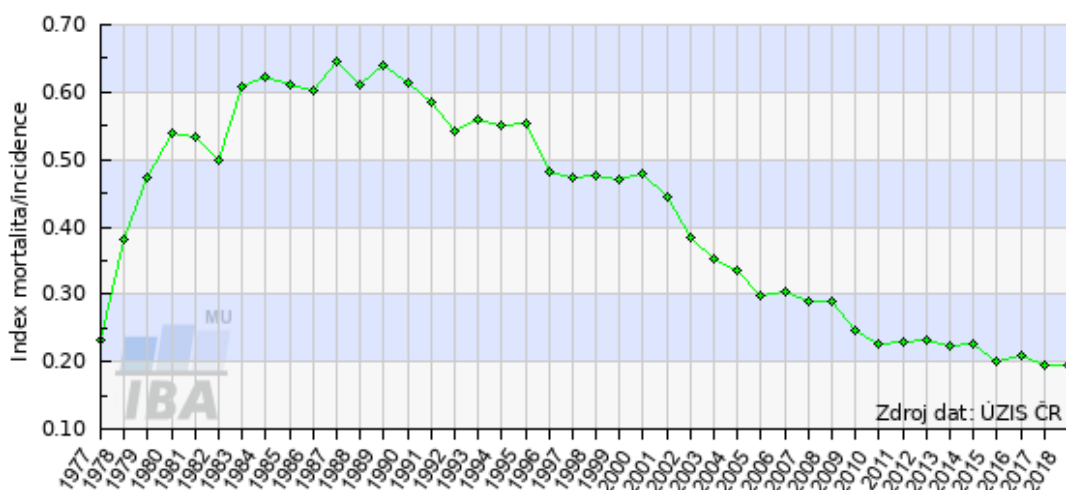
Nádor prostaty, odborně označován karcinom prostaty představuje jednu z nejčastějších forem rakoviny v mužské populaci. Karcinom prostaty (PCa, prostate cancer) je stále významnou příčinou morbiditu a mortality v České republice (Obr. 2 a 3) i v rozvinutých zemích světa (Obr. 4). Postihuje zejména muže staršího věku. (Jemal et al., 2011).

Po karcinomu plic a karcinomu tlustého střeva je třetí nejčastější příčinou úmrtí na zhoubné nádorové onemocnění u mužů v České republice (Dušek et al., 2014). Adenokarcinomy tvoří převážnou většinu zhoubných nádorů prostaty (v periferní zóně). Mohou se šířit lokálně a prorůstat do seminálních váčků. Do regionálních uzlin putuje prostřednictvím lymfatické cesty a do skeletu se šíří krevní cestou. Následně jsou tvořeny metastázy v plicích a játrech. Obvykle se nádory prostaty šíří pomalu, některé však agresivně, zejména pak u mladších jedinců (Nair et al., 2017; Slezáková, 2013).

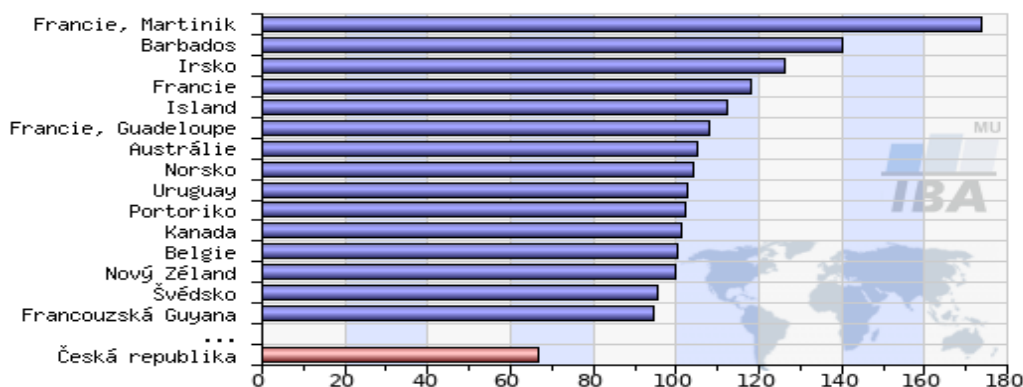
U karcinomu prostaty existuje poměrně vysoká pravděpodobnost vyléčení, avšak musí být zavčas odhalen. S narůstajícím věkem u mužů, obvykle po 50. roku života, jsou velmi důležité pravidelné kontroly u odborného lékaře. Ve většině případů, bývá rakovina prostaty odhalena náhodně, a to z krevního vzorku, kde jsou pozorovány zvýšené hladiny prostatického specifického antigenu. Riziko vzniku rakoviny prostaty souvisí nejen s věkem, ale také s rodinnou anamnézou. Pokud se v rodině vyskytuje otec nebo bratr pacienta s karcinomem prostaty, riziko vzniku nádoru je téměř dvojnásobné. Existuje však řada dalších faktorů (např. rasa a národnost, výživa, kouření), které se mohou podílet na vzniku tohoto nádoru. Rakovina prostaty představuje nejen zdravotní, ale i společenský problém.



Obr. 2: Časový vývoj incidence a mortality pro zvolenou diagnózu karcinomu prostaty u mužů v celé populaci v letech 1977-2018. Převzato z Dušek et al., 2018, dostupné z: www.svod.cz.



Obr. 3: Časový vývoj indexu mortality/incidence (poměr počtu zemřelých na diagnózu k počtu nových případů) pro zvolenou diagnózu karcinomu prostaty v populaci mužů v letech 1977-2018. Převzato z Dušek et al., 2018, dostupné z: www.svod.cz.



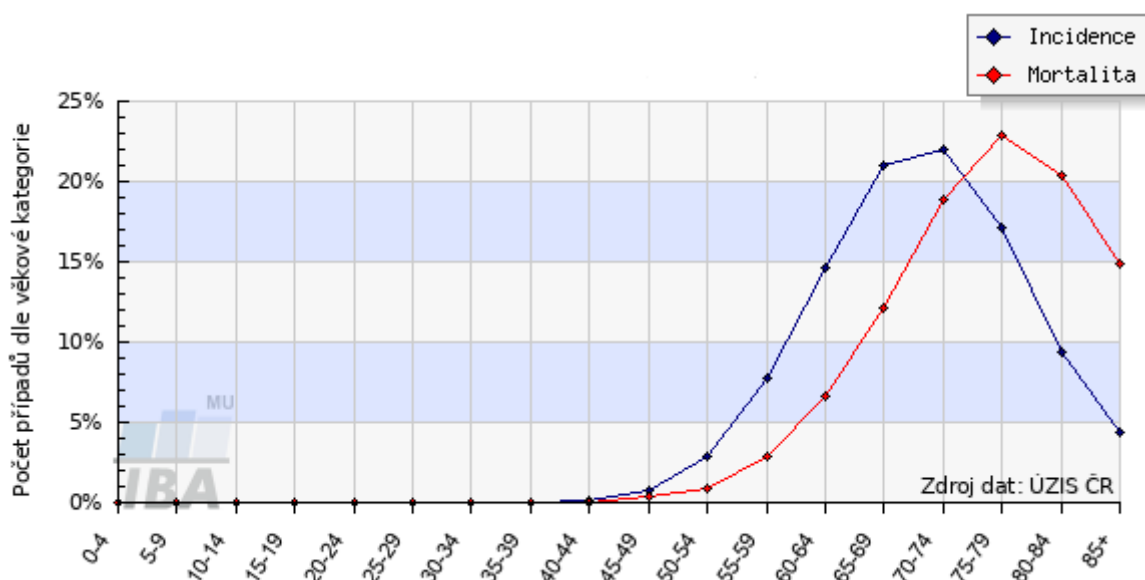
Obr. 4: Srovnání incidence v České republice s ostatními zeměmi světa (pořadí ČR: 31). Převzato z Dušek et al., 2018, dostupné z: www.svod.cz.

2.2.2 Etiologie

Etiologie karcinomu prostaty je doposud neznámá. Vznik karcinomu prostaty je multifaktoriálně podmíněn, ať už se hovoří o genetické predispozici anebo působení zevního prostředí. Základní skupinu rizikových faktorů nádoru prostaty tvoří genetické vlivy, věk a rasa.

V průběhu stárnutí buněk dochází ke vzniku vícečetných mutací genů, které způsobují řadu onkologických onemocnění prostaty. Mutace mohou vznikat působením různých mutagenů: biologických, chemických či fyzikálních. Se vznikem mutace nemusí vždy dojít k maligní transformaci buněk. Hormony jako jsou androgeny, estrogeny, inzulin, IGF (insulin-like growth factor) a další, se mohou podílet na rozvoji karcinomu prostaty, který vzniká v důsledku obezity (Dvořáček et al., 2005; Klein et al., 2007). Geny, které souvisí s rozvojem karcinomu prostaty, jsou nejen geny BRCA1 a BRCA2, které jsou zodpovědné i za rozvoj nádoru prsu a vaječníků, ale také geny RNaseL, ELAC2, MSR1 a řada dalších (Simard et al., 2003).

Jak již bylo řečeno, riziko vzniku karcinomu prostaty stoupá se zvyšujícím věkem pacienta (Obr. 5). Dalším rizikovým faktorem je etnicita. Je prokázáno, že vyšší výskyt onemocnění je v Severní Americe a Evropě, hlavně mezi Afroameričany, naopak nízký výskyt onemocnění je v Japonsku a v Číně. Na patogenezi má vliv také rodinná anamnéza, dietetické vlivy (především obezita) a profesionální vlivy (např. pesticidy, herbicidy nebo radioaktivní záření) (Tomášek, 2015; Nair et al. 2017).



Obr. 5: Věková struktura pacientů s karcinomem prostaty za období 1977-2018. Převzato z Dušek et al., 2018, dostupné z: www.svod.cz.

2.2.3 Možnosti diagnostiky karcinomu prostaty

I přes stále zlepšující se diagnostiku patří karcinom prostaty k nejčastějším příčinám úmrtí na maligní onemocnění u mužů v České republice. Vzhledem k rostoucí délce života jedinců je časná detekce karcinomu prostaty velmi důležitá. Právě časná stádia jsou lépe léčitelná. V současné době není možné zabránit vzniku tohoto onemocnění, není tedy možná tzv. primární prevence. Cílem tzv. sekundární prevence je snaha zachytit karcinom prostaty nejpozději ve 2. stádiu onemocnění. Díky zavedení vyšetření prostatického specifického antigenu (PSA) do klinické praxe se snaha detekovat onemocnění lokalizované na prostatu vesměs daří. V časném stádiu onemocnění nemusí být vyvolány žádné příznaky, a proto je důležité včasné vyšetření pacienta urologem a sledování hladin PSA. Pokud jsou příznaky již karcinomem vyvolány, jedná se obvykle o pokročilé stádium (Dvořáček et al., 2005).

K samotné diagnostice časného karcinomu prostaty slouží standardní klinické testy, a to vyšetření prostaty per rectum, stanovení sérové hodnoty PSA pacienta a biopsie prostaty pod kontrolou transrektální ultrasonografie. V diagnostice karcinomu prostaty dále hrají významnou roli zobrazovací metody (magnetická rezonance, výpočetní tomografie, transrektální ultrasonografie, scintigrafie a rentgen skeletu). S využitím uvedených metod lze nejen včas odhalit karcinom prostaty, ale také jej podrobně charakterizovat a určit rozsah nádorového postižení podle TNM klasifikace (Dvořáček et al., 2005; Kawaciuk, 2009).

Vyšetření per rectum (DRE- digitální rektální vyšetření) je v ambulanci snadno proveditelné vyšetření dostupné každému lékaři. Má významnou roli při screeningu u mužů starších 50 let. Nevýhodou je, že pomocí dané metody nelze zjistit přítomnost malých lézí. Za normálních okolností je prostatická tkáň hladká, elastická a ohraničená. V případě, že je při DRE na prostatě detekováno kulovité ložisko nebo tuhé části a neohraničené okraje, jedná se o suspektní stav a u tohoto pacienta je indikováno provedení biopsie prostaty. Karcinom prostaty je nejčastěji lokalizován v oblasti periferní zóny prostaty a lze ho pomocí DRE detekovat pouze v případě, pokud jeho velikost překračuje 0,2 ml (Adam et al., 2004; Gosselaar et al., 2008).

K diagnostice a sledování karcinomu prostaty se využívá výše zmiňovaný prostatický specifický antigen, kdy se hodnotí jeho hladina v krvi. Hladinu PSA v krvi ovlivňuje produkce androgenů, karcinom prostaty, ale také nenádorové onemocnění prostaty. Je druhem orgánově specifických, ale ne nádorově specifických antigenů. Koncentrace PSA v séru zdravého jedince dosahuje hodnot od 2,5 µg/l (muži do 50 let)

do 6,5 µg/l (nejstarší věková skupina). Obvyklá koncentrace je udávána do 4 µg/l (ng/ml). Hodnoty koncentrace PSA nad 10 ng/ml představují pravděpodobný nález karcinomu po punkční biopsii. Pokud jsou hodnoty koncentrace v tzv. šedé zóně 4-10 ng/ml, tak další postup určuje urolog na základě celé řady parametrů (Kawachi et al., 2010).

V krvi se PSA vyskytuje i ve volné formě (tzv. freePSA) a její stanovení může pomoci při rozhodování o provedení punkční biopsie. Pokud je procento volného PSA (z celkové hladiny PSA) $\geq 25\%$, je nádor málo pravděpodobný, naopak pokud je procento $\leq 25\%$, riziko roste (Adam et al., 2004). V poslední době je možné využít i komerční stanovení [-2]proPSA (prekurzoru PSA) nebo PCA3 v moči (prostate cancer associated 3), které mohou dále zpřesnit diagnostiku karcinomu prostaty (Luca et al., 2015).

Základním urologickým vyšetřením je transrektální ultrasonografie (TRUS). Metoda využívá speciální ultrazvukovou sondu zavedenou do konečníku a hodnotí velikost prostaty, symetrii či asymetrii laloků a také ve značné míře dokáže posoudit extraprostatické šíření nádoru. Při hodnocení ložiskových lézí u prostaty může docházet k falešné pozitivitě i negativitě. V případě nejistého či podezřelého sonografického obrazu, následuje odběr tkáně k histologickému vyšetření. Pro histologické vyšetření se odběr vzorků z prostaty provádí transrektální biopsií. Pro diagnostiku karcinomu prostaty je v současné době také často využívána magnetická rezonance (Ahmed et al., 2017).

2.2.4 Stádia onemocnění

Pokud je karcinom omezen pouze na vlastní tkáň, tedy na prostatu, jedná se o lokalizovaný karcinom. V případě, že nádor proniká do okolních struktur, do semenných váčků či močového měchýře, hovoříme o lokálně pokročilém karcinomu prostaty. Při metastatickém typu karcinomu prostaty se rakovina prostaty šíří do okolí prostaty, ale též vytváří metastázy ve vzdálenějších orgánech (Adam et al., 2004).

Tab. 1: TNM klasifikace nádorů.

TNM klasifikace	
T kategorie	
T0	Žádné známky tumoru.
T1	Nádor je náhodným histologickým nálezem.
T1a	Ne více než tři ložiska karcinomu.
T1b	Více než tři ložiska karcinomu.
T2	Nádor je přítomen klinicky nebo makroskopicky, ohraničen na žlázu.
T2a	Nádor do 1,5 cm s normální tkání nejméně na třech místech.
T2b	Nádor větší než 1,5 cm nebo více než v jednom laloku.
T3	Nádor infiltruje apex prostaty nebo na druhé straně pouzdro prostaty nebo hrdlo měchýře nebo semenné váčky; ještě není fixován k okolí.
T4	Nádor je fixován nebo infiltruje sousední struktury, které při T3 nejsou postiženy.
N kategorie	
N0	Žádné metastázy do regionálních uzlin.
N1	Metastázy v solitární uzlině, 2 cm nebo menší.
N2	Metastázy v solitární uzlině > 2 cm a < 5 cm nebo ve více uzlinách a žádná > 5 cm.
N3	Metastázy v uzlinách převážně > 5 cm.
M kategorie	
M0	Žádné známky metastázy.
M1	Vzdálené metastázy.
Grading	
G1	Vysoce diferenciovaný karcinom (s malou anaplazií jader)
G2	Málo diferenciovaný karcinom (s jednotlivými kribriformními ložisky a s malou anaplazií jader).
G3	Nediferenciovaný karcinom (kribriformní a solidní karcinom se silnou anaplazií jader).

K popisu rozsahu nádoru slouží tzv. TNM klasifikační systém (Tab. 1). Rozsah primárního nádoru hodnotí T parametr. N parametr stanovuje rozsah postižení regionálních lymfatických uzlin. M parametr hodnotí přítomnost nebo nepřítomnost vzdálených metastáz. Klasifikace umožňuje popsat velikost nádoru jeho vlastnosti a šíření. S využitím TNM klasifikace, Gleasonova skóre a hladin PSA se stanovuje klinické stádium onemocnění a následná terapie (Becker, 2005).

2.2.5 Terapie karcinomu prostaty

Terapie karcinomu prostaty závisí na závažnosti onemocnění a na faktorech, které určují jeho progresi. Většina diagnostikovaných PCa jsou adenokarcinomy. Ty se dělí podle klinického stádia na nádory lokalizované, lokálně pokročilé a metastatické. Dále se PCa rozděluje podle hormonální senzitivity na hormonálně-senzitivní (HSPC; hormone-

senzitive prostate cancer) a kastračně-rezistentní karcinom prostaty (CRPC; castration-resistant prostate cancer).

Při terapii PCa rozlišujeme dvě varianty přístupu k nemoci a to aktivní terapii a odloženou léčbu. Aktivní terapii následně dělíme na kurativní a paliativní. Kurativní terapie je využívána především pro lokalizované karcinomy. Zabezpečuje kompletní odstranění nebo zničení nádoru. Hlavní léčebnou metodou lokalizovaných nádorů prostaty je operativní odstranění (tzv. chirurgická prostatektomie) prostatické žlázy společně s pouzdem prostaty a semennými vajíčky. Vedle radikální prostatektomie je druhou možností radioterapie (léčba zářením). Tyto postupy lze kombinovat u lokálně pokročilých karcinomů s hormonální terapií. Odložená terapie se používá především pro nízké rizikové karcinomy u starších pacientů s očekávanou krátkou dobou přežití (Poláková et al., 2014).

Mezi nejvíce používanou léčbu pokročilých nádorů patří hormonální terapie. Hormonální léčba se zaměřuje na snížení tvorby hormonů či zablokování jejich účinku na nádorovou tkáň. Důsledkem může být vznik apoptózy buněk závislých na androgenech. Hormonální terapie zahrnuje androgenní deprivaci léčbu a podávání antiandrogenů. Androgenní deprivace se docílí buď chirurgickým oboustranným odstraněním varlat (orchiektomie) nebo medikamentózní kastrací. U pacientů s metastatickým karcinomem je medikamentózní kastrace první volbou terapie. Je založena na aplikaci agonistů LHRH. Steroidními nebo nesteroidními antiandrogeny dochází k potlačení účinků reziduálních androgenů (např. z nadledvinek) (Podrazil et al., 2016; Saad et al., 2015).

2.2.6 Kastrálně rezistentní karcinom prostaty

Po léčbě hormon-senzitivního onemocnění adenokarcinomu prostaty se pacienti po 2-3 letech dostávají do fáze kastračně-rezistentního karcinomu prostaty (CRPC, castration-resistant prostate cancer). Dochází k opětovnému zvýšení hladiny PSA v krvi, což je doprovázeno radiografickou nebo klinickou progresí (Hanuš et al., 2015). CRPC je definován kastrační hladinou testosteronu <50 ng/dl v séru společně s biochemickou nebo radiologickou progresí. V případě biochemické progresce dochází k vzestupu hladiny PSA v krvi třikrát po sobě s odstupem minimálně jednoho týdne. Podmínkou pro potvrzení radiologické progresce je výskyt dvou nebo více nových kostních lézí prokazatelných na kostním scanu nebo progresce lézí měkkých tkání dle RECIST (Response evaluation criteria in solid tumors) (Hotte et al., 2010; Shafi et al., 2013).

Prognóza CRPC závisí na různých faktorech (celkový stav pacienta, bolest ve skeletu nebo rozsah onemocnění na kostním scanu). Téměř u 90 % mužů s CRPC se objevují kostní metastázy. Jsou velmi bolestivé a mohou vést ke zlomeninám nebo útlumu kostní dřeně. Anémie, únava, úbytek na váze a zvýšená náchylnost k infekcím jsou častými projevy doprovázející CRPC.

2.2.7 Terapie kastračně rezistentního karcinomu prostaty

CRPC je nejčastěji léčen pomocí nové antiandrogenní léčby (ARTA, androgen receptor targetin), chemoterapie a radioterapie. Základem protinádorové léčby je chemoterapie, která pro likvidaci nádorových buněk využívá určité chemické látky. V první linii léčby CRPC je možné podávat docetaxel (75 mg/m², intravenózně jednou za tři týdny) v kombinaci s prednisonem (5 mg, per os dvakrát denně) v rámci systémové chemoterapie u pacientů s CRPC s detekovatelnými metastázami. Docetaxel je široce používaným cytostatikem a prodlužuje přežití onkologicky nemocných pacientů o několik měsíců. Zmírňuje symptomy a zlepšuje jeho kvalitu života (Hanuš et al., 2015). Při léčbě docetaxelem se mohou objevit vedlejší účinky jako zvracení, průjem, únava, ztráta vlasů, alergické reakce nebo anémie. Po ukončení léčby docetaxelem, může být pacient léčen hormonálně anebo dalšími chemoterapeutickými léky (cabazitaxel).

Mezi nové hormonální léky patří především enzalutamid a abirateron. Enzalutamid je antiandrogen blokující vazbu androgenů na AR a vazby AR na DNA. Je podáván perorálně buď u nemocných bez, nebo s minimálními příznaky nádorového onemocnění. Návaly horka, bolest hlavy a únava jsou nejčastějšími projevy toxicity. Může také docházet k epileptickým záchvatům. U těchto pacientů byly identifikovány rizikové faktory, např. mozkové metastázy (Scher et al., 2010). Abirateron působí jako inhibitor enzymu androgenní biosyntézy CYP17 (podílí se na biosyntéze androgenu v nadledvinách) (Potter et al., 1995). Je podáván perorálně stejně jako enzalutamid, často v kombinaci s kortikosteroidy, kvůli účinku na nadledviny. Abirateron snižuje hladinu androgenů v krvi, zpomaluje růst nádorů a metastáz.

2.3 Androgenový receptor

Vývoj a růst normální prostaty i PCa je řízen testosteronem a 5α - dihydrotestosteronem (DHT) (Culig et al., 1998). Prostřednictvím vazby na AR tyto hormony uplatňují své biologické účinky. Receptor se po vazbě na hormonální ligand odděluje od pomocných proteinů, translokuje do jádra a dimerizuje. Poté se váže na "androgen response

element" (ARE) umístěný v promotorových oblastech cílových genů. Receptor působí jako transkripční faktor aktivovaný ligandem (Dehm, Tindall, 2011).

Gen androgenového receptoru leží na dlouhém raménku chromozomu X (na pozici Xq12). Pro androgenový receptor jsou zásadní tři hlavních domény: N-terminální doména (NTD, N-terminal domain), DNA vazebná doména (DBD, DNA-binding domain) a C-koncová ligand-vázající doména (LBD, ligand-binding domain). Genový transkript plné délky obsahuje osm exonů. N-koncová doména je kódovaná exonem 1. DNA-vazebnou doménu kóduje exon 2 a 3. Oblast hinge (H) region je kódovaná částí exonu 4. Zbývající část exonu 4 společně s exony 5, 6, 7 a 8 kódují ligand vazebnou doménu (Germann, 2002).

Všechny tři domény jsou nezbytné pro správnou funkci receptoru. DBD váže androgenový receptor do promotorových a enhancerových oblastí cílových genů přímým navázáním k DNA. Díky této vazbě je aktivační funkce (AF-1, AF-2) z NTD a LBD schopna stimulovat transkripci těchto genů. AF1 obsahuje dvě aktivační jednotky transkripce, Tau-1 a Tau-5 (Callewaert et al., 2006). AF-1 je v NTD permanentně aktivní, zatímco AF-2 je závislá na ligandu (Tan et al., 2015).

NTD doména je tvořena velkým množstvím CAG (polyglutamin) a GGC (polyglycin) repetice, které se pravidelně opakují. Sekvence jsou vysoce variabilní (Sasaki et al., 2003). Na základě interakce s dalšími transkripčními faktory reguluje N-koncová doména transkripci cílových genů.

DBD je oblast bohatá na cysteiny. Vytváří dva komplexy. Každý z komplexů je složen ze dvou zinkových prstů. Zinkový prst je tvořen čtyřmi cysteinovými zbytky, které koordinují ionty zinku. Součástí prvního zinkového prstu je P-box a díky němu je DBD schopna rozpoznat DNA a navázat se na ni. Zatímco D-box je součástí druhého zinkového prstu. D-box zajišťuje dimerizaci receptoru (Dehm, Tindall, 2011).

LBD se podílí na utváření vazebného místa pro ligand a je tvořena z jedenácti α -šroubovic a čtyř krátkých β řetězců tvořících dva antiparalelní β -listy. (Jenster et al., 1991).

Na AR se mohou vázat antiandrogeny, které blokují funkci androgenového receptoru. Antagonizují působení androgenů tím, že kompetují o vazebná místa AR. Antiandrogeny se dělí na steroidní a nesteroidní. Do skupiny steroidních antiandrogenů patří cyproteronacetát. Kvůli častým nežádoucím účinkům steroidních antiandrogenů, byly vyvinuty nesteroidní antiandrogeny. Toluidinové deriváty, jako je flutamid a bicalutamid, jsou příkladem nesteroidních antiandrogenů. Jedná se o antiandrogeny bez androgenních vlastností, proto jsou vhodné pro léčbu rakoviny prostaty (Singh et al.,

2000). V poslední době se používá především nová ARTA terapie (enzalutamid nebo abirateron, viz výše).

Zvýšení terapeutické rezistence u karcinomu prostaty může být způsobeno amplifikací androgenového receptoru (Koivisto et al., 1997). Zjištění této amplifikace u pacientů s CRPC může předpovídat selhání ARTA terapie.

2.3.1 Zesilovač transkripce androgenového receptoru

Nádorové onemocnění je charakteristické tím, že často dochází k ovlivnění procesů regulace transkripce. Specifickou regulaci genů v průběhu vývoje a v různých typech buněk zajišťuje aktivita transkripčních faktorů. Prostřednictvím vazby proteinových transkripčních faktorů (aktivátory, represory) na regulační oblast genu (promotory, zesilovač transkripce) je uskutečněna regulace transkripce. Sekvence zesilovačů jsou regulační DNA sekvence aktivující promotory. Na základě vazby transkripčního faktoru na zesilovač je ovlivněno to, zda dojde ke genové expresi a v jaké míře v určitém čase a daném typu buňky bude exprese probíhat. Působením zesilovačů dochází ke změnám chromatinu a následně ke zpřístupnění promotoru nebo také mohou usnadňovat vazbu RNA polymerázy (Sadler, 2011).

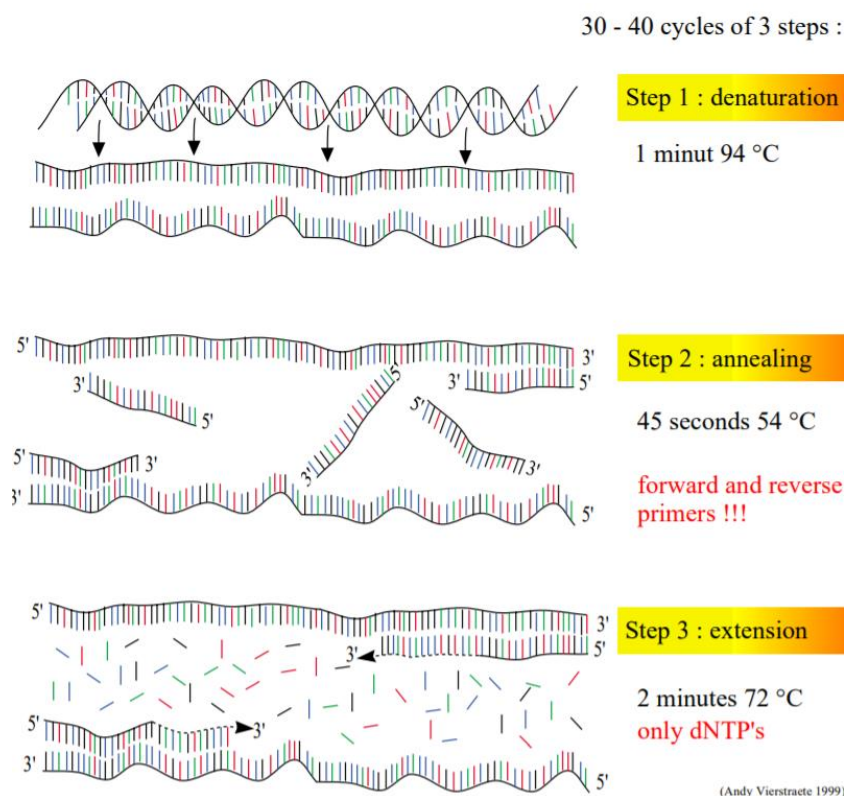
Naopak represory zabraňují genové expresi během diferenciaci nebo progresu buněčného cyklu (Li et al., 2011). Nejčastěji je vazba AR studována na lokusu genu kallikrein-3 (KLK3, alias PSA). AR společně s jeho regulátory je v reakci na androgeny rekrutován do cis prvků před promotorem (ARE I a ARE II) (Pang et al., 1995; Cleutjens et al., 1996) a oblasti zesilovače (ARE III) (Cleutjens et al., 1997) genu KLK3.

Rovněž exprese samotného AR může být regulována pomocí zesilovačů transkripce. Ke sledování aktivních promotorů a zesilovačů transkripce může být používána sekvenace oblastí s acetylovanými histony (H3K27ac ChIP-seq; Takeda et al. 2018). Recentní práce zjistila přítomnost nového aktivovaného zesilovače AR pouze u CRPC pacientů a nikoli u hormonálně sensitivních nádorů. Tento zesilovač je umístěn 650 kb centromericky k AR. Podobně jako samotný AR může být amplifikován, čímž dochází k rezistenci na hormonální léčbu (Takeda et al. 2018).

2.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) pochází z anglického názvu Polymerase Chain Reaction. Jedná se o molekulárně genetickou metodu rychlého a snadného zmožení (amplifikace) vybraného úseku DNA. PCR metoda je založena na podobném principu, podle kterého dochází k syntéze DNA v průběhu replikace DNA v buňce. Úsek DNA,

který je enzymaticky amplifikován, je ohraničen tzv. primery (forward a reverse). Tyto oligonukleotidy jsou obvykle dlouhé 20-25 nukleotidů a vyčleňují úsek templátu, který má být amplifikován. Na základě komplementarity bazí, primery specificky nasedají na DNA a v dalším kroku termostabilní enzym DNA polymeráza zprostředkovává syntézu DNA ve směru 5'-3' podle sekvence nukleotidů v templátu. Nejčastěji používaným enzymem pro PCR je Taq polymeráza, která je izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Umožňuje opakované zahřátí až na teplotu 95°C, kdy dochází k denaturaci dvoušroubovice DNA. Cyklickým opakováním základních tří kroků, denaturace, nasednutí primerů a syntéza nových vláken DNA, je dosaženo mnohonásobné amplifikace (Šmarda et al., 2005).



Obr. 6: Princip polymerázové řetězové reakce. Dostupné z: <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

Kromě vzorku DNA obsahující zkoumaný úsek, syntetických primerů a termostabilního enzymu obsahuje PCR reakce i další nezbytné složky jako jsou deoxynukleotidtrifosfáty (adenin, guanin, cytosin, thymín), Mg^{2+} ionty a PCR pufr. Právě hořčnaté ionty zajišťují optimální podmínky pro aktivitu polymerázy. Samotná PCR reakce probíhá v termocycleru, v zařízení s vhodnými teplotními podmínkami (Šmarda et al., 2005). Existují základní 3 generace PCR metod: I. generace - tradiční PCR s detekcí produktů pomocí elektroforézy, II. generace - kvantitativní PCR (quantitative

PCR, qPCR) s fluorescenční detekcí v reálném čase, III. generace - digitální (droplet digital PCR, ddPCR).

Polymerázová řetězová reakce má velký rozsah využití, velký pokrok přinesla zejména v oblasti lékařské a diagnostické aplikace, kde umožňuje odhalit různá dědičná onemocnění, onkologická onemocnění, infekční nemoci včetně nemocí zapříčiněné bakteriemi nebo viry. PCR se využívá také ve forenzní vědě a výzkumu. Díky svým výhodám jako je jednoduchost, rychlost, vysoká citlivost a výkonnost patří k předně používaným technikám (Mendel et al., 2020).

2.4.1 Kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase

Kvantitativní PCR v reálném čase, označovaná též jako real-time PCR je metoda, která je založená na principu klasické PCR. Využívá speciálního cycleru, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává množství amplifikovaného produktu DNA v průběhu jednotlivých cyklů reakce. Na rozdíl od klasické PCR, kde se s využitím gelové elektroforézy určuje přítomnost nebo absence specifického produktu, u kvantitativní PCR lze získat přesnou informaci o množství produktu. Množství DNA je měřeno na základě přítomnosti fluorescenčního signálu. Pro detekci se používají buď interkalační barviva (např. SybrGreen) nebo specifické sondy (TaqMan sondy, Molecular Beacon sondy, Scorpion sondy nebo Fret sondy) (Bustin, 2004; Penka et al., 2011).

2.4.2 Digitální PCR

V porovnání s kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase umožňuje ddPCR přesnější kvantifikaci bez potřeby užití kalibrační křivky. Metodu lze využít v různých oblastech např. biomedicínské aplikace, forenzní genetika, autentizace rostlin nebo analýza potravin.

Principem ddPCR je rozdělení kopií DNA ze vzorku do jednotlivých kapiček (droplets), ve kterých probíhá vlastní amplifikace. Touto reakcí se může vytvořit až 20 000 kapiček. Systém následně vyhodnotí počet fluorescenčně pozitivních a negativních kapiček (Fialová et al., 2019). Složení reakční směsi pro digitální PCR je stejné jako pro kvantitativní PCR. Obvykle jsou v jedné reakci sledované dva cíle, jejichž odlišení umožňují rozdílné fluorescenční značky (FAM a HEX) (Fialová et al., 2019).

2.5 Tekutá biopsie

Tekutá biopsie na rozdíl od klasické biopsie umožňuje neinvazivní analýzu nádorových komponent z krevních vzorků, případně i z jiných tělních tekutin. Tento přístup je možný

dle potřeb provádět i opakovaně v jakémkoliv zdravotnickém zařízení nejen na specializovaných klinikách. Často jsou tekuté biopsie prováděny v rámci multicentrických klinických studií (Hocking et al., 2016). Kromě cirkulujících nádorových buněk (CTC, circulating tumor cells) se stále častěji analyzují i volné nukleové kyseliny (cfRNA/DNA, cell-free), případně proteiny či metabolity. Zavedení techniky NGS napomáhá ke zvýšení výtěžnosti tekuté biopsie (Palmirotta et al., 2018). Výsledky jsou používány pro účely diagnostiky, prognózy a sledování rezistence vůči léčivým přípravkům. Prozatím tekutá biopsie nepatří k rutinním metodám v klinické praxi, i když stále narůstají důkazy o jejich výhodách pro detekci mutací a dalších nádorových parametrech v reálném čase (Kubackzková et al., 2017; Palmirotta et al., 2018).

Studie posledních let identifikovaly opakující se somatické mutace, změny počtu kopií a chromozomální přesmyky z metastatických míst CRPC (Beltran et al., 2013; Robinson et al., 2015; Wyatt et al., 2017). Tkáň PCa, která metastazuje do kostí, není snadné získat. I správně odebraný vzorek nemusí vždy obsahovat dostatečné množství nádoru a není poté vhodný pro genetické studie. Protože CRPC je vysoce heterogenní onemocnění, tak biopsie jednoho místa nemusí odrážet molekulární charakteristiky všech nádorových míst (Sumiyoshi et al., 2019). Naopak cirkulující biomarkery mohou být uvolňovány z více ložisek a být dostupné pro analýzu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a materiály

Experimentální část diplomové práce byla provedena s využitím uvedených přístrojů a materiálů.

3.1.1 Přístrojové vybavení

- Automatický generátor kapiček (Bio-Rad)
- Centrifuga 5430 (Eppendorf)
- Centrifuga 3K30 (Sigma)
- Centrifuga MR 22i (Jouan)
- Elektroforetický systém Mini PROTEAN® TetraCell (Bio-Rad)
- Flow-box Aura vertical SD4 (Bio-Air)
- Flow-box s vertikálním prouděním vzduchu MSC-Advantage (Thermo Scientific)
- Inkubátor Class 100 HEPA (Thermo Scientific)
- Inkubátor HERA cell (Heraeus)
- Light cycler® 480 (Roche)
- Magnetická míchačka MR 1000 (Heidolph Instruments)
- Master cycler Pro S (Eppendorf)
- Minicentrifuga Blue (Labnet)
- Minicentrifuga EPP Minispin plus (Eppendorf)
- Pronikatelne tepelně těsnící fólie, kat. č. 1814040 (Bio-Rad)
- PX1™ PCR zatavovač desek (Bio-Rad)
- QX200™ čtečka kapiček (Bio-Rad)
- Spektrofotometr Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Světelný mikroskop Eclipse TS100 (Nikon)
- T100™ Touch™ thermal cycler (Bio-Rad)
- Termoblok TS-100C (Biosan)
- UV transiluminátor G:Box (Syngene)
- Vodní lázeň TW8 (Julabo)
- Vortex (IKA)

Výrobce/stát

Bio-Air (Itálie), Bio-Rad (USA), Biosan (Lotyšsko), Eppendorf (Německo), Heidolph Instruments (Německo), Heraeus (Německo), IKA (Německo), Julabo (USA), Jouan (USA), Labnet (USA), Nikon (Japonsko), Roche (Německo), Sigma (USA), Syngene (Indie), Thermo Fisher Scientific (USA)

3.1.2 Spotřební materiál a další pomůcky

- Automatické pipety (Eppendorf)
- Bürkerova komůrka
- DG32™ kazety automatického generátoru kapiček , kat. č. 1864108 (Bio-Rad)
- Kultivační lahve (Thermo Plastic Products, TPP)
- LoBind kolonky (Qiagen)
- Mikrozukmavky 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf)
- Namražovací stojan na 96 jamkovou destičku (Roche)
- PCR destička čirá, Semi-Skirted, kat. č. 12001925 (Bio-Rad)
- PCR 8 zukmavkové stripy (Bio plastics)
- Petriho misky
- Pinzeta
- QIAamp Mini spin kolonky (Qiagen)
- QIAamp sběrné zukmavky (Qiagen)
- RNeasy Midi spin kolonky (Qiagen)
- RNeasy MinElute spin kolonky (Qiagen)
- Špičky s filtrem (Eppendorf)
- 96 jamkové destičky + fólie (Roche)

Výrobce/stát

Bio plastics (Nizozemsko), Eppendorf (Německo), Qiagen (Německo), Thermo Plastic Products (Švýcarsko)

3.1.3 Chemikálie a roztoky

V experimentální části diplomové práce byly uplatněny následující chemikálie a roztoky.

- ddPCR olej na čtení kapiček, kat. č. 1863004 (Bio-Rad)
- ddPCR supermix pro sondy (no dUTP) 2x, kat. č. 1863023 (Bio-Rad)
- Deionizovaná voda

- DNAfree voda
- DNase I Amp Grade (kit obsahuje enzym DNase I Amp Grade, 10× DNase reakční pufr, 25mM EDTA pH 8.0) (Invitrogen)
- DNase I Reaction Buffer 10x (Invitrogen)
- Dichlordifenyiltrichlorethan; DTT 0,1M (Invitrogen)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina; EDTA 25 mM (Thermo fisher scientific)
- Ethanol 96% (Lachema)
- First strand Buffer 5x (Invitrogen)
- Led
- LightCycler 480 Probe Master Mix 2x (kit obsahuje 2x koncentrovaný Master Mix, 25mM MgCl₂, PCR vodu) (Roche)
- Olej pro sondy v automatickém generátoru kapiček, kat. č. 186-4110 (Bio-Rad)
- PrimePCR pro ddPCR mutační detekční assay 20x; (EGFR T790M wt kat. č. 10031249, EGFR T790M mut kat. č. 10031246, EGFR Exon 19 Deletions Screening Kit kat. č. 12002392) (Bio-Rad)
- Protector RNase inhibitor (Roche)
- Pufr pro restrikční enzym NeBuffer 10x (BioLab)
- Restrikční enzym XbaI (BioLab)
- RNAfree voda
- Směs deoxyribonukleotidů 10 mM (dNTP, Top-Bio s.r.o.)
- Specific primers 10 μM (směs rv primerů)
- Spike I (TATAA Universal RNA Spike I, Probe FAM a primermix) (TATAA Biocenter)
- Spike II (TATAA Universal RNA Spike II, Probe FAM a primermix) (TATAA Biocenter)
- SuperScript™ III Reverse Transkriptase (kit obsahuje enzym SuperScript™ III (200 U/μl), 5x first strand pufr (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 0,1M DTT) (Invitrogen)

Pasáž buněk

- Dimethylsulfoxid 10%; DMSO (Sigma-Aldrich)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM (Invitrogen)
- Fetální bovinní sérum 10%; FBS (Invitrogen)
- Glutamax (Sigma-Aldrich)

- L-glutamin 2 mM (Sigma-Aldrich)
- Penicilin 1U/ml (Sigma-Aldrich)
- Phosphate buffered saline PBS 1x (sterilní fosfátový pufr)
- Pyruvát sodný 1 mM (Sigma-Aldrich)
- RPMI médium 1640 (Sigma-Aldrich)
- Streptomycin 1U/ml (Sigma-Aldrich)
- Trypsin EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich)

Izolace DNA z plné nesrážlivé krve kitem QIAamp DNA Blood Mini

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
 - Eluční AE pufr
 - Lyzační AL pufr
 - Qiagen proteáza
 - Promývací AW1 pufr
 - Promývací AW2 pufr
- RNáza A (Qiagen)
- Elektroforetická separace
 - Akrylamid/Bisakrylamid 30%, 29:1 (Serva)
 - GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000x (Biotium)
 - N, N, N', N' tetramethylethyldiamin; TEMED (Serva)
 - Peroxodisíran amonný 10%; PERS (Serva)
 - Standard molekulové hmotnosti HyperLadder 25 bp (Bioline)
 - Tris borát EDTA pufr; TBE pufr 5x (445 mM Tris (NH₂C(CH₂OH)₃), 445 mM kyselina boritá (H₃BO₃), 10 mM EDTA, pH 8,2-8,4)
- Izolace ccfDNA/RNA z krevní plazmy pomocí QIAamp kitu (Qiagen)
 - Ethanol 100% (Lachema)
 - Ethanol 80% (Lachema)
 - Isopropanol
 - RPE pufr
 - RPL pufr
 - RPM pufr
 - RPP pufr
 - RWT pufr

Výrobce/stát

Bioline (Itálie), BioCenter (Rakousko), Bio-Rad (USA), Biotium (USA), Invitrogen (USA), Lachema (ČR), Qiagen (Německo), Roche (Německo), Serva (Německo), Sigma-Aldrich (USA), Top-Bio s.r.o. (ČR)

3.1.4 Primery, próby a komerční testy

V experimentální části diplomové práce byly uplatněny následující primery, próby a komerční testy.

- Primer forward (10 μ M) ARenh8_fw (GeneriBiotech)
- Primer forward (10 μ M) ARenh14_fw (GeneriBiotech)
- Primer reverse (10 μ M) ARenh8_rv (GeneriBiotech)
- Primer reverse (10 μ M) ARenh14_rv (GeneriBiotech)
- Probe UPL8 (10 μ M) kat. č. 04685067001 (Roche)
- Probe UPL14 (10 μ M) kat. č. 04685130001 (Roche)
- Taqman Copy Number Assay pro AR (20x), Assay ID: Hs04107225 (ThermoFisher Scientific)
- Taqman Copy Number Reference assay pro RNaseP (20x), Assay ID: 4403326 (ThermoFisher Scientific)

Tab. 2: Charakteristické vlastnosti primerů pro komerční test probe UPL8.

Primer	Délka	Start	stop	Sekvence
Left	18	323	340	GAAGGCCAGGTGGTTTGTG
Right	27	390	416	CAATTCCCTTACACTTTCTTGTTATCT

Tab. 3: Charakteristické vlastnosti primerů pro komerční test probe UPL14.

Primer	Délka	Start	stop	Sekvence
Left	20	1336	1355	TGTCTTTTGACCCCTGTTGG
Right	20	1380	1399	AAGTGGGTCCCTGACACTTG

Výrobce/stát

GeneriBiotech (ČR), Roche (Německo), ThermoFisher Scientific (USA)

3.1.5 Biologický materiál

Experimenty byly provedeny na buněčných liniích VCap a LNCaP odvozených od karcinomu prostaty. Obě buněčné linie byly zakoupeny od American Type Culture

Collection (ATCC, USA). Dále byly použity buněčné linie DU145a, LAPC4, PC3, DUCaP, RWPE-1a, C4-2a, WPMY-1a, EP156T, které byly poskytnuty paní Mgr. Janou Knillovou, Ph.D (Ústav klinické a molekulární patologie, Olomouc). Jednotlivé buněčné linie mají specifické požadavky na kultivaci. Veškeré činnosti byly vykonány ve sterilních podmínkách ve flow-boxu s vertikálním prouděním vzduchu (Thermo Scientific, USA).

Pro experimenty byla rovněž použita plná krev pacientů (N=10) s karcinomem prostaty, která byla odebrána na Onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci.

3.1.6 Počítačové programy

- program pro ddPCR: Quanta Soft version 1.7.4.0917 (Bio-Rad)
- program pro qPCR: Lightcycler 480Software release 1.5.1.62SP3 (Roche)

Výrobce/stát

Bio-Rad (USA), Roche (Německo)

3.2. Metody

Pro vypracování experimentální části diplomové práce byly použity níže uvedené metody.

3.2.1 Kultivace a příprava buněčných linií

Nádorové buňky linie VCaP rakoviny prostaty byly kultivovány v médiu DMEM obsahující 10% fetální bovinní sérum, 2 mM L-glutamin, antibiotika penicilin (1 U/ml) a streptomycin (1 U/ml). Buňky LNCaP rakoviny prostaty byly kultivovány v médiu RPMI 1640 obohacené o 10% FBS, 2 M L-glutamin, 1 mM pyruvát sodný a příslušná antibiotika penicilin (1 U/ml) a streptomycin (1 U/ml).

Kultivace buněčných linií byla provedena v kultivačních lahvích v inkubátoru při teplotě 37°C v atmosféře s obsahem 5% oxidu uhličitého a 100% vlhkosti. Pasáž buněk byla uskutečněna dle potřeby buněk. K pasážování obou nádorových linií byl použit 0,25% trypsin-EDTA. Pomocí Bürkerovy komůrky byl stanoven počet buněk. Byly připraveny suspenze těchto buněčných linií (směs buněk 90 000 LNCaP a 10 000 VCaP, směs buněk 100 000 LNCaP a 1 000 VCaP, směs buněk 100 000 LNCaP a 100 VCaP, směs buněk 100 000 LNCaP a 10 VCaP). Vzorky byly skladovány při -80°C.

3.2.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena s využitím QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) za přesně dodrženího stanoveného postupu výrobce tohoto kitu. Vzorky byly nejprve rozmrazeny a centrifugovány (30s, 1 000 RPM). Ke každému vzorku bylo přidáno 180 µl 1x PBS, 20 µl proteasy, 4 µl RNAsy A, 200 µl AL lyzačního pufru. Mezi jednotlivými přídávky byly vzorky vždy krátce vortexovány (15s) a centrifugovány (30s, 1 000 RPM).

Vzorky byly inkubovány 10 minut při teplotě 56°C a následně byly krátce vortexovány (15s) a centrifugovány (30s, 1 000 RPM). Bylo přidáno 200 µl 96% ethanolu a vzorky byly krátce vortexovány (15s) a centrifugovány (30s, 10 000 RPM).

Lyzát byl přenesen na QIAamp Mini kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a centrifugován (90s, 1 000 RPM). QIAamp Mini kolonka byla přemístěna do čisté sběrné zkumavky. Pro promytí bylo na kolonku napipetováno 500 µl promývacího pufru AW1 a kolonka byla centrifugována (90s, 1 000 RPM). Následně byla kolonka přemístěna do čisté sběrné zkumavky. Pro další promytí bylo napipetováno na kolonku 500 µl promývacího pufru AW2 a kolonka byla centrifugována (90s, 1 400 RPM). Kolonka byla přemístěna do čisté sběrné zkumavky a pro úplné vysušení membrány byla centrifugována (3 min, 1 400 RPM). Poté byla kolonka přenesena do čisté mikrozkušavky a bylo přidáno 50 µl elučního AE pufru. Pro zvýšení výtěžku DNA byly

vzorky inkubovány při pokojové teplotě 1 min a následně centrifugovány (3 min, 1 400 RPM).

Koncentrace vyizolované DNA byla změřena pomocí Nanodropu. Vyizolovaná DNA byla skladována při $-20\pm 4^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Kvantitativní real-time PCR

Podle Tab. 4, 5, 6 byl pro jednotlivé vzorky připraven premix, jehož objem odpovídal množství použitých vzorků. Celkový objem tohoto premixu v každé jamce 96 jamkového panelu činil 16 μl . DNA byla naředěna na koncentraci 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Do jednotlivých jamek s premixem byly přidány 4 μl naředěné DNA. Pro pozitivní kontroly byla použita DNA buněčných linií (VCaP a LNCap, 1:1). Jako negativní kontrola byla použita voda, kdy bylo do směsi přidáno 5 μl PCR vody namísto naředěné DNA.

Panel byl přelepen folií a centrifugován (2 min, 1200 RPM). Pomocí LightCycleru® 480 s nastaveným programem dle Tab. 7 byla provedena real-time qPCR. Po ukončení procesu byla provedena analýza dat. Poté byly výsledky vyexportovány v textové i grafické formě.

Tab. 4: Komponenty real-time qPCR reakční směsi (ARenh 8, ARenh 14).

Komponenty PCR reakce	Objem složky pro 1 reakci [μl]
PCR voda	4,6
Master mix (2x konc.)	10,0
Primer Fw (10 μM)	0,6
Primer Rv (10 μM)	0,6
Próba UPL (10 μM)	0,2
DNA (5 $\text{ng}/\mu\text{l}$)	4,0
Celkový objem	20,0

Tab. 5: Komponenty real-time qPCR reakční směsi (AR, RNaseP).

Komponenty PCR reakce	Objem složky pro 1 reakci [μl]
PCR voda	5,0
Master mix (2x konc.)	10,0
Assay (20x konc.)	1,0
DNA (5 $\text{ng}/\mu\text{l}$)	4,0
Celkový objem	20,0

Tab. 6: Komponenty real-time qPCR reakční směsi (směs assay AR+RNaseP).

Komponenty PCR reakce	Objem složky pro 1 reakci [μl]
PCR voda	4,0
Master mix (2x konc.)	10,0
CNV assay (20x konc.)	1,0
Referenční assay (20x konc.)	1,0
DNA (5 ng/ μl)	4,0
Celkový objem	20,0

Tab. 7: Reakční podmínky pro real-time qPCR.

Program	Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
1	Preinkubace	95	10 min	1
	Denaturace	95	15 s	45
	Annealing	60	30 s	
	Extenze	60	30 s	
	Chlazení	40	30 s	1

3.2.4 Určení počtu kopií genů pomocí kvantitativní PCR v reálném čase

Pomocí softwaru Lightcycler 480 Software release 1.5.1.62SP3 byla shromážděna data v reálném čase. V kanále FAM byly Ct hodnoty vztaženy k AR assay a v kanále HEX byly Ct hodnoty vztaženy k RNaseP assay. Výpočet byl proveden podle doporučení výrobce komerčních testů (ThermoFisher Scientific). Tab. 8 zobrazuje příklad z firemní prezentace pro gen CYP2D6 na chromozomu 22. Z Ct hodnot byly vypočítány průměrné hodnoty ΔCt ($Ct_{CYP2D6} - Ct_{RNaseP}$), $\Delta\Delta Ct$, relative quantity (RQ, relativní množství) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a copy number (CN, počet kopií) $2 \times RQ$ (Tab. 8). Gen pro androgenový receptor je na chromozomu X, který je u mužů přítomen v jedné kopii. Proto v našem případě počet kopií určuje již hodnota RQ.

Tab. 8: Příklad výpočtu pro stanovení počtu kopií (copy number) (Převzato z Liew et al., 2005, dostupné z: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/cms_042195.pdf).

	průměr		RQ	CN
DNA ID	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$(2^{-\Delta\Delta Ct})$	$(2 \times RQ)$
NA17120	-1,22	0	1,00	2
NA17104	-1,84	-0,62	1,54	3
NA17107	-0,38	0,84	0,56	1

Tab. 8 zobrazuje příklad výpočtů, na základě kterých se určí počty kopií genů. ΔCt se vypočítá odečtením Ct RNaseP od Ct CYP2D6 (v našem případě AR) pro každý replikát. Průměrná hodnota ΔCt se vypočítá z 2 replikátů. Vzorek NA17120 byl použit jako kalibrátor (jeho $\Delta\Delta Ct$ po kalibraci je 0). Hodnota ΔCt ze všech ostatních vzorků DNA byla normalizováno na NA17102 k určení $\Delta\Delta Ct$. Relativní množství (RQ) je $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a počet kopií (CN) je $2 \times RQ$.

3.2.5 Kontrola produktů PCR reakce pomocí gelové elektroforézy

K ověření specifiky amplifikace byla použita elektroforetická separace PCR produktů. Nejdříve byla sestavena elektroforetická aparatura Mini PROTEAN® TetraCell. Byla použita 1,5 mm skla, která odpovídala tloušťce gelu. Na základě počtu zpracovaných vzorků byl použit příslušný hřebínek. Byla připravena směs 6% polyakrilamidového gelu smícháním: 22,96 ml deionizované vody, 7 ml 30% směsi Arylamid/Bisakrylamid, 3,5 ml 5x TBE pufru, 400 μ l 10% PERS a 22,5 μ l TEMED. S pomocí magnetické míchačky MR 1000 byla směs promíchána a napipetována do elektroforetické vany mezi dvě sestavená skla. Po napipetování směsi byl vložen mezi skla příslušný hřebínek. Směs tuhla po dobu 45 minut.

Po ztuhnutí gelu byly hřebínky vytaženy, skla byla vložena do elektroforetické komory a zalita 700 ml 0,5 x TBE pufru. Do první jamky byly aplikovány 3 μ l markeru molekulové hmotnosti HyperLadder o velikosti 25 bp pro kontrolu molekulové hmotnosti. Vzorky pro nanesení na gel byly připraveny smícháním 10 μ l PCR produktu a 1 μ l nanášejícího pufru. Takto připravené vzorky byly napipetovány do jednotlivých jamek. Bylo pipetováno vždy 10 μ l směsi do jamky. Elektroforetická separace PCR produktů probíhala při 100 V 60 minut. Po skončení elektroforézy byl na 45 minut gel vložen do barvicího roztoku GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000x a následně byl vložen do deionizované vody. Pomocí UV transiluminátoru G:Box byla provedena vizualizace separovaných PCR produktů.

3.2.6 Digitální PCR

Podle Tab. 9 pro jednotlivé vzorky byl připraven premix, jehož objem odpovídal množství použitých vzorků. Počty vzorků byly připraveny vždy v násobku 8. Celkový objem tohoto premixu v každé jamce 96 jamkového panelu činil 17 μ l. DNA byla naředěna na koncentraci 20 ng/ μ l. K 17 μ l připravené směsi bylo přidáno 2,5 μ l pufru specifický pro XbaI a 0,5 μ l endonukleázy XbaI, kterou bylo zajištěno naštěpení DNA. Do jednotlivých jamek s premixem bylo přidáno 5 μ l naředěné DNA. Pro pozitivní kontroly

byla použita DNA buněčných linií (VCaP a LNCap, 1:1). Jako negativní kontrola byla použita voda, kdy bylo do směsi přidáno 5 µl PCR vody na místo naředěné DNA.

Tab. 9: Komponenty digitální PCR reakční směsi (směs assay AR+RNaseP).

Komponenty PCR reakce	Objem složky pro 1 reakci [µl]
PCR voda	4,0
ddPCR supermix (2x konc.)	11,0
CNV assay (20x konc.)	1,0
Referenční assay (20x konc.)	1,0
DNA (5 ng/ µl)	5,0
Celkový objem	22,0

Panel byl převrstven folií a ta byla upevněna pomocí PX1™ PCR zatavovače desek. Takto připravený panel byl vortexován (5s, v každém rohu a na 2 pozicích uprostřed) na silném vortexu. Následně byl panel centrifugován (2 min, 1200 RPM). Poté byl panel vložen do automatického generátoru kapiček, který umožnil přidavkem specifického oleje tvorbu kapiček, ve kterých později probíhala samotná PCR reakce. Byla provedena výměna folie s využitím PX1™ PCR zatavovače desek. Pomocí cycleru T100™ thermal cycler s nastaveným programem dle Tab. 10 byla provedena ddPCR. Z cycleru byla destička přemístěna do čtečky kapiček QX200. Po ukončení procesu byla provedena analýza dat.

Tab. 10: Reakční podmínky pro ddPCR.

Program	Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
1	Preinkubace	95	10 min	1
	Denaturace	95	15 s	45
	Annealing	60	30 s	
	Extenze	60	30 s	
	Chlazení	40	30 s	1

3.2.7 Pacientské vzorky

Vstupním materiálem pro izolaci DNA byla plná krev od pacientů (N=10) s karcinomem prostaty. Pacienti podstoupili léčbu na Onkologické klinice ve Fakultní nemocnici v Olomouci, kteří podepsali informovaný souhlas pro anonymní analýzu nádorových markerů.

3.2.7.1 Zpracování krevní plazmy

Odebrané krevní vzorky pacientů byly stočeny (20 min, 908 RPM) při pokojové teplotě. Byla získána plazma s vysokým obsahem krevních destiček. Následně byly vytvořeny alikvoty (1000 µl) do 2 ml mikrozkušavek. Jednotlivé mikrozkušavky se vzorky byly řádně popsány a uchovány při teplotě -80 °C.

3.2.7.2 Izolace ccfDNA/RNA z krevní plazmy

Pro izolaci ccfDNA/RNA z krevní plazmy pacientů byl použit QIAamp ccfDNA/RNA kit (Qiagen). Ke 2 ml vzorku krevní plazmy pacientů byl přidán RNA spike I (1µl/1ml) a RPL pufr (300 µl/1ml). Vzorky byly vortexovány (5s) a inkubovány 3 minuty při pokojové teplotě. Poté byl přidán RPP pufr (100 µl/1ml). Vzorky byly vortexovány (>20s), inkubovány 3 minuty na ledu a centrifugovány 3 minuty (11 300 RPM). Ke vzorkům byl přidán 1 objem vychlazeného isopropanolu a směs byla vortexována (5s).

Vzorky byly přeneseny na RNeasy Midi spin column a centrifugovány 1 minutu (7300 RPM). Na kolonku byly napipetovány 4 ml RWT pufru. Kolonky byly centrifugovány 1 minutu (7 300 RPM). Přidáním 2,5 ml RPE pufru na kolonku bylo zakončeno promývání a opětovně následovala centrifugace 5 minut (7 300 RPM). Kolonka byla přenesena do nové 15 ml zkumavky a na střed kolonky bylo napipetováno 200 µl RNase-free vody. Následovala inkubace vzorků 1 minutu při pokojové teplotě a eluce vzorků 1 minutu (7 300 RPM).

Po samotném přečištění vzorků (cleanup) bylo přidáno 200 µl RPL pufru ke 200 µl eluátu a 800 µl 100% ethanolu. Vzorky byly vortexovány (5s) a následně přeneseny na RNeasy MinElute spin column . Byla provedena centrifugace 30s (9 200 RPM). Na kolonku bylo přidáno 500 µl RPE pufru a kolonka byla centrifugována 30s (9 200 RPM). Poté bylo na kolonku přidáno 500 µl 80% ethanolu a kolonka byla centrifugována 30s (9 200 RPM). Následně byla kolonka přenesena do nové 2 ml mikrozkušavky a opět centrifugována 5 minut (14 000 RPM). Kolonka byla vložena do LoBind 1,5 ml mikrozkušavky a na střed kolonky bylo nanášeno 20 µl RNase-free vody. Následovala inkubace vzorků 1 minutu při pokojové teplotě a centrifugace (1 min, 14 000 RPM). K eluátu s obsahem ccfDNA/RNA byly přidány 2 µl RNA spike II. Vzorky byly skladovány při -80 °C.

3.2.7.3 Analýza počtu kopií v genomové DNA patientských vzorků pomocí ddPCR

U DNA získané izolací z ccfDNA/RNA, která byla získána z krevní plazmy pacientů s pokročilým karcinomem prostaty, byla provedena ddPCR. Digitální PCR byla

provedena stejným postupem, jako u buněčných linií podle kapitoly 3.2.6. Poté byly výsledky vyexportovány v textové i grafické formě. U jednotlivých pacientů byly stanoveny hodnoty počtu kopií (CN - copy number) genů a zároveň byla hodnocena i amplifikace androgenového receptoru v genomové DNA jednotlivých pacientů.

3.3 Výsledky

3.3.1 Kultivace a příprava buněčných linií

Pro první část experimentů diplomové práce byla důležitá kultivace buněčných linií (VCaP, LNCaP) a příprava jejich směsí s různým zastoupením buněk jednotlivých linií. U buněčné linie VCaP je přítomná amplifikace androgenového receptoru, naopak buněčná linie LNCaP reprezentuje normální stav (Sumiyoshi et al., 2019).

Linie byly kultivovány za přesně stanovených podmínek ve specifických médiích a podle potřeby pasážovány. Pro účely ověření citlivosti PCR vyšetření (viz níže) byly připraveny směsi VCaP buněk na pozadí LNCaP linie. Tyto směsi byly připraveny jednak z buněk (10% a 1%) a jednak z izolované DNA (50%, 10%, 1% a 0,1%). Například vzorek "VCaP 10% linie" obsahoval 10 000 buněk linie VCaP a 90 000 buněk LNCaP a vzorek "VCaP 50% DNA" byl připraven smícháním DNA obou linií v poměru 1:1.

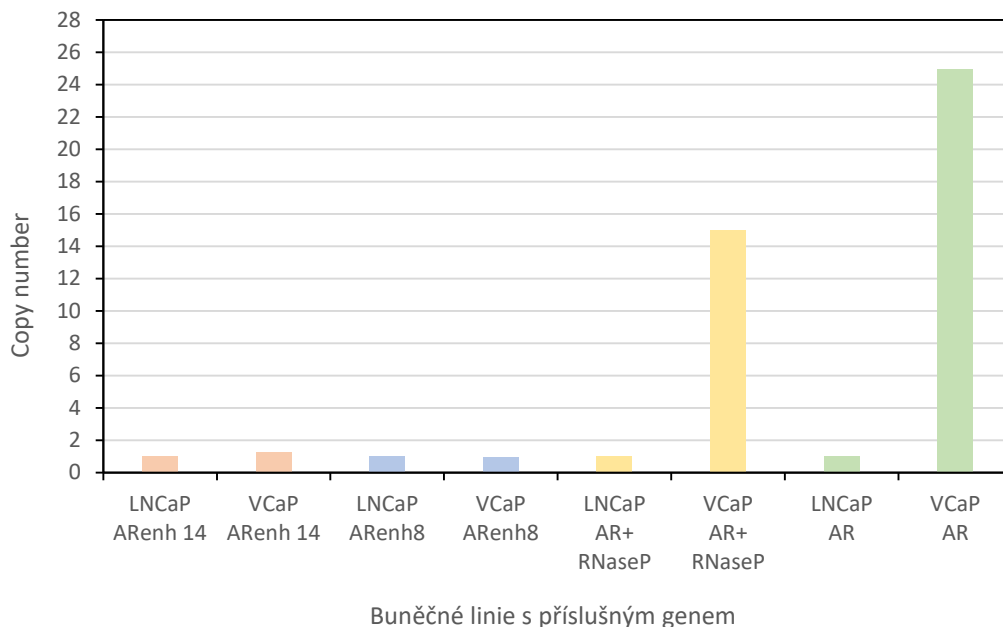
3.3.2 Návrh primerů pro zesilovač transkripce androgenového receptoru

Pro optimalizaci léčby pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty může mít význam nejen stanovení amplifikace androgenového receptoru, ale i jeho zesilovače transkripce. To bylo sice recentně popsáno pomocí sekvenování (Takeda et al., 2018), ale nebylo zatím vyšetřováno pomocí PCR. Autoři přesně popsali oblast zesilovače transkripce na chromozomu X (9 024 bp v pozici 66 118 920 - 66 127 943) a mohli jsme si tuto sekvenci stáhnout z veřejné databáze NCBI (National Center for Biotechnological Information; AL139276.17 Human DNA sequence from clone RP11-30M20 on chromosome Xq11.2-13.1). Pro experimenty této diplomové práce jsme navrhli dvě sady primerů s příslušnými UPL próbami (č. 8 a 14; označení výsledků níže ARenh8 a ARenh14) pomocí online nástroje (Universal Probe Library System Assay Design, Roche).

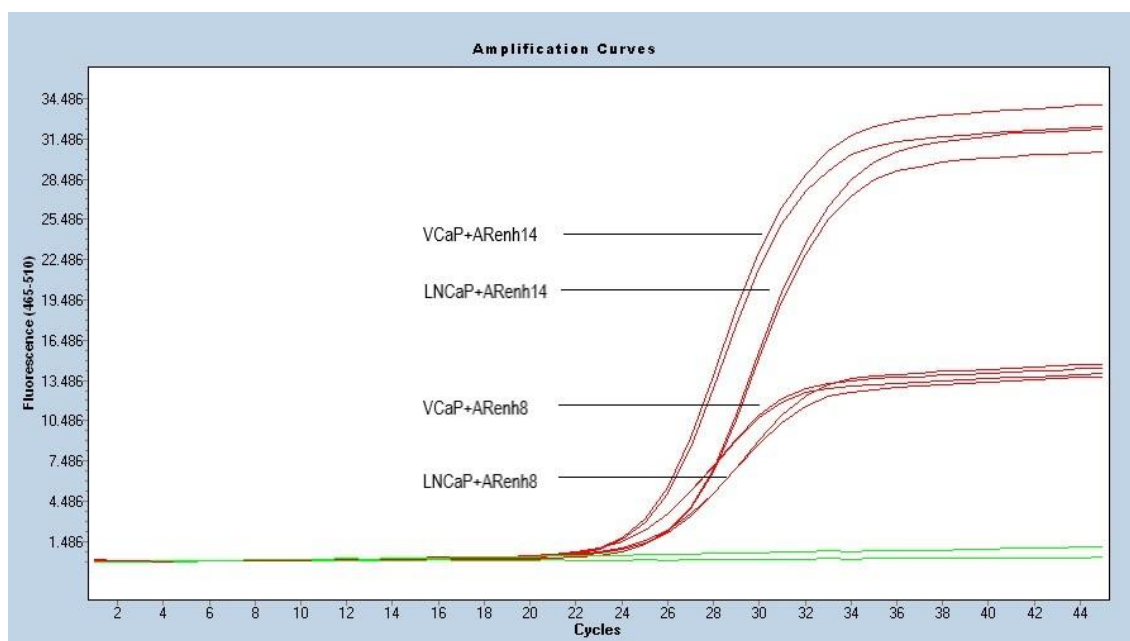
3.3.3 Ověření počtu kopií androgenového receptoru u linií a výběr testu pro zesilovač transkripce

Komerční testy pro stanovení AR a referenčního genu RNaseP byly použity podle recentní japonské práce (Sumiyoshi et al., 2019). Analýza byla provedena na připravených buněčných liniích, kdy hodnoty z linie LNCaP byly použity jako tzv. kalibrátor (viz Metody). Byla potvrzena výrazná amplifikace androgenového receptoru u linie VCaP, a to jak při společné PCR reakci pro AR a RNaseP (cca 15 kopií genu), tak při oddělených reakcích v samostatných zkumavkách (cca 25 kopií genu) (Obr. 7,

vpravo). Amplifikace oblasti zesilovače transkripce nebyla pozorována a výsledky obou testů byly srovnatelné (Obr. 7, vpravo). PCR křivky pro ARenh14 vykazovaly lepší parametry oproti ARenh8 (Obr. 8), a proto byl pro další experimenty používán právě ARenh14.

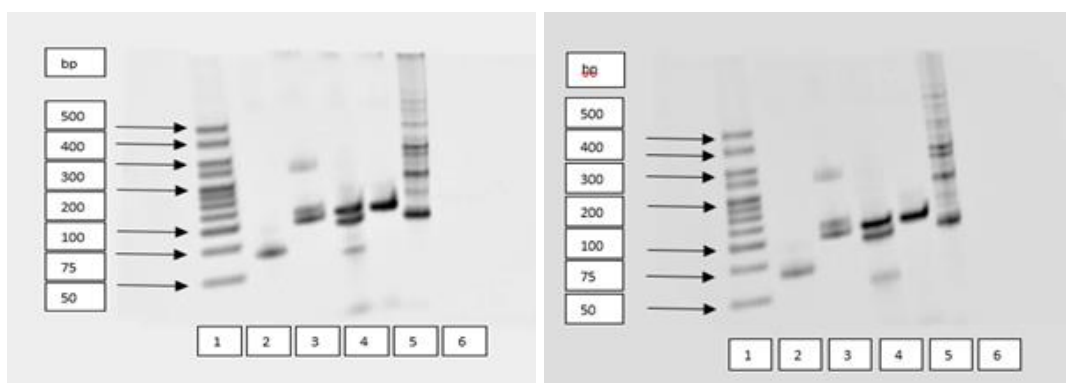


Obr. 7: Graf znázorňující počty kopií (copy number) v genomové DNA buněčných linií LNCaP a VCaP. PCR probíhala v samostatných zkumavkách (ARenh14, ARenh8, AR a RNaseP) nebo ve společné reakci (AR+RNaseP).



Obr. 8: Křivky kvantitativní PCR pro zesilovač transkripce (ARenh14 a ARenh8) u gDNA buněčných linií VCaP a LNCaP.

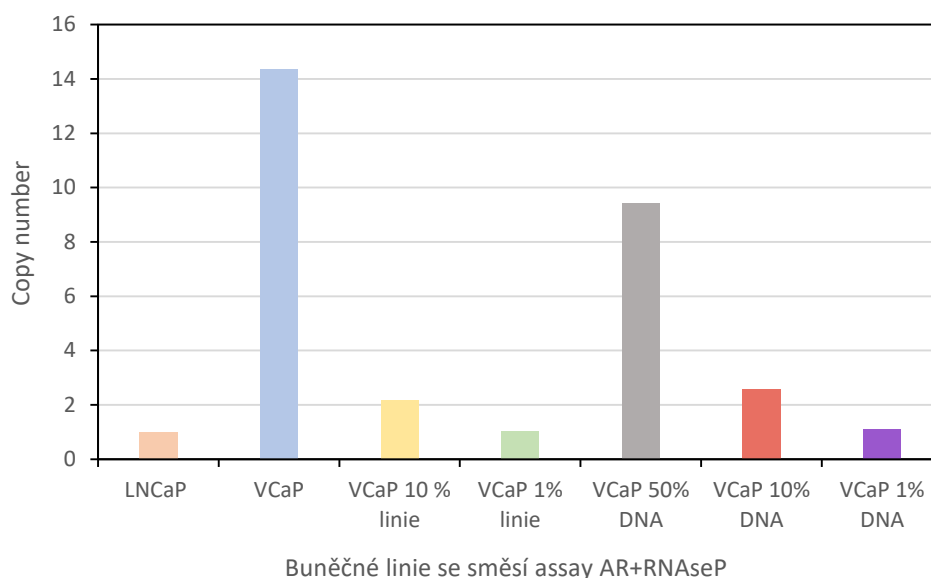
Velikosti jednotlivých produktů PCR reakce byly ověřeny také pomocí gelové elektroforézy. Z důvodu lepších rozlišovacích schopností byl použit polyakrylamidový gel. Dominantní signály odpovídaly očekávaným velikostem u jednotlivých testů a pro AR a ARenh14 nebyly pozorovány žádné nespecifity (Obr. 9). V dalších pracích jsme pro zesilovač transkripce pokračovali s testem ARenh14.



Obr. 9: Kontrola produktů PCR reakce pomocí gelové elektroforézy (vlevo LNCaP a vpravo VCaP). Vzorky byly nanесeny v následujícím pořadí a v závorce jsou uvedeny velikosti PCR produktů: 1 – marker, 2 – ARenh14 (64 bp), 3 – ARenh8 (94 bp), 4 – směs assay AR a RNaseP, 5 – AR (101 bp), 6 – RNaseP (87 bp).

3.3.4 Ověření citlivosti PCR vyšetření počtu kopií androgenového receptoru

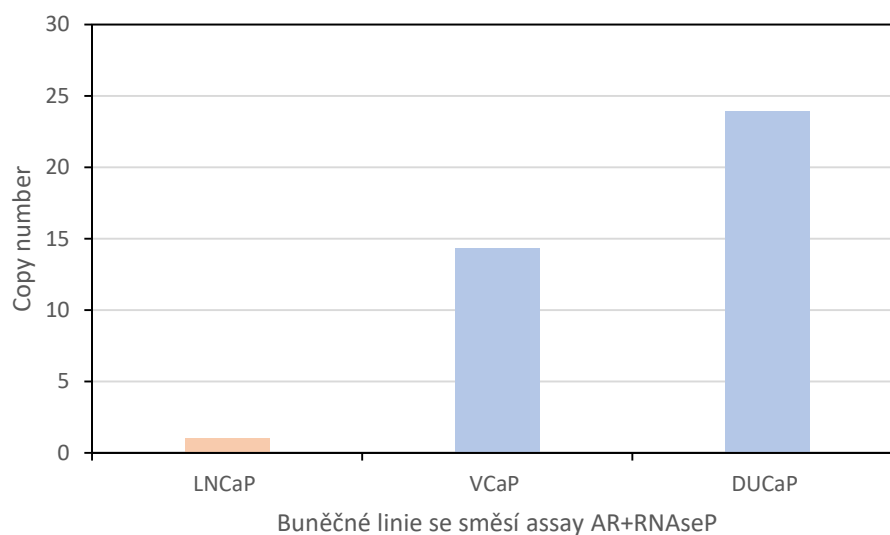
Analýza AR a RNAsyP pomocí qPCR byla zprvu testována s využitím buněčných linií VCaP a LNCaP. Obr. 10 znázorňuje počty kopií AR a RNAsyP u VCaP a LNCaP řaděných i neřaděných vzorků. Nejvíce kopií androgenového receptoru bylo přítomno v čisté VCaP linii. Amplifikace androgenového receptoru byla detekována v gDNA čisté neřaděné linie VCaP, zatímco v LNCaP nikoliv. Byla ověřena pravdivost našeho předpokladu. Rovněž byla amplifikace androgenového receptoru detekována ve vzorku VCaP 50% DNA a VCaP 10% DNA, zde byla amplifikace podstatně nižší. Se snižující se koncentrací vzorku klesala amplifikace androgenového receptoru.



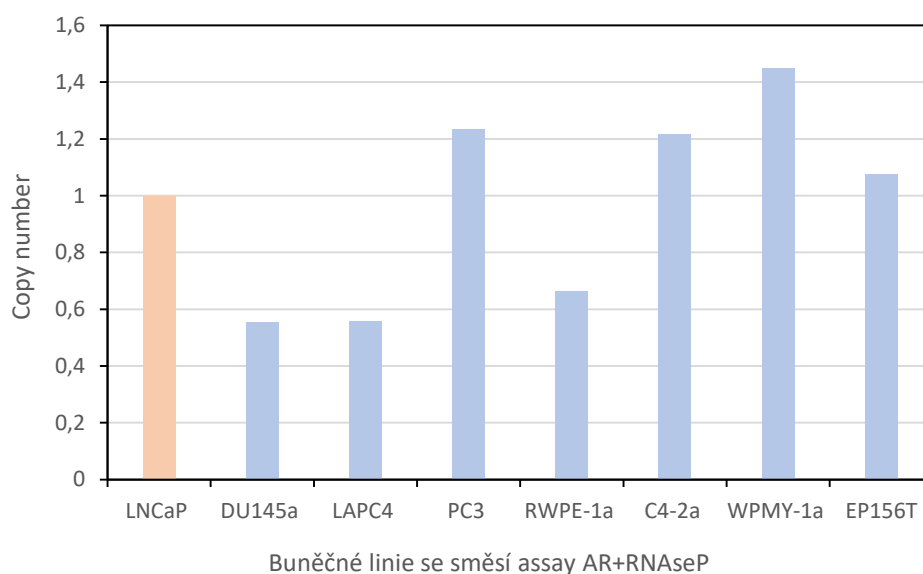
Obr. 10: Graf znázorňující počty kopií (copy number) v genomové DNA buněčných linií VCaP a LNCaP. (LNCaP - DNA linie LNCaP, VCaP - DNA linie VCaP, VCaP 10% linie - DNA s obsahem 10 000 buněk VCaP + 90 000 buněk LNCaP, VCaP 1% linie - DNA s obsahem 1 000 buněk VCaP + 100 000 buněk LNCaP, VCaP 50% DNA – DNA VCaP naředěná s DNA LNCaP v poměru 50% VCap + 50% LNCaP, VCaP 10% DNA – DNA VCaP naředěná s DNA LNCaP v poměru 10% VCap + 90% LNCaP, VCaP 1% DNA – DNA VCaP naředěná s DNA LNCaP v poměru 1% VCap + 99% LNCaP). PCR probíhala ve společné reakci AR+RNaseP.

3.3.5 Analýza počtu kopií v genomové DNA buněčných linií pomocí qPCR

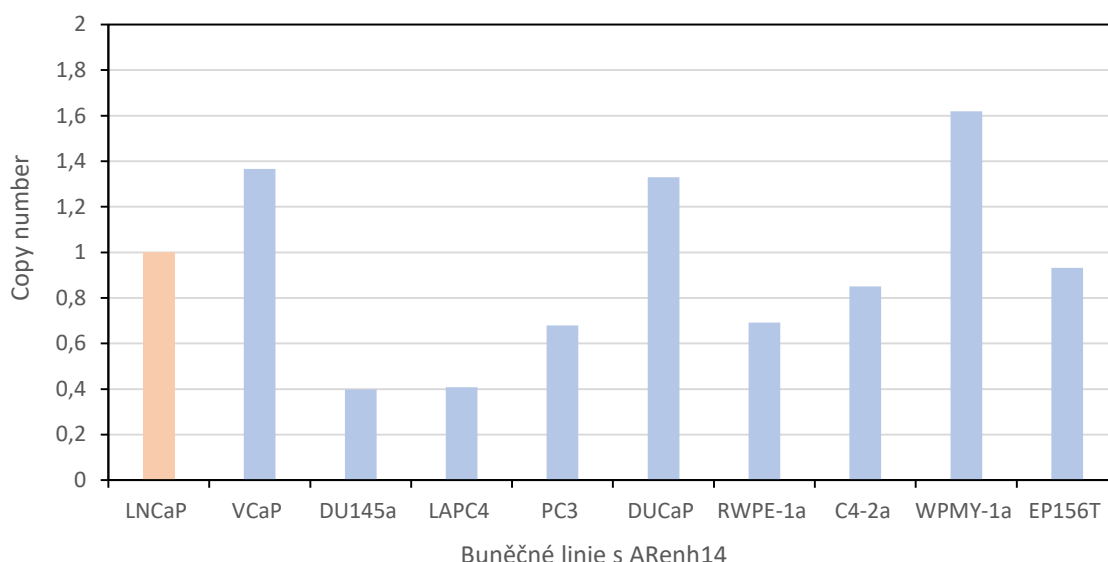
Následně byla provedena analýza AR a zesilovače transkripce pomocí qPCR u dalších buněčných linií a to u DU145a, LAPC4, PC3, DUCaP, RWPE-1a, C4-2a, WPMY-1a a EP156T (Obr. 11, 12). Přítomnost amplifikace androgenového receptoru byla zjištěna pouze u linií VCaP a DUCaP. U linie VCaP s AR+RNaseP bylo detekováno cca 14 kopií a u linie DUCaP 24 kopií genu (Obr. 11). U linií DU145, LAPC4 a RWPE-1 byl pozorován nižší signál androgenového receptoru (Obr. 12). Analýza ARenh14 u testovaných buněčných linií (Obr. 13) nezaznamenala přítomnost amplifikace zesilovače transkripce. U linií DU145, LAPC4, PC3 a RWPE-1 byl pozorován nižší signál zesilovače transkripce.



Obr. 11: Graf znázorňující počty kopií (copy number) v genomové DNA buněčných linií VCaP a DUCaP s přítomnou amplifikací androgenového receptoru (LNCaP - kalibrátor). PCR probíhala ve společné reakci AR+RNaseP.



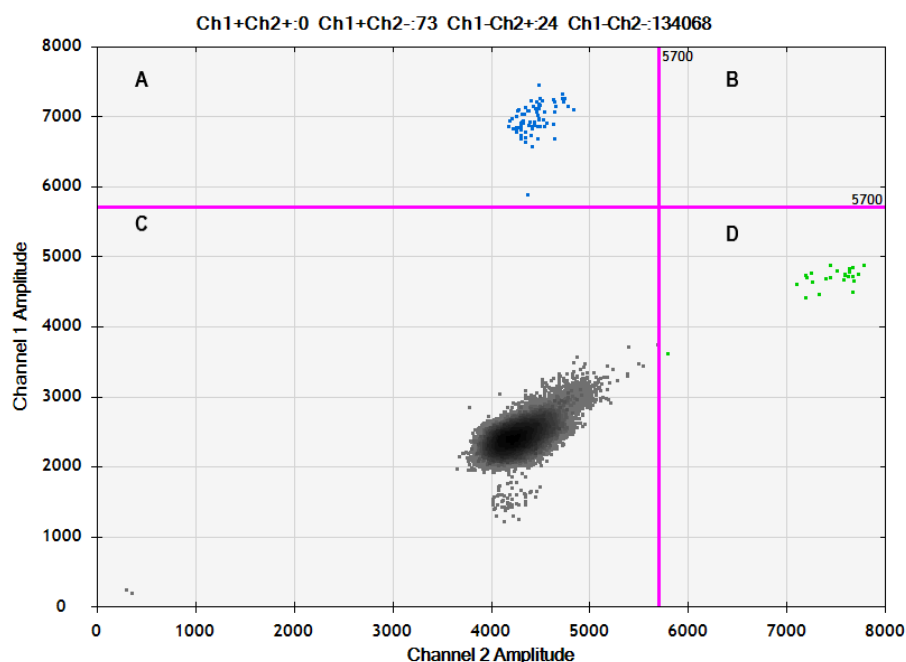
Obr. 12: Graf znázorňující počty kopií (copy number) v genomové DNA buněčných linií DU145a, LAPC4, PC3, RWPE-1a, C4-2a, WPMY-1a, EP156T bez přítomné amplifikace androgenového receptoru (LNCaP - kalibrátor). PCR probíhala ve společné reakci AR+RNaseP.



Obr. 13: Graf znázorňující počty kopií (copy number) zesilovače transkripce v genomové DNA buněčných linií LNCaP, VCaP, DU145a, LAPC4, PC3, DUCaP, RWPE-1a, C4-2a, WPMY-1a, EP156T (LNCaP - kalibrátor). PCR probíhala s ARenh14.

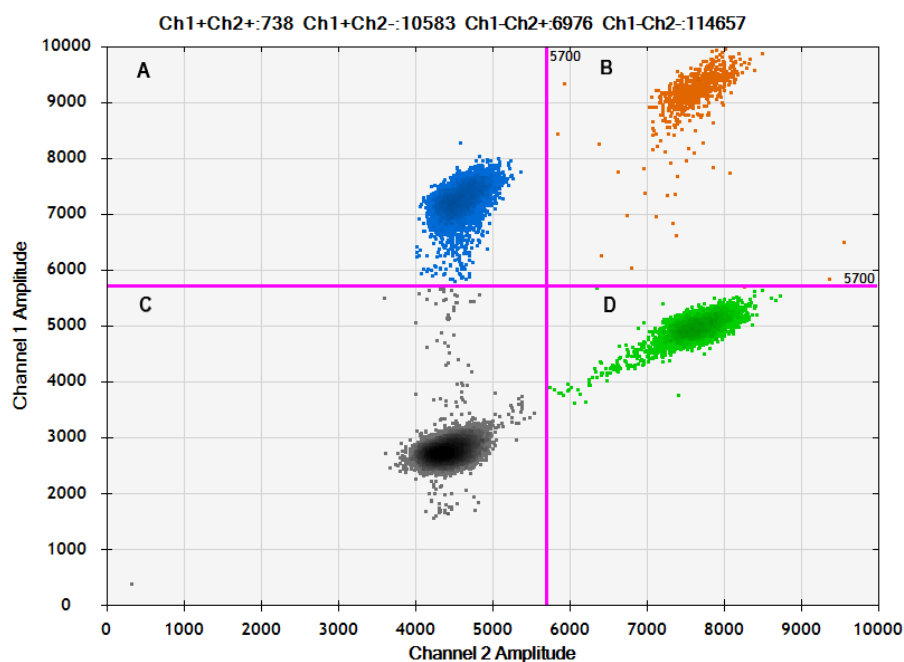
3.3.6 Analýza počtu kopií androgenového receptoru v buněčných liniích pomocí ddPCR

V následujícím experimentu byl hodnocen androgenový receptor ve vzorcích s různým obsahem DNA buněčné linie VCaP ve směsi s LNCaP (VCaP 50% DNA, VCaP 10% DNA, VCaP 1% DNA a VCaP 0,1% DNA). Před samotnou ddPCR byly vzorky naštěpeny endonukleázou XbaI, která nezasahuje do amplifikované sekvence, ale odděluje kopie androgenového receptoru z jednoho vlákna DNA. Jednotlivé kopie pak mohou být detekovány v separovaných kapkách při ddPCR. Experiment byl proveden se dvěma sadami vzorků s obsahem DNA 2 nebo 20 ng. V případě nižšího množství DNA byly počty pozitivních kapek nedostatečné (Obr. 14). Bylo zde detekováno pouze 73 pozitivních kapek pro AR (shluk kapek modré barvy) a 24 kapek pro RNaseP (shluk kapek zelené barvy) ze všech testovaných vzorků. Při použití 20 ng DNA byly výsledky téměř optimální (Obr. 16).



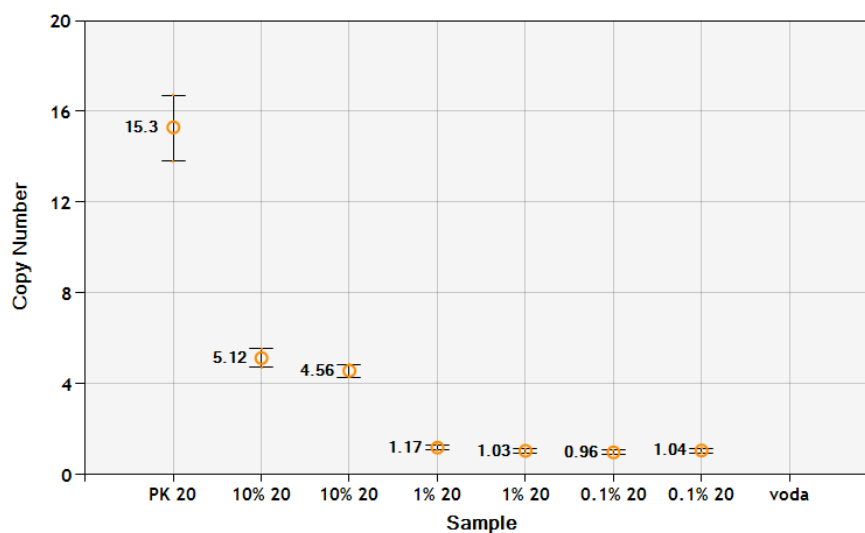
Obr. 14: 2D graf ddPCR znázorňující množství kapek s pozitivním a negativním signálem pro geny AR a RNaseP u vzorků DNA buněčných linií s koncentrací 2 ng/μ (kvadrant A - Ch1+Ch2-: 73 kapek, kvadrant B - Ch1+Ch2+: 0 kapek, kvadrant C - Ch1-Ch2-: 134 068 kapek, kvadrant D - Ch1-Ch2+: 24 kapek).

2D graf (Obr. 15) ddPCR zobrazuje 4 kvadranty, které jsou barevně odlišeny a dva kanály (channel 1 - FAM, channel 2 - HEX). V prvním kvadrantu A (modrá barva) je graficky znázorněno množství kapek s pozitivním signálem pro AR. Ve druhém kvadrantu B (oranžová barva) byly zachyceny obě sondy jak pro AR tak pro RNaseP. V dalším kvadrantu C jsou negativní kapky. V posledním kvadrantu D (zelená barva) je graficky znázorněno množství kapek s pozitivním signálem pro RNaseP. 2D graf ddPCR by se měl v ideálních podmínkách zobrazovat tak, aby jednotlivé shluky tvořily čtverec. Optimalizace může být provedena změnou reakční teploty či změnou množství použité DNA.



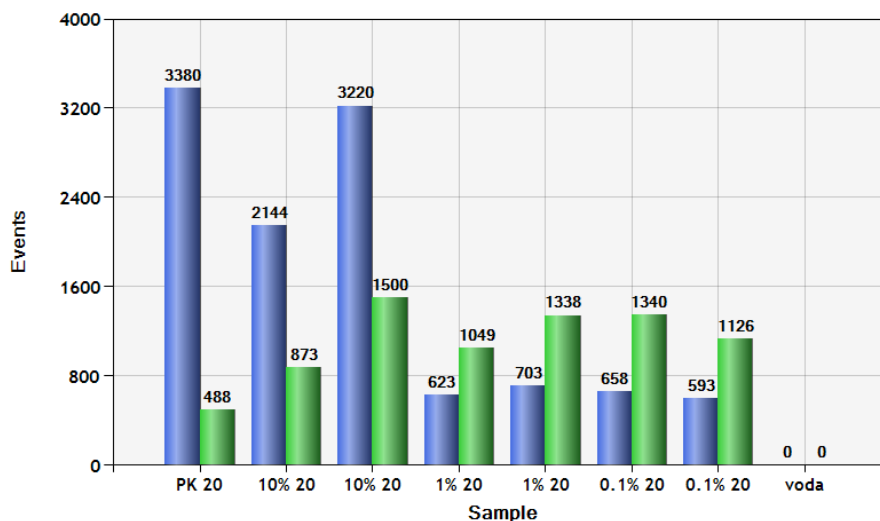
Obr. 15: 2D graf ddPCR znázorňující množství kapek s pozitivním a negativním signálem pro geny AR a RNaseP u vzorků DNA buněčných linií s koncentrací 20 ng/μ (kvadrant A - Ch1+Ch2-: 10 583 kapek, kvadrant B - Ch1+Ch2+: 738 kapek, kvadrant C - Ch1-Ch2-: 114 657 kapek, kvadrant D - Ch1-Ch2+: 6 976 kapek).

Počty kopií androgenového receptoru jednotlivých vzorků, které byly měřeny v duplikátu, zobrazuje obr. 16. Absolutní počty pozitivních kapek pro oba geny v jednotlivých reakcích jsou poskytnuty v obr. 17.



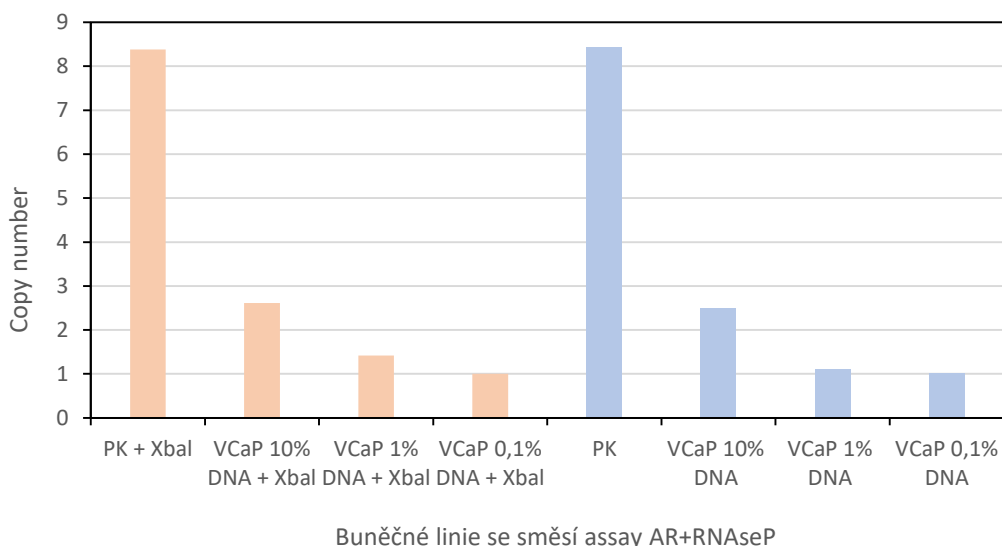
Obr. 16. Hodnoty počtu kopií jednotlivých vzorků DNA buněčných linií naměřené pomocí ddPCR (copy number - počet kopií, sample - jednotlivé vzorky: PK - pozitivní kontrola, 10% - VCAP 10% DNA, 1% - VCaP 1% DNA, 0,1% - VCaP 0,1% DNA, voda; vzorky s obsahem 20ng DNA).

Vzorek VCaP 50%, který obsahoval 50% DNA VCaP buněk a 50% DNA LNCaP buněk, byl použit jako PK. U něj byla potvrzena přítomnost amplifikace a byla pozorována největší hodnota CN. U dalších vzorků hodnoty CN postupně klesaly se snižujícím se ředěním. Vzorek VCaP 10% DNA měl průměrný počet kopii 4,84. Pro vzorek VCaP 1% DNA vyšla průměrná hodnota 1,1 a pro vzorek VCaP 0,1% DNA 1.



Obr. 17: Sloupcový graf znázorňující množství pozitivních signálů pro AR a referenční gen RNaseP u buněčných linií VCap a LNCaP (events - počet pozitivních kapek, sample - jednotlivé vzorky). Modře zbarvené sloupce označují množství pozitivních kapek pro AR a zeleně zbarvené sloupce označují množství pozitivních kapek pro RNaseP.

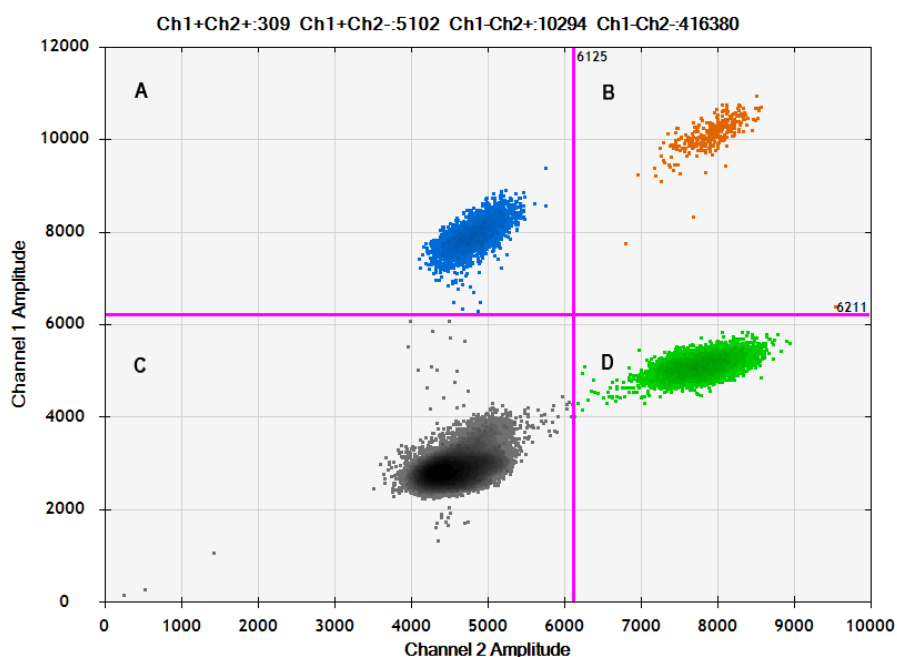
Stejně vzorky (naštěpené endonukleázou XbaI) byly analyzovány i pomocí qPCR. Paralelně byly zhodnoceny i vzorky bez štěpení a výsledky byly srovnatelné (Obr. 18).



Obr. 18: Graf znázorňující počty kopií (copy number) v genomové DNA ředěné buněčné linie VCaP štěpené endonukleázou XbaI a v genomové DNA ředěné buněčné linie VCaP neštěpené endonukleázou XbaI (VCaP 10% DNA – DNA VCaP naředěná s DNA LNCaP v poměru 10% VCap + 90% LNCaP, VCaP 1% DNA – DNA VCaP naředěná s DNA LNCaP v poměru 1% VCap + 99% LNCaP, VCaP 0,1% DNA – DNA VCaP naředěná s DNA LNCaP v poměru 0,1% VCap + 99,9% LNCaP). PCR probíhala ve společné reakci AR+RNaseP.

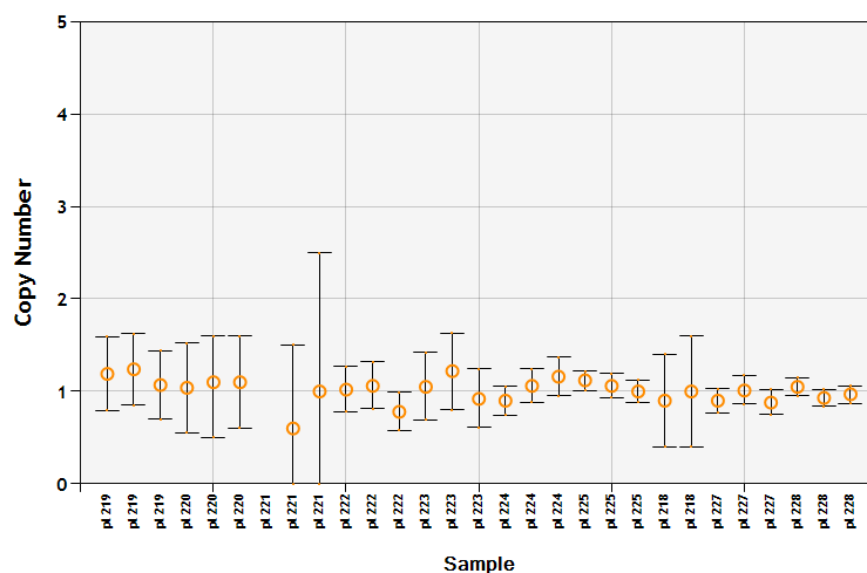
3.3.7 Analýza počtu kopií androgenového receptoru v cirkulující DNA pacientů s pokročilým karcinomem prostaty

V posledním experimentu byly hodnoceny počty kopií u 10 pacientů. Jednotlivé vzorky byly označeny zkratkou pl jako plazma (pl 218, pl 219, pl 220, pl 221, pl 222, pl 223, pl 224, pl 225, pl 227, pl 228). Na základě předchozího experimentu, kdy byla vybrána vhodnější koncentrace pro analýzu, byly patientské vzorky pro ddPCR připraveny v jednotném množství DNA 20 ng na reakci. 2D graf (Obr. 19) ddPCR zobrazuje uspokojivé rozdělení kapek do jednotlivých kvadrantů.

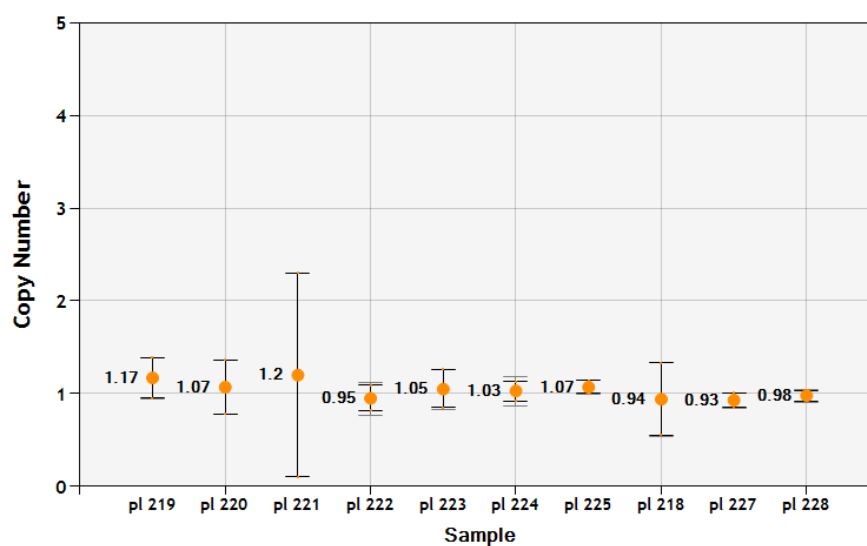


Obr. 19: 2D graf ddPCR znázorňující množství kapek s pozitivním a negativním signálem pro geny AR a RNaseP u vzorků DNA pacientů s koncentrací 20 ng/μ (kvadrant A - Ch1+Ch2-: 73 kapek, kvadrant B - Ch1+Ch2+: 0 kapek, kvadrant C - Ch1-Ch2-: 134 068 kapek, kvadrant D - Ch1-Ch2+: 24 kapek).

Počty kopií androgenového receptoru u jednotlivých vzorků, které byly naneseny v triplikátu, zobrazuje obr. 20. Průměrné hodnoty jsou následně znázorněny na obr. 21.

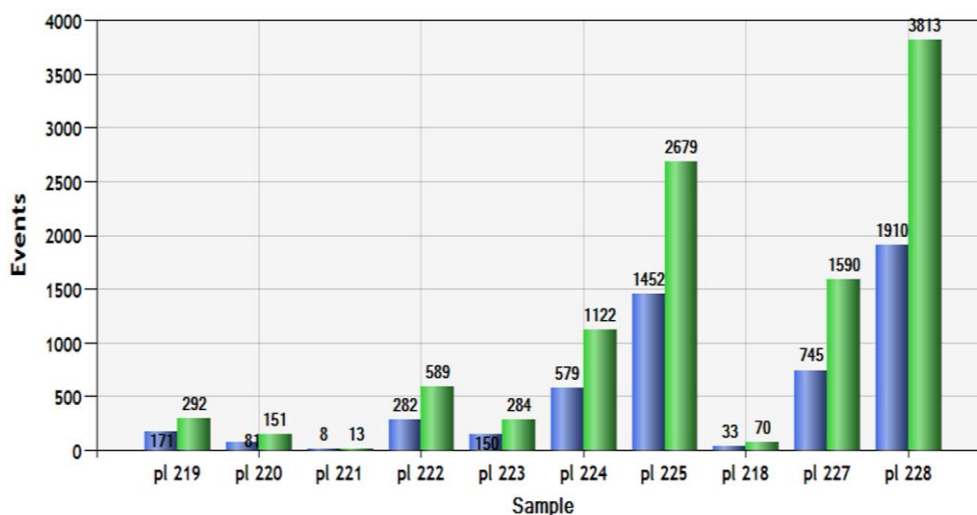


Obr. 20. Hodnoty počtu kopií jednotlivých vzorků DNA pacientů naměřené pomocí ddPCR (copy number - počet kopií, sample - jednotlivé vzorky pacientů).



Obr. 21. Průměrné hodnoty počtu kopií jednotlivých vzorků DNA pacientů naměřené pomocí ddPCR (copy number - počet kopií, sample - jednotlivé vzorky pacientů).

U žádného pacienta nebyla nalezena amplifikace androgenového receptoru. Poslední graf (Obr. 22) znázorňuje absolutní množství pozitivních signálů AR a referenčního genu RNaseP u jednotlivých pacientů.



Obr. 22: Sloupkový graf znázorňující množství pozitivních signálů pro AR a referenční gen RNaseP u patientských vzorků (events - počet pozitivních kapek, sample - jednotlivé vzorky pacientů). Modře zbarvené sloupce označují množství pozitivních kapek pro AR a zeleně zbarvené sloupce označují množství pozitivních kapek pro RNaseP.

Vzorky pl 225 a pl 228 měly velké množství pozitivních kapek díky své vysoké koncentraci. Ve vzorku pl 225 bylo detekováno pro RNaseP 2 679 pozitivních kapek a ve vzorku pl 228 pro RNaseP bylo 3 813 pozitivních kapek. U ostatních pacientů byly pozitivní signály pro RNaseP podstatně nižší. Rovněž u pacientů pl 225 a pl 228 bylo detekováno více pozitivního signálu pro AR oproti ostatním pacientům.

3.4 Diskuse

Diplomová práce byla zaměřena na optimalizaci metody pro detekci počtu kopií androgenového receptoru a zesilovače transkripce androgenového receptoru. Delece, inserce, duplikace a komplexní varianty na více místech, jsou všechny označovány jako variace počtu kopií (CNV) nebo polymorfismy počtu kopií (CNP) a jsou přítomny u všech lidí (Fredman et al., 2004; Feuk et al., 2006). Lidský genom i u zdravých osob obsahuje velké množství variabilních oblastí počtu kopií. Asi 10% lidského genomu je ovlivněno počtem kopií genů (Zarrei et al., 2015). CNV významně přispívají ke genetické diverzitě a také ovlivňují fenotypové vlastnosti daného jedince (Beckmann et al., 2007).

Nádory jsou obecně označovány jako geneticky podmíněné onemocnění, které se rozvíjí vlivem kumulativního poškození DNA, zejména v důsledku získaných somatických mutací. Na rozdíl od vrozených mutací se mutace somatické vyskytují v jednotlivých tělních buňkách a ne v buňkách zárodečné linie (Slabý et al., 2015). Dochází tak k aktivaci protoonkogenů, inaktivaci nádorových supresorů i ovlivnění dalších genů a procesů, které souvisí s komplexními změnami u nádorů (Hanahan, Weinberg, 2011). U primárních karcinomů prostaty jsou inaktivovány zejména nádorové supresory p53 a PTEN a většina buněk je závislá na androgenové signalizaci (Armenia et al. 2018). Proto v první fázi dobře odpovídají na hormonální léčbu (chirurgická nebo chemická kastrace). Nicméně po léčbě hormon-senzitivního onemocnění adenokarcinomu prostaty se pacienti po 2-3 letech dostávají do fáze kastračně-rezistentního karcinomu prostaty. Dochází k opětovnému zvýšení hladiny PSA v krvi, což je doprovázeno radiografickou nebo klinickou progresí. Tato progresie může být řízena amplifikací AR, která se vyskytuje až u 50% CRPC (Armenia et al. 2018). Vyšší hladiny AR mohou zajistit dostatečnou stimulaci nádorových buněk i v přítomnosti nízkých hladin androgenů. Ty mohou být produkovány nadledvinkami nebo i samotnými nádory (Neuvirt et al. 2020). Progrese CRPC mohou rovněž řídit i AR mutace, které jsou však méně časté. Tyto mutace mohou změnit vazebnou afinitu ligandu v důsledku čehož může docházet k aktivaci androgenového receptoru i v přítomnosti antiandrogenů (Sumiyoshi et al., 2019). Zkoumání mechanismů rezistence na terapii cílené na AR byla započata identifikací bodové mutace v LBD v LNCaP linii (Veldscholte et al., 1990). Toto zjištění bylo později validováno u pacientů s CRPC (Suzuki et al., 1993).

Analýza počtu kopií byla provedena dvěma základními metodami, a to kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase a digitální PCR. Pro hodnocení přesného

počtu kopií genomové oblasti se nyní jako zlatý standard používá ddPCR. Při ddPCR se současně uskutečňují tisíce izolovaných reakcí uvnitř malých kapiček. Vzhledem k vysokému počtu provedených reakcí je experiment ddPCR vysoce přesný. Hlavní nevýhodou ddPCR je to, že počet měřených oblastí na experiment je omezený vzhledem k dostupnosti pouze dvou fluorescenčních detekčních kanálů (Eisfeldt et al., 2018).

Pro samotnou práci byla stěžejní kultivace vybraných buněčných linií VCaP a LNCaP, které jsou odvozené od pokročilého karcinomu prostaty. Již dříve provedené studie odhalily u buněčné linie VCaP amplifikaci androgenového receptoru a u buněčné linie LNCaP potvrdily normální stav (Sumiyoshi et al., 2019). V naší práci jsme amplifikaci androgenového receptoru u VCaP potvrdili a LNCaP byla použita při výpočtu počtu kopií jako tzv. kalibrátor. Výrazná amplifikace androgenového receptoru u linie VCaP byla pozorována jak při společné PCR reakci pro AR a RNaseP, kde bylo detekováno cca 15 kopií genu, tak při oddělených reakcích v samostatných zkumavkách, kde bylo detekováno cca 25 kopií genu. Další testování bylo prováděno ve společné reakční směsi pro oba geny, protože stejný postup byl plánován i pro digitální PCR. Počty kopií androgenového receptoru byly stanoveny nejen u čistých buněčných linií VCaP a LNCaP, ale také u jejich naředěných směsí. Amplifikace androgenového receptoru byla detekována v gDNA čisté neředěné linie VCaP a rovněž ve vzorcích VCaP 50% DNA a VCaP 10% DNA. Se snižující se koncentrací vzorku klesal i počet kopií androgenového receptoru, kdy 1% DNA linie VCaP již nebylo možné odlišit od referenční DNA linie LNCaP.

Recentní práce zjistila u CRPC přítomnost nového zesilovače transkripce AR, který také přispívá k rezistenci na hormonální léčbu (Takeda et al. 2018). Stanovení androgenového receptoru i tohoto zesilovače může mít klinický význam a předpovídat selhání tzv. ARTA terapie (enzalutamid a abirateron) (Dang et al. 2020). Autoři vyvinuli metodu pro cílené sekvenování, které je však finančně nákladné. Proto jsme se rozhodli navrhnout PCR test pro jednodušší a dostupnější analýzu tohoto lokusu.

Podle informací původní práce Takeda et al. (2018) jsme získali relevantní sekvenci a navrhli dvě sady primerů s příslušnými UPL próbami (č. 8 a 14; ARenh8 a ARenh14). Podle získaných dat byl vybrán jako vhodnější ARenh14, neboť jeho PCR křivky vykazovaly lepší parametry oproti ARenh8 a při ověření na polyakrylamidové elektroforóze nebyly přítomné žádné nespecifity. Ty byly pozorovány u ARenh8 a RNaseP. Komerční test pro tento referenční gen byl však použit i v dalších pracech a rozhodli jsme se s ním pokračovat (Sumiyoshi et al., 2019; Kohli et al. 2018).

Počet kopií androgenového receptoru a zesilovače transkripce bylo hodnoceno i u dalších buněčných linií a to u DU145, LAPC4, PC3, DUCaP, RWPE-1, C4-2, WPMY-1 a EP156T. Pouze u linie VCaP a DUCaP byla detekována amplifikace androgenového receptoru. Obě tyto linie jsou odvozené z metastáz u stejného pacienta (VCaP z obratle - vertebrae; DuCaP z dura mater) (Sobel, Sadar, 2005). U linií DU145, LAPC4 a RWPE-1 byl pozorován nižší signál androgenového receptoru. Analýza ARenh14 u testovaných buněčných linií nezaznamenala přítomnost amplifikace zesilovače transkripce. U linií DU145, LAPC4, PC3 a RWPE-1 byl pozorován nižší signál zesilovače transkripce androgenového receptoru. Tyto změny mohou souviset s chromozomální nestabilitou u nádorových buněčných linií. Například linie DU145 je většinou triploidní, avšak mohou se vyskytovat i tetra a hexaploidní klony (Beheshti et al. 2001). Pokles ploidity chromozomu X byl také pozorován u radiorezistentních klonů této linie (Seifert et al. 2019).

Počty kopií AR byly stanoveny u buněčné linie VCaP ve směsi s LNCaP také pomocí digitální PCR. Tento experiment byl proveden se vzorky, jež obsahovaly 2 ng DNA a 20 ng DNA. V případě nižšího množství DNA byly počty pozitivních kapek nedostatečné, a proto pro další analýzu bylo použito vždy 20 ng DNA. Systém potvrdil amplifikaci androgenového receptoru u čisté linie VCaP i u naředěných vzorků VCaP 50% DNA a 10% DNA. Podle hodnot pro VCaP 10% DNA se jako mírně citlivější jeví digitální PCR (cca 5 kopií AR, Obr. 16) ve srovnání s qPCR (2-3 kopie AR, Obr. 10 a 18).

Posledním experimentem této práce bylo provedení ddPCR u patientských vzorků plazmy za účelem zjištění přítomnosti amplifikace androgenového receptoru. U žádného z doposud analyzovaných pacientů, nebyla detekována amplifikace androgenového receptoru. Pravděpodobně se u těchto nemocných pacientů s karcinomem prostaty zatím nevytváří rezistence. Tento pilotní soubor byl použit pro první ddPCR a byl vybrán pouze podle koncentrace izolované DNA z plazmy. Klinické informace byly zatím zaslepeny a budou analyzovány po vyšetření většího souboru pacientů.

4 Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na analýzu počtu kopií genů androgenového receptoru a zesilovače transkripce androgenového receptoru. Počty kopií byly analyzovány jak na buněčných liniích VCaP, LNCaP a jejich naředěných směsích, tak u palety dalších buněčných linií. Rovněž byly analyzovány plazmatické krevní vzorky pacientů s pokročilým karcinomem prostaty (N=10), z nichž byla izolována ccfDNA.

Pro praktickou část byla stěžejní především kultivace vybraných buněčných linií a následné ověření přítomnosti amplifikace androgenového receptoru u VCaP linie. Experimentální část byla provedena pomocí základních molekulárně genetických metod. S využitím kvantitativní PCR v reálném čase byly naměřeny Ct hodnoty pro jednotlivé geny. Na základě získaných Ct hodnot byly stanoveny počty kopií (CN, copy number) v genomové DNA u buněčných linií i patientských vzorků. Velikosti jednotlivých produktů PCR reakce byly ověřeny pomocí gelové elektroforézy. Prostřednictvím digitální PCR byly ověřeny hodnoty CN u pacientů s karcinomem prostaty, přičemž ddPCR stanovila počty kopií přímo. Ze získaných CN byla hodnocena amplifikace jednotlivých vzorků buněčných linií i pacientů. V případě patientských vzorků nebyla zatím detekována amplifikace androgenového receptoru ani u jednoho z analyzovaných pacientů s karcinomem prostaty. Tato vyšetření, včetně analýzy zesilovače transkripce, budou pokračovat na větším souboru pacientů a zhodnoceny společně z klinickými informacemi, zejména s ohledem na typ léčby a agresivitu onemocnění.

5 Použitá literatura

AARON L.T., FRANCO O.E., HAYWARD S.W. (2016); *Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia*. Urologic Clinics of North America. 43:279-288

ADAM Z., VANÍČEK J., VORLÍČEK J. (2004); *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. 2., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Grada, ISBN 80-247-0896-5

AHMED H.U. et al. (2017); *Diagnostic accuracy of multi-parametric MRI and TRUS biopsy in prostate cancer (PROMIS): a paired validating confirmatory study*. Articles. 389: 815-22

ARMENIA J. et al. (2018); *The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer*. Nature Genetics. 50 (5):645-651

BECKER H. D. (2005); *Chirurgická onkologie*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0720-9

BECKMANN J.S., ESTIVILL X., ANTONARAKIS S.E.(2007); *Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability*. Nature Reviews Genetics. 8 (8):639-46

BEHESHTI B., PARK P.C., SWEET J.M., TRACHTENBERG J., JEWETT M.A.S., SQUIRE J.A. (2001); *Evidence of Chromosomal Instability in Prostate Cancer Determined by Spectral Karyotyping (SKY) and Interphase FISH Analysis*. Neoplasia. 3(1):62-9

BELTRAN H., JELENSKÝ R., FRAMPTON G.M., PARK K., DOWNING S.R., MACDONALD T.Y., JAROSZ M., LIPSON D., TAGAWA S.T., NANUS D.M., STEPHENS P.J., MOSQUERA J.M., CRONIN M.T., RUBIN M.A. (2013); *Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity*. European Urology. 63:920-926

BEZDÍČKOVÁ M., SLEZÁKOVÁ L. (2010); *Ošetrovatelství v chirurgii II*. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3130-8

BUSTIN S.A. (2004); *A-Z of quantitative PCR*. International University Line. 5:4-29, 141-432

CALLEWEART L., VAN TILBORGH N., CLAESSENS F. (2006); *Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor*. Cancer Research. 66(1):543-53

CLEUTJENS K.B., VAN EEKELEN C.C., VAN DER KORPUT H.A., BRINKMANN A.O., TRAPMAN J. (1996); *Two androgen response regions cooperate in*

steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. Journal of Biological Chemistry. 271:6379-6388

CLEUTJENS K.B., VAN DER KORPUT H.A., VAN EEKELEN C.C., VAN ROOIJ H.C., FABER P.W., TRAPMAN J. (1997); *An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. Molecular Endocrinology.* 11:148-161

CULIG Z., HOBISH A., HITTMAYER A., PETERZIEL H., CATO A.C., BARTSCH G., KLOCHER H. (1998); *Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. Prostate.* 35:63-70

DANG H.X. et al. (2020); *Cell-Free DNA Alterations in the AR Enhancer and Locus Predict Resistance to AR-Directed Therapy in Patients With Metastatic Prostate Cancer. American Society of Clinical Oncology Journal.* 4:680-713

DEHM S., TINDALL D. J. (2011); *Alternatively spliced androgen receptor variants, Endocrine-related cancer. England.* 18(5):183-96

DUŠEK L., MUTÍK J., KUBÁSEK M., KOPTÍKOVÁ J., ŤALOUDÍK J., VYZULA R. (2005); *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* (online). Masarykova univerzita, Dostupný z: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 (2007), ISSN 1802-8861, ověřeno k 24. 7. 2021

DVOŘÁČEK J., BABJUK M. (2005); *Onkourologie.* Praha: Galén. ISBN 80-7262-349-4

DYLEVSKÝ I. (2006); *Základy anatomie.* Vyd. 1. Praha: Triton. ISBN 80-7254-886-7

EISFELDT J., NILSSON D., ANDERSSON-ASSARSSON J.C., LINDSTRAND A. (2018); *AMCNE: Confident copy number assessment using whole genome sequencing data. Plos one.* 13(3):e0189710

ELIŠKOVÁ M., NAŇKA O. (2006); *Přehled anatomie.* Vyd. 1. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1216-X

FEUK L., CARSON A.R., SCHERER S.W. (2006); *Structural variation in the human genome. Nature Reviews Genetics.* 7:85-97

FIALOVÁ E., ZDEŇKOVÁ K., JABLONSKÁ E., DEMNEROVÁ K., OVESNÁ J. (2019); *Digitální PCR: Princip a aplikace. Chemické listy.* 113:545-552

FREDMAN D., WHITE S.J., POTTER S., EICHLER E.E. DEN DUNNEN J.T., BROOKES A.J. (2004); *Complex SNP-related sequence variation in segmental genome duplications. Nature Genetics.* 36:861-866

GELMANN E.P. (2002); *Molecular biology of the androgen receptor*. Journal of Clinical Oncology. 20:3001-3015

GOSSELAAR C., ROOBOL M.J., ROEMELING S., SCHROÖDER F.H. (2008); *The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC)*, Rotterdam. European Urology. 54(3):581-588

HANAHAN D., WEINBERG R.A. (2011); *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell. 144(5):646-74

HANUŠ T., MACEK P. (2015); *Urologie pro mediky*. Vyd. 1. Univerzita Karlova v Praze. ISBN 978-80-246-3008-3

HEINLEIN C.A., CHANG C. (2004); *Androgen receptor in prostate cancer*. Endocrine Reviews. 25:276-308

HOCKING J., MITHRAPRABHU S., KALFF A., SPENCER A. (2016); *Liquid biopsies for liquid tumors: emerging potential of circulating free nucleic acid evaluation for the management of hematologic malignancies*. Cancer Biology and Medicine. 13(2): 215-225

HOTTE S. J., SAAD F. (2010); *Current management of castrate-resistant prostate cancer*. Current Oncology. 17:72-79

JEMAL A., BRAY F., CENTER M.M., FERLAY J., WARD E., FORMAN D. (2011); *Global cancer statistics*. Cancer Journal for Clinicians. 61:69-90

JENSTER G., VAN DER KORPUT H.A., VAN VROONHOVEN C., VAN DER KWAST T.H., TRAPMAN J., BRINKMANN A.O. (1991); *Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization*. Molecular endocrinology. 5:1396-1404

KAWACIUK I. (2009); *Urologie*. 1. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-627-7

KAWACHI M.H. et al. (2010); *Prostate Cancer Early Detection*. National Comprehensive Cancer Network. 8:240-262

KLEIN E.A., PLATZ E.A., THOMSON I.M., WEIN A.J., KAVOUSSI L.R. (2007); *Epidemiology, Etiology, and Prevention of Prostate Cancer*. Campbell-Walsh Urology, 9th ed. Philadelphia: Saunders. 2854-2867

KOHLI M., LI J., DU M., HILLMAN D.W., DEHM S.M., TAN W., CARLSON R., CAMPION M.B., WANG L., WANG L., ZHANG H., ZHANG P., KILARI D., HUANG CH.CH. WANG L. (2017); *Prognostic association of plasma cell-free DNA-based androgen receptor amplification and circulating tumor cells in prechemotherapy*

metastatic castration-resistant prostate cancer patients. Prostate Cancer and Prostatic Diseases. 21:411-418

KOIVISTO P., KONONEN J., PALMMBERG C., TAMMELA T., HYYTINEN E., ISOLA J., TRAPMAN J., CLEUTJENS K., NOORDZIJ A., VISAKORPI T., KALLIONIEMI O.P. (1997); *Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. Cancer Research, 57:314-319*

KUBACZKOVÁ V., SEDLAŘÍKOVÁ L., BOLLOVÁ B., SANDECKÁ V., ŠTORK M., POUR L., ŠEVČÍKOVÁ S. (2017); *Liquid Biopsies-the Clinics and the Molecules*, Faculty of Medicine Masaryk University. Brno. (30):2S13-2S20

LI L.M., ARNOSTI D.N. (2011); *Long- and short-range transcriptional repressors induce distinct chromatin states on repressed genes. Current Biology. 21:406-412*

LIEW S.N., LAZARUK K., WONG L., LIVAK J., LIVAK S., LIVAK K. (2005); *Determining the Copy Number of Genes Using Real-Time Quantitative PCR. Applied Biosystems* https://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/cms_042195.pdf, ověřeno k 1. 8. 2021

LUCA S.D., PASSERA R., FIORI C., BOLLITO E., CAPPIA S., SCARPA R.M., SOTTILE A., RANDONE D.F., PORPIGLIA F. (2015); *Prostate health index and prostate cancer gene 3 score but not percent-free Prostate Specific Antigen have a predictive role in differentiating histological prostatitis from PCa and other nonneoplastic lesions (BPH and HG-PIN) at repeat biopsy. Urologic Oncology. 33:424e17-424e23*

MCNEAL J.E. (1984); *Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. Progress in clinical and biological research. 145:27-53*

MENDEL Y., KAISERMANN J., PAWLOWSKI M. (2020); *Techniky molekulární biologie* II. Cambridge Stanford Books <https://play.google.com/books/reader?id=fqX5DwAAQB AJ&pg=GBS.PP1&hl=cs>

NAIR M., PEATE I. (2017); *Patofyziologie pro zdravotnické obory*. Praha: Grada. ISBN 978-80-271-0229-7

NEUVIRT H., BOUCHAL J., KHARAISHVILL G., PLONER CH., JÖHRER K., PITTERL F., WEBER A., KLOCKER H., EDER E. (2020); *Cancer-associated fibroblasts promote prostate tumor growth and progression through upregulation of cholesterol and steroid biosynthesis. Cell Communication and Signaling. 18 (1):11*

PALMIROTTA R., LOVERO D., CAFFORIO P., FELICI C., MANNAVOLA F., PELLÉ E., QUARESMINI D., TUCCI M., SILVESTRIS F. (2018); *Liquid biopsy of cancer:*

a multimodal diagnostic tool in clinical oncology., Therapeutic advances in medical oncology. England. 10:1758835918794630

PANG S., TANEJA S., DARDASHTI K., COHAN P., KABOO R., SOKOLOFF M., TSO C.L., DEKERNION J.B., BELLDEGRUN A.S. (1995); *Prostate tissue specificity of the prostate-specific antigen promoter isolated from a patient with prostate cancer.* Human Gene Therapy. 6:1417-1426

PENKA M., SLAVÍČKOVÁ E. (2011); *Hematologie a transfuzní lékařství.* Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0

PODRAZIL M., ŠPÍŠEK R., BARTŮŇKOVÁ J. (2016); *Imunoterapie karcinomu prostaty.* Urologie v praxi. 17 (4):159-166

POLÁKOVÁ L., PACÍK D., ČERMÁK A. (2014); *Karcinom prostaty-od hormonální závislosti po kastračně rezistentní nádor.* Urologické listy. 12(2): 29-39

POTTER G.A., BARRIE S.E. JARMAN M., ROWLANDS M.G. (1995); *Novel steroidal inhibitors of human cytochrome P45017 alpha (17alpha-hydroxylase-C17,20-lyase): potential agents for the treatment of prostatic cancer.* Journal of Medicinal Chemistry. 38 (13):2463-2471

ROBINSON D. et al. (2015); *Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer.* Cell. 162: 454

ROKYTA R. (2015); *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi.* Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4867-2

SAAD F., FIZAZI K. (2015); *Androgen Deprivation Therapy and Secondary Hormone Therapy in the Management of Hormone-sensitive and Castration-resistant Prostate Cancer.* Urology. 86:852-861.

SADLER T.W. (2011); *Langmanova lékařská embryologie.* Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2640-3

SASAKI M., KANEUCHI M., SAKURAGI N., FUJIMOTO S., CARROLL P.R., DAHIYA R. (2003); *The polyglycine and polyglutamine repeats in the androgen receptor gene in Japanese and Caucasian populations.* Biochemical and Biophysical Research Communications. 312(4):1244-7

SEIFERT M., PEITZSCH C., GORODETSKA I., BÖRNER C.,KLINK B., DUBROVSKA A. (2019); *Network-based analysis of prostate cancer cell lines reveals novel marker gene candidates associated with radioresistance and patient relapse.* Plos Computational Biology.15(11):e1007460

SHAFI A., YEN A. E., WEIGEL N. L. (2013); *Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer*. Pharmacology & Therapeutics 130: 223-238.

SCHER H.I., BEER T. M., HIGANO C.S., ANAND A., TAPLIN M.E., EFSTATHIOU E., RATHKOPF D., SHELKEY J., Y YU E., ALUMKAL J., HUNG D., HIRMAND M., SEELY L., MORRIS M.J., DANILA D.C., HUMM J., LARSON S., FLEISHER M., SAWYERS CH.L. (2010); *Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study*. Lancet. 375(9724):1437-1446

SIMARD J., DUMONT M., LABUDA D. (2003); *Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed*. Endocrine Related Cancer. 10:225-259

SINGH SM., GAUTHIER S., LABRIE F. (2000); *Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships*. Current Medicinal Chemistry. 7(2):211-47

SLABÝ O. et al. (2015); *Molekulární medicína*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-121-6

SLEZÁKOVÁ L. (2013); *Ošetřovatelství pro střední zdravotnické školy III: gynekologie a porodnictví, onkologie, psychiatrie*. 2. dopl. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4341-7

SOBEL R.E., SADAR M.D. (2005); *Cell lines in prostate cancer research: a compendium of old and new lines-part 1*. The Journal of Urology. 173:342-359

SUMIYOSHI T., MIZUNO K., YAMASAKI T., MIYAZAKI Y., MAKINO Y., OKASHO K., LI X., UTSUNOMIYA N., GOTO T., KOBAYASHI T., TERADA N., INOUE T., KAMBA T., FUJIMOTO A., OGAWA O., AKAMATSU S. (2019); *Clinical utility of androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA as a biomarker for treatment of castration-resistant prostate cancer*. Scientific Reports. 9:4030

SUZUKI H., SATO N., WATABE Y., MASAI M., SEINO S. SHIMAZAKI J. (1993); *Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 46:759-765

ŠMARDÁ J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J. (2005); *Metody molekulární biologie, 1. vydání*, Vydavatelství MU, Brno - Kraví Hora. ISBN 80-210-3841-1

TAKEDA D.Y., SPISÁK S., SEO J.H., BELL C., O'CONNOR E., KORTHAUER K., RIBLI D., CSABAI I., SOLYMOSI N., SZÁLLÁSI Z., STILLMAN D. R., CEJAS P., QIU X., LONG H. W., TISZA V., NUZZO P. V., ROHANIZADEGAN M., POMERANTZ M. M.,

FREEDMAN M. L. (2018); *A Somatically Acquired Enhancer of the Androgen Receptor Is a Noncoding Driver in Advanced Prostate Cancer*. Cell. 174(2):422-432. e13

TAN M.H.E. et al. (2015); *Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery.*, Acta pharmacologica Sinica. United States, 36(1):3–23

TOMÁŠEK J. (2015); *Onkologie: minimum pro praxi*. Praha: Axonite CZ. Asclepius. ISBN 978-80-88046-01-1

VELDSCHOLTE J., RIS-STALPERS C., KUJPER G.G., JENSTER G., BERREVOETS C., CLAASSEN E., VAN ROOIJ H.C., TRAPMAN J., BRINKMANN A.O., MULDER E. (1990); *A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 173:534-540

VIERSTRACTE A. (1999); <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>, ověřeno k 24. 7. 2021

WYATT A.W. et al. (2017); *Concordance of Circulating Tumor DNA and Matched Metastatic Tissue Biopsy in Prostate Cancer*. Journal of the National Cancer Institute.109 (12)

ZARREI M., MACDONALD J.R., MERICO D., SCHERER S.W. (2015); *A copy number variation map of the human genome*. Nature Reviews Genetics.16:172-83