

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Porovnání metod přímé a nepřímé detekce cirkulujících
nádorových buněk**

Bakalářská práce

Autor: Sebastian Reichel

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie B1407

Vedoucí práce: Mgr. Monika Vidlařová

Olomouc 2018

Prohlášení:

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 16. 5. 2018

.....

Podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především své vedoucí bakalářské práce Mgr. Monice Vidlařové za její skvělé a odborné vedení, její pomoc a spoustu trpělivosti jak v laboratoři, tak při vypracovávání mé závěrečné práce. Dále bych chtěl poděkovat své přítelkyni za její nekonečnou podporu a pevné nervy při mém psaní. Stejně tak bych rád poděkoval svým rodičům, ve kterých jsem vždy našel oporu. Poděkování si jistě zaslouží i Mgr. Jana Vrbková, Ph.D., která mi pomohla se zpracováním statistiky a všichni zaměstnanci ÚMTM, kteří mi vždy ochotně pomohli, když bylo potřeba.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Sebastian Reichel

Název práce: Porovnání metod přímé a nepřímé detekce cirkulujících nádorových buněk

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Ústav Molekulární a Translační Medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Školitel: Mgr. Monika Vidlařová

Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt:

Kolorektální karcinom je jedno z celosvětově nejrozšířenějších maligních onemocnění postihujících každoročně více než milion osob. V současnosti jsou proto zavedena opatření ve formě narůstající prevence a pravidelných lékařských prohlídek u starších osob. Stejně tak lze pozorovat vzestup vývoje nových metod pro přímé vyšetření a včasnou diagnostiku nádorových onemocnění. Pro tyto diagnostické metody se používají biomarkery specifické konkrétně pro vyšetřovaný nádor. Pro kolorektální karcinom jsou to běžně používané markery CEA, CK-20, EGFR a EpCAM. Tyto markery jsou také využívány pro stanovení minimální reziduální choroby, jež se může objevit u pacientů, kteří už absolvovali léčbu, nebo kterým byl nádor odoperován. Minimální reziduální choroba se diagnostikuje detekcí cirkulujících nádorových buněk v krvi. Ty nesou specifický antigen, který je možné detekovat. Cílem naší práce bylo prokázat, že nepřímou metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase je možné minimální reziduální chorobu detekovat s citlivostí odpovídající metodám přímé detekce. Pro náš experiment jsme zvolili buněčnou linii HT-29 při různém zředění. Citlivost metody jsme testovali pro markery CEA, CK-20, EGFR a EpCAM, které jsou typické pro detekci nádorových buněk u kolorektálního karcinomu. Porovnáním výsledků PCR s daty získanými z koloniformního testu, který zastupuje přímé diagnostické metody, jsme prokázali, že real-time PCR je dostatečně citlivou metodou pro detekci minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu.

Klíčová slova: PCR, real-time PCR, RT-PCR, CFU, kolorektální karcinom, cirkulující nádorové buňky, minimální reziduální choroba, CEA, CK-20, EGFR, EpCAM

Počet stran: 66

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Sebastian Reichel

Title: Comparison of methods of direct and indirect detection of circulating tumour cells

Type of thesis: Bachelor

Department: Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine of the Palacky University in Olomouc

Advisor: Mgr. Monika Vidlarova

The year of presentation: 2018

Abstract:

Colorectal carcinoma is one of the most worldwide spread malignant disease affecting more than one million people every year. At present consequently, there are a lot of measures like increasing prevention and regular medical checks of elder people. Also progress in development of new methods for direct examination and early diagnosis of cancer diseases can be observed. For these diagnostic methods are used biomarkers specific for investigated tumor. For colorectal carcinoma are commonly used markers CEA, CK-20, EGFR and EpCAM. These markers are also used for determination of minimal residual disease, that may occur in patients who are already undergone radical surgery or another treatment. Minimal residual disease is diagnosed by detection of circulating tumor cells in patient's blood. These cells are carrying specific antigens that can be detected. The aim of our study was to prove that using of indirect method of real-time polymerase chain reaction for minimal residual disease detection can be used with sensitivity comparable to direct methods regularly used for detection of CTCs. For our study we chose HT-29 cell line in various dilution. We tested sensitivity for markers CEA, CK-20, EGFR and EpCAM, which are typical for tumor cells detection in colorectal carcinoma. By comparing the PCR results with the data obtained from the colony forming unit assay, which represent direct diagnostic method, we have shown that real-time PCR is a sufficiently sensitive method for the detection of minimal residual disease in colorectal cancer.

Keywords: PCR, real-time PCR, RT-PCR, CFU, colorectal carcinoma, circulating tumor cells, minimal residual disease, CEA, CK-20, EGFR, EpCAM

Number of pages: 66

Language: Czech

Obsah

I.	Cíle práce	8
II.	Úvod	9
III.	Teoretická část.....	10
1	KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM	10
1.1	Epidemiologie kolorektálního karcinomu.....	11
1.2	Diagnostika a projevy onemocnění.....	14
1.3	Rizikové faktory	14
1.4	Prevence	15
2	MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ CHOROBA.....	17
3	CIRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY	18
3.1	Cirkulující nádorová DNA.....	19
3.2	Metody přímé detekce CTCs.....	19
3.2.1	Koloniformní test.....	19
3.2.2	Metody založené na detekci pomocí specifických protilátek.....	20
3.2.3	Metody založené na rozdílných fyzikálních vlastnostech.....	22
3.2.4	Metody nepřímé detekce CTCs	23
4	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	24
4.1	Jednotlivé kroky při měření PCR	24
4.2	Komponenty PCR.....	25
4.3	qPCR/Real-time PCR.....	26
4.4	RT-PCR (Reverzně-transkriptázová PCR).....	28
4.5	Real-time RT-PCR.....	29
4.5.1	Detekce produktů vznikajících při Real-time PCR.....	29
4.5.1.1	DNA vazebná fluorescenční barviva.....	29
4.5.1.2	DNA próby	30
4.6	Specifické markery používané k detekci CTCs u CRC.....	31
4.6.1	EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule).....	31
4.6.2	CEA (Carcinomembrionic antigene)	32
4.6.3	CK 20 (Cytokeratin-20)	32

4.6.4	EGFR (Epidermal growth factor receptor).....	32
IV.	Experimentální část	33
1	METODIKA	33
1.1	Kultivace a značení nádorových buněk	33
1.2	Izolace RNA	36
1.3	Reverzní transkripce	39
1.4	Real-time PCR.....	40
1.4.1	Použité primery a próby jednotlivých markerů	41
1.4.1.1	EpCAM.....	41
1.4.1.2	EGRF.....	42
1.4.1.3	CEA.....	44
1.4.1.4	CK-20	45
1.4.2	Negativní kontrola a specifické standardy	46
1.4.3	Deoxynukleotidy, DNA polymerasa a pufr.....	47
1.5	Statistika.....	48
2	VÝSLEDKY	49
2.1	Validační experiment	49
2.2	Srovnání výsledků real-time RT-PCR a CFU	53
3	DISKUZE	57
4	ZÁVĚR.....	59
V.	Použitá literatura.....	60
VI.	Použité zkratky.....	65

I. Cíle práce

Provést rešerši na dané téma, zorientovat se v problematice detekce cirkulujících nádorových buněk u solidních nádorů, získat teoretické a praktické znalosti PCR metodiky, naučit se pracovat s patřičnými databázemi a softwarem (PubMed, RotorGene 6, aj.).

Naučit se pracovat s buněčnými liniemi (kultivace, pasážování, koloniformní test), izolaci leukocytů ze vzorků krve, izolaci RNA a reverzní transkripci a stanovit expresi vybraných markerů metodou kvantitativní RT-PCR.

Porovnat metody přímé a nepřímé detekce cirkulujících nádorových buněk, jejich výhody a nevýhody při použití v praxi.

II. Úvod

V této bakalářské práci se budu zabývat detekcí cirkulujících nádorových buněk používaných ke stanovení minimální reziduální choroby, a to konkrétně u nádorových buněk kolorektálního karcinomu.

V dnešní době je rakovina jedním z nejzávažnějších celosvětově rozšířených onemocnění, které je diagnostikováno průměrně u každého třetího člověka a je příčinou přibližně 25 % všech úmrtí. V současnosti lze pozorovat trend narůstajícího množství nově diagnostikovaných nádorů, ale také zvyšující se počet pacientů, které se podařilo úspěšně vyléčit. Tento fakt se dá přičíst především úrovni současné medicíny, nově vyvinutým léčebným metodám a taky neustále narůstající včasné diagnostice související s rozvojem prevence.

Existuje široké spektrum metod určených k diagnostice nádorových onemocnění. Mezi ty v současnosti nejběžnější patří metody cytologie, histologie, imunohistochemie a na ni navazující metody založené na molekulární diagnostice.

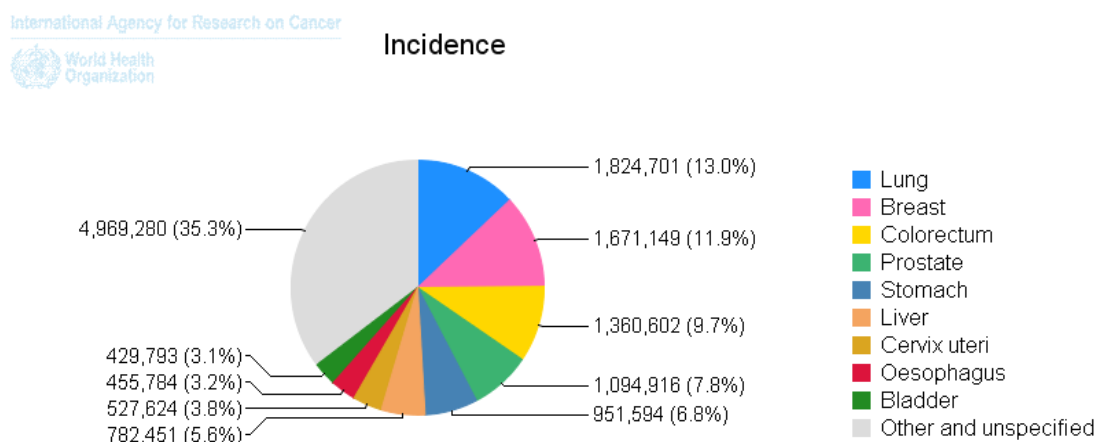
V poslední době byla vyvinuta a je běžně používána celá řada metod založených na molekulární diagnostice, sloužících k přímé i nepřímé detekci a pozorování zhoubných nádorových onemocnění. Mezi nejčastěji používané patří pro svou rychlost a přesnost diagnózy především metody využívající přímé detekce cirkulujících nádorových buněk (CTCs) dokazující přítomnost nebo absenci těchto buněk přímo ve vzorku periferní krve pacienta (CellSearch, ISET, EpCAM čipy, Maintrac, ScreenCell, atd.). Dále k nim patří nejdéle používaná metoda PCR, tzv. zlatý standard v diagnostice CTCs, která je naopak založena na nepřímé detekci CTCs pomocí analýzy nukleových kyselin získaných ze vzorku krve.

S rozvojem pozorování cirkulujících nádorových buněk se v posledním desetiletí rozvinula vyšetření detekce minimální reziduální choroby (MRD) pro solidní maligní nádory. Včasnou diagnózou MRD se dá předejít návratu nádorového onemocnění u pacientů, kterým již bylo v minulosti nádorové onemocnění diagnostikováno a poté jim byl nádor úspěšně odstraněn.

III. Teoretická část

1 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

Kolorektální karcinom (CRC; colorectal cancer) je maligní nádorové onemocnění tlustého střeva a konečníku, které zaujímá po karcinomu plic a karcinomu prsu třetí příčku mezi celosvětově nejčastěji se vyskytujícími malignitami (viz Obr. 1). U žen se celosvětově jedná dokonce o druhý nejrozšířenější karcinom. Je to jedno z nejnebezpečnějších nádorových onemocnění s úmrtností postižených osob, u kterých byl karcinom diagnostikován, celosvětově kolem 50 %. V méně vyspělých zemích je úmrtnost dokonce 52%. Tento rozdíl je dán především rozdílnou kvalitou zdravotnictví v různých částech světa. (podle www.globocan.iarc.fr)

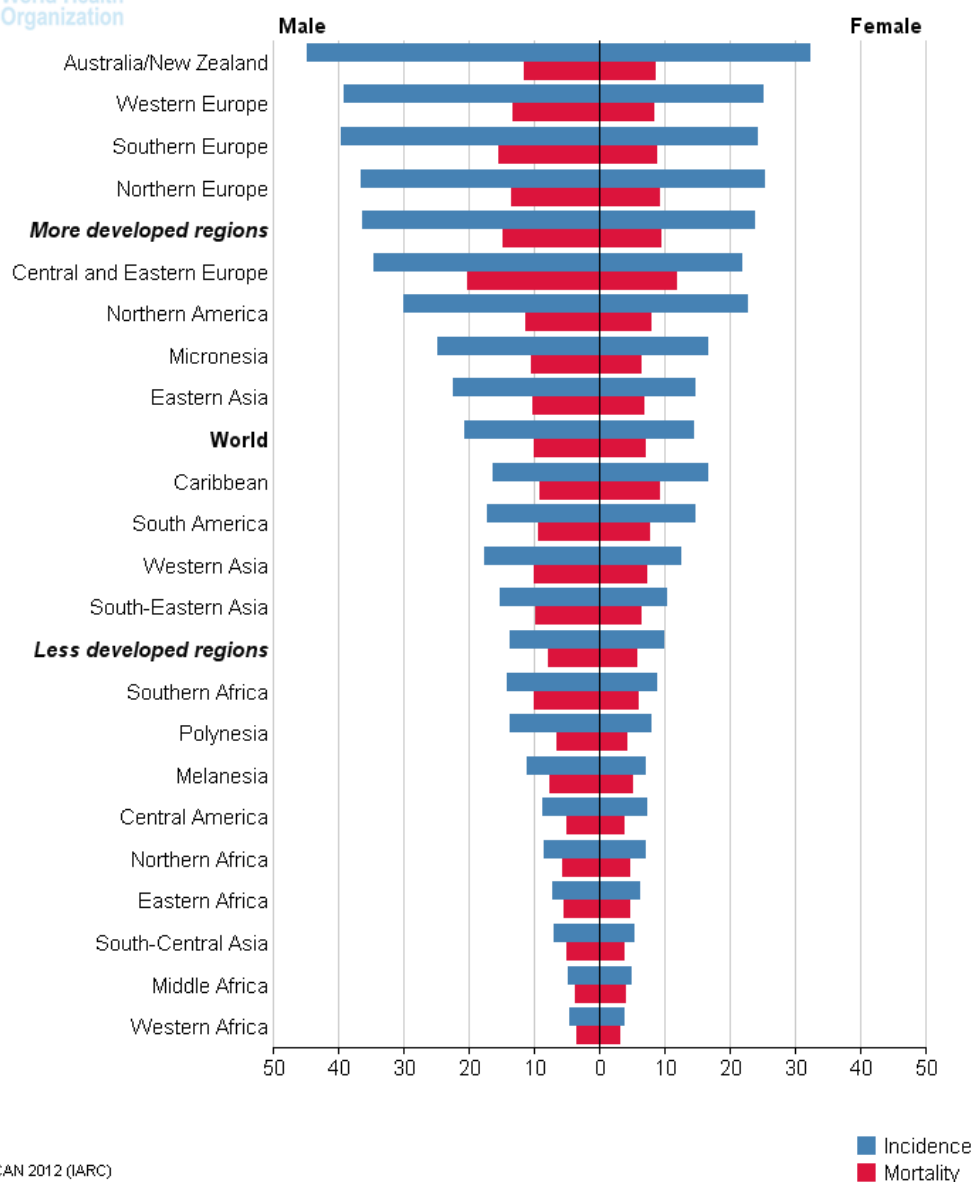


Obr.1: Odhadovaná incidence všech karcinomů u obou pohlaví v roce 2012 (podle www.globocan.iarc.fr)

1.1 Epidemiologie kolorektálního karcinomu

Rozšíření je celosvětové s vyšším množstvím indikací ve vyspělejších zemích Evropy a Ameriky. Téměř 55 % z celkového počtu nových nálezů je stanoveno ve vyspělých zemích (viz obr. 2). V roce 2012 bylo celosvětově zaznamenáno přibližně 1 361 000 diagnostikovaných případů a téměř 694 000 úmrtí. Kolorektální karcinom v globálním měřítku postihuje více muže než ženy (746 000 nových nálezů u mužů a 614 000 u žen). V Evropě bylo v roce 2012 celkově zaznamenáno 447 000 nových případů a 215 000 úmrtí. Nejvíce diagnostikovaných nádorů v Evropě bylo na Slovensku, na druhém místě je Maďarsko a na třetím Dánsko. Česká republika je v tomto žebříčku na pátém místě. (podle www.globocan.iarc.fr)

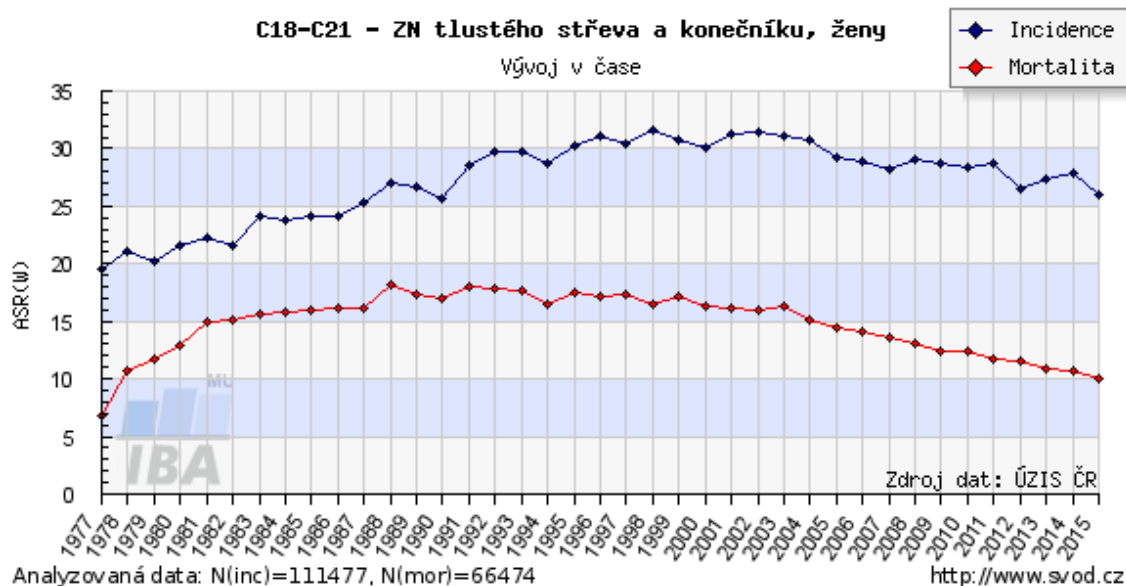
Konkrétně v České republice je kolorektální karcinom hned po karcinomu plic druhým nejčastěji se vyskytujícím nádorovým onemocněním a druhým nejčastějším nádorem, který nakonec končí úmrtím pacienta. (Ferlay *et al.*, 2010) Podle zveřejněných statistik bylo v roce 2013 v ČR zaznamenáno celkem 8066 pacientů, kterým byla diagnostikována rakovina tlustého střeva nebo konečníku. Současně bylo zaznamenáno 3716 případů úmrtí, které bylo způsobeno právě kolorektálním karcinomem. V současnosti se úmrtnost v ČR vlivem tohoto onemocnění díky neustále vzrůstající prevenci a medicínálnímu pokroku v detekci a léčbě kolorektálního karcinomu snižuje (viz obr. 3 a obr. 4). Díky existujícím preventivním programům pro občany ČR se dá očekávat, že klesající trend bude pokračovat i v následujících letech. (Dušek *et al.*, 2005)



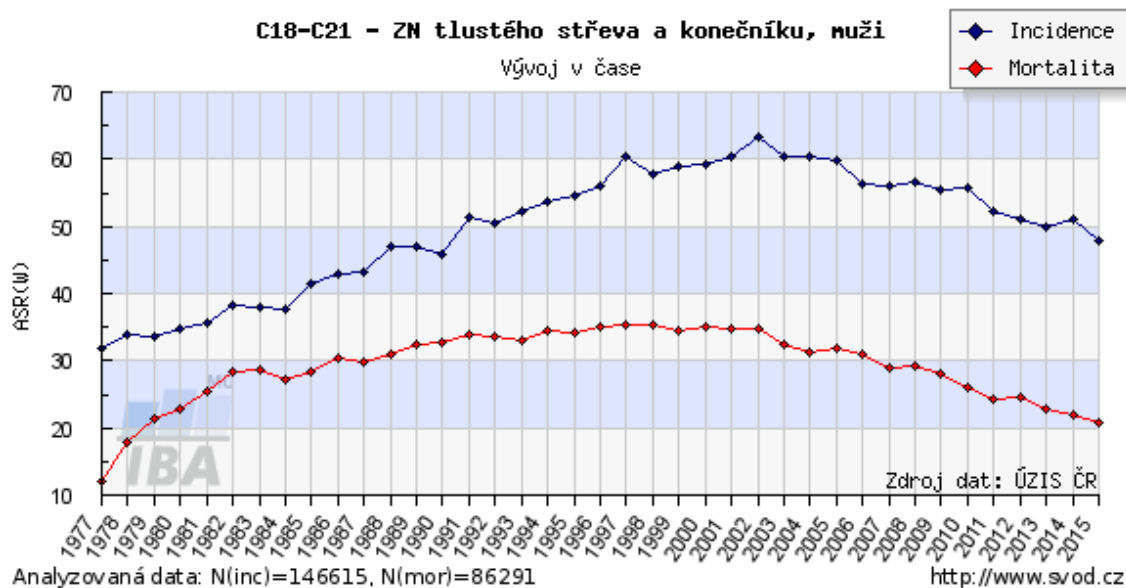
GLOBOCAN 2012 (IARC)

■ Incidence
■ Mortality

Obr. 2: Celosvětová incidence a mortalita u kolorektálního karcinomu u mužů a žen (podle globocan.iarc.fr)



Obr. 3: Vývoj incidence a mortality CRC v ČR u žen od roku 1977 do roku 2015 přepočítaný na 100 000 obyvatel (podle svod.cz)



Obr. 4: Vývoj incidence a mortality CRC v ČR u mužů od roku 1977 do roku 2015 přepočítaný na 100 000 obyvatel (podle svod.cz)

1.2 Diagnostika a projevy onemocnění

Vedle vysoké a neustále stoupající incidence má toto maligní onemocnění i vysokou mortalitu způsobenou zejména diagnózou onemocnění v pokročilých stádiích, kdy jsou léčebné postupy pouze omezené a šance na vyléčení malá. Včasná diagnostika je však obtížná, protože se onemocnění ve většině případů dlouho rozvíjí bez jakýchkoliv vnějších příznaků. Časté jsou také metastázy do ostatních orgánů, které jsou obvyklou příčinou příchodu pacienta k lékaři a odhalení kolorektálního karcinomu.

Nejvýraznějším projevem kolorektálního karcinomu je obturace střeva, pokud nádorová masa vyplní celé střevní lumen. Klinicky pak pacient přichází s bolestmi v oblasti ilea, kde dochází nejčastěji k ucpávání střeva z důvodu zúžení. Častějšími, a ne tak klinicky výraznými projevy obturace střeva mohou být zácpa, průjem, nadměrná plynatost, časté nucení na stolicí, pocit nedostatečného vyprázdnění, bolesti břicha a krev nebo hlen ve stolici. Vedlejší příznaky, které se obvykle vyskytují v pozdějším stádiu onemocnění, jsou únava, slabost, nadměrné hubnutí, nevolnost a nechutenství, bledost a žloutenka, zvýšená teplota. Občas dochází i k nárůstu objemu břišní dutiny. (Dušek *et al.*, 2005)

1.3 Rizikové faktory

Rizikové faktory se obecně u všech nádorových onemocnění dají rozdělit na dvě kategorie. Zaprvé to jsou faktory vnější, které zahrnují životosprávu a životní styl daného jedince. Tyto faktory může každý ovlivňovat a tím předcházet vzniku nádorových onemocnění. Potom to jsou faktory dědičné, které představují predispozice k určitým onemocněním, které člověk zdědil po svých předcích. Lidé, kteří mají v rodině nějaké predispozice ke karcinomu a ví o tom, by tak měli dávat větší pozor na potlačování vnějších faktorů a chodit na pravidelné lékařské prohlídky. (Kollárová, 2011)

Hlavními vnějšími faktory zvyšujícími pravděpodobnost a rozvoj tohoto onemocnění jsou hyperinzulinémie, obezita, kouření a špatné stravovací návyky. To znamená především konzumace nevhodně upraveného masa (hlavně smaženého, grilovaného, uzeného a pečeného), zvýšený příjem živočišných tuků a malý příjem vlákniny.

Výrazným faktorem negativně souvisejícím se vznikem karcinomu kolorekta je také zvýšená konzumace alkoholu. (Cho *et al.*, 2004) Kromě špatného stravování je problémem také nedostatečné množství pohybu, se kterým souvisí zpomalení metabolismu, což taky výrazně zvyšuje riziko onemocnění. (Kollárová, 2011)

Vedle vnějších faktorů je dalším podstatným faktorem dědičná dispozice. To znamená převážně zvýšené riziko vzniku onemocnění u lidí, u jejichž biologických příbuzných se nádor tlustého střeva nebo konečníku někdy vyskytl. Hereditární podklad se diagnostikuje asi v 10 % onemocnění. Naprosto tak převažuje sporadický výskyt vzniku nádoru (90 %).

Dalším faktorem, který může vést až ke vzniku nádoru, je výskyt střevních polypů. To znamená výskyt nezhoubných nádorů, které vznikají jako výběžky sliznice střevní stěny. Tyto neléčené polypy se během růstu mohou přeměnit na zhoubný nádor.

Jako u většiny nádorových onemocnění tak i u kolorektálního karcinomu je jedním z hlavních rizikových faktorů vyšší věk člověka. Nejohroženější jsou pak zejména osoby ve věku od 70 do 80 let.

Určitým rizikem je také zatížení organismu jinou nemocí, která může napomoci rozvoji kolorektálního karcinomu. Zvýšené nebezpečí tak hrozí například pacientům s ulcerózní kolitidou nebo Crohnovou nemocí. (Kollárová, 2011)

1.4 Prevence

Prevence u CRC se rozděluje na dva hlavní směry. Prvním směrem je samotné předcházení vzniku onemocnění a druhým je včasné rozpoznání již vznikajícího nádoru a co nejrychlejší nasazení vhodné léčby.

Primární prevenci si nejčastěji můžeme představit jako změnu či úpravu životosprávy např. omezení konzumace uzenin a živočišných tuků, nahrazení živočišných tuků rostlinnými oleji, omezování přípravy jídel smažením a jeho nahrazování zdravějším vařením, dušením, či pomalým grilováním při nižších teplotách. Pozitivní vliv má také zvýšený příjem ovoce, zeleniny a vlákniny, Doporučuje se omezení příjmu alkoholu. Obecně se doporučuje zvýšený příjem potravin, které jsou bohaté na kyselinu listovou, vitamin D, selen a vápník. Dalším významným faktorem, který slouží jako prevence proti

vzniku maligního onemocnění je dobrý fyzický stav. To znamená hlavně dostatek pohybu a kontrola tělesné hmotnosti. (Kollárová, 2011)

Sekundární prevence se zaměřuje na včasné odhalení nemoci. Už v roce 2000 byl zahájen národní program zaměřující se na screening rakoviny konečníku a tlustého střeva a od roku 2014 probíhá adresné zvaní pojištěnců do tohoto programu. Lidé od 50 let mají nárok na pravidelné bezplatné lékařské prohlídky a měli by chodit na vyšetření krve ve stolici. Toto vyšetření však není tím nejspolehlivějším, protože krev ve stolici nemusí rovnou znamenat přítomnost CRC. (Dušek *et al.*, 2014)

Nejspolehlivější metodou pro diagnózu kolorektálního karcinomu je kolonoskopické vyšetření, při kterém je možné rovnou odstranit případné polypy a tím zabránit pozdějšímu operačnímu zákroku a možnosti vzniku onemocnění. (Dušek *et al.*, 2014)

2 MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ CHOROBA

Jako minimální reziduální choroba (zkráceně MRD – minimal residual disease) se obecně označují zbytky nádorových buněk (hlavně cirkulující nádorová DNA), ale i celé buňky (nejčastěji CTCs), které se uvolnily do krevního řečiště ze solidního nádoru. K tomu často dochází při chemoterapii a radioterapii, ale třeba i při operativním odstranění karcinomu.

Předpokládá se, že denně dojde u pacientů s rakovinným onemocněním k uvolnění přibližně 1 000 000 buněk na 1 gram původního solidního nádoru do krve. Většina těchto buněk však nemá předpoklady k tomu, aby v krevním řečišti přežila a byla schopna dalšího dělení, natož aby byla příčinou metastáz. Tyto buňky tak podléhají buněčné apoptóze, případně jsou zničeny a pohlceny makrofágy.

Skrytá minimální reziduální choroba má velký vliv na průběh a vývoj systémové choroby a také na přežití pacienta, u kterého byl diagnostikován kolorektální karcinom. Z toho důvodu je v rámci léčby a prevence potřeba u pacientů postižených karcinomem provádět monitoring a klinické zkoušky na přítomnost CTCs během léčby i po vyléčení, nebo po operativním odstranění nádoru. (Bork *et al.*, 2014)

3 CIRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY

Cirkulující nádorové buňky (CTCs – circulating tumour cells) jsou buňky, které se oddělily od primárního solidního nádoru do krevního řečiště, odkud se pak mohou dále šířit do ostatních tkání a orgánů. Jejich přítomnost v krvi zvyšuje celkovou agresivitu a schopnost metastázy karcinomu v těle. (Truini *et al.*, 2014) Nádorové buňky se velmi často nachází volně v krevním řečišti, případně se také hojně vyskytují v kostní dřeni pacienta. CTCs, které se nacházejí v kostní dřeni, případně v mikrometastázách, se obecně označují jako roztroušené nádorové buňky (DTCs – disseminated tumour cells). Tyto buňky poté nejčastěji postihují lymfatický systém, který přímo navazuje na oběhovou soustavu. Nádorové buňky v lymfatických uzlinách se pak nazývají izolované nádorové buňky (ITCs – isolated tumour cells). (Bork *et al.*, 2014)

CTCs mají obecně velký metastatický potenciál. To znamená, že často mohou stát za metastázami do jiných orgánů a tkání. (Masuda *et al.*, 2016) Uvádí se, že metastázy můžou až za 90 % všech úmrtí spojených s karcinomem. (Wittekind a Neid, 2015) Přítomnost CTCs v periferní krvi je velmi vzácná. Marrinucci *et al.*, 2012 udává, že u člověka s diagnostikovaným metastazujícím karcinomem je v 1 ml krve průměrně jedna až deset cirkulujících nádorových buněk. Pro srovnání v 1 ml krve se nachází přibližně miliarda červených krvinek a několik milionů bílých krvinek. (Marrinucci *et al.*, 2012, Mostert *et al.*, 2009)

Laboratorní stanovení probíhá nejčastěji dvojím způsobem. Zaprvé přímým vychytáváním nádorových buněk na základě znalosti specifických antigenů (nejčastěji EpCAM), lokalizovaných na povrchu cirkulujících nádorových buněk. Zadruhé pomocí identifikace typických markerů přítomných u těchto buněk.

Prvotně detekce CTCs probíhala pouze na základě zjišťování přítomnosti nebo nepřítomnosti typických epiteliálních markerů vyskytujících se v DNA těchto buněk. Nejrozšířenějšími a stále nejčastěji používanými markery pro identifikaci jsou EpCAM a cytokeratiny (CKs). Pro určení přítomnosti těchto markerů z periferní krve a kostní dřeni se využívá metody imunocytochemie a RT-PCR. (Masuda *et al.*, 2016)

V současnosti se zkouší k rozpoznání CTCs s metastatickým potenciálem další markery a „immuno-checkpoint“ geny.

3.1 Cirkulující nádorová DNA

Dalším významným prognostickým faktorem poukazujícím na maligní onemocnění v těle pacienta je cirkulující nádorová DNA (ctDNA - circulating tumour DNA), která se uvolňuje do krevního řečiště nejčastěji při apoptóze, nebo při nekróze původních CTCs. K rozpadu buněk a uvolnění ctDNA z nádorových buněk dochází nejčastěji při radioterapeutické či chemoterapeutické léčbě. (Nie *et al.*, 2015)

Podle některých studií je možné ctDNA využívat pro předvídání vývoje průběhu onemocnění u pacientů podstupujících chemoterapii. Bylo vyzorováno, že největší koncentrace ctDNA v krvi je ihned po chemoterapii a postupně pak dochází k rychlému poklesu koncentrace. (Pan *et al.*, 2012)

3.2 Metody přímé detekce CTCs

3.2.1 Koloniformní test

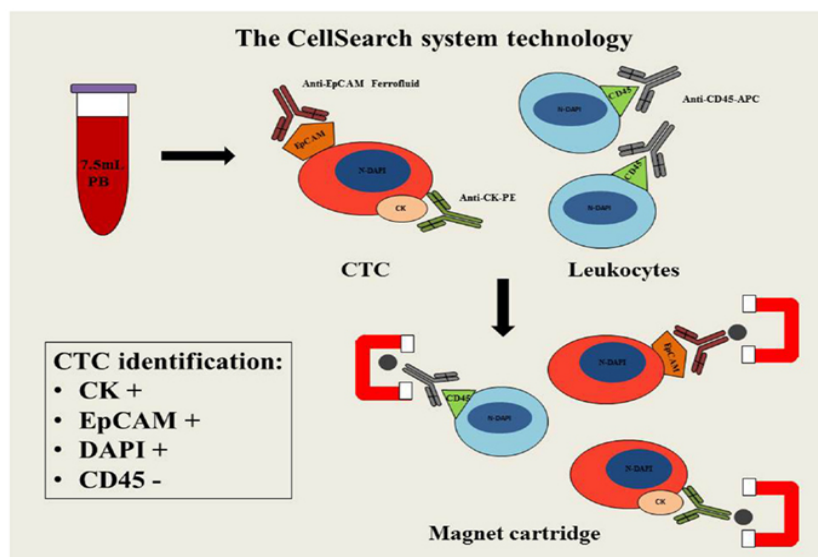
CFU (colony forming unit assay) je nejvyužívanější a nejjednodušší kultivační metoda používaná pro přímou detekci živých CTCs. Metoda je založena na schopnosti nádorových buněk se rozmnožovat a dělit v polotuhém médiu (např. McCoyovo modifikované médium) za předem daných specifických podmínek. (Füri *et al.*, 2015) Po 14 dnech, kdy jsou buňky ponechány v inkubátoru při ideálních podmínkách (nejčastěji 37 °C a 5 % CO₂ v atmosféře), se promyje vzorek PBS a buňky se obarví 0,1% krystalovou violetí v methanolu, která se nechá působit 10 minut a potom se smyje. Obarvené zachycené žijící kolonie neboli koloniformní jednotky (CFU - colony forming units), které vznikly z původních buněk, se poté dají spočítat. (Digirolamo *et al.*, 1999) Počítání probíhá buď automaticky pomocí automatického mikroskopu a analytického softwaru, nebo manuálně počítáním na mřížce. Díky své jednoduchosti má metoda široké využití hlavně v mikrobiologii.

3.2.2 Metody založené na detekci pomocí specifických protilátek

CellSearch®

Metoda CellSearch je v současnosti jedna z nejvíce využívaných metod pro detekci a následné zkoumání či porovnávání cirkulujících nádorových buněk. Je založena na expresi epitelového markeru EpCAM, který je nejčastěji přítomným markerem na povrchu nádorových buněk u kolorektálního karcinomu. Využívá se také exprese cytokeratinů (CK). (Hardingham *et al.*, 2015)

Metoda se provádí v 7,5ml zkumavce s periferní krví pacienta. Po oddělení krevních částic od krevní plazmy dochází k navázání ferrofluidních nanočástic na povrch epiteliálních buněk přítomných ve vzorku. Následně jsou CTCs magneticky odděleny od zbytku krevních částic a dochází k navázání protilátek EpCAM (případně CK) typických právě pro epiteliální buňky. Pomocí speciální protilátky (nejčastěji CD45) dojde k identifikaci kontaminujících leukocytů ve vzorku a přidá se fluorescenční barvivo DAPI, které zvýrazní jádra jak u CTCs, tak i u leukocytů. Poté je vzorek umístěn do magnetické komory, kde pomocí magnetické síly dojde k rozdělení buněk a následně je analyzován. CTCs, které jsou na rozdíl od leukocytů pozitivní na cytokeratin i DAPI, jsou identifikovány a mohou být dále zkoumány (viz Obr. 5). (podle www.cellsearchctc.com; Truini *et al.*, 2014)



Obr. 5: Technologický postup metody CellSearch pro rakovinu prsu (Truini *et al.*, 2014)

Čipy s protilátkou EpCAM

Jedná se o křemíkové mikročipy s desítkami tisíc pozic obsahujících protilátky vážící se na antigeny přítomné na povrchu nádorových buněk. Vznikem vazby mezi protilátkou a antigenem tedy dojde k zachycení celé buňky na čip. (Sequist *et al.*, 2009)

Plná krev pacienta je pneumaticky tlačena přes mikročip, na jehož povrchu jsou EpCAM protilátky, jejichž aktivita je navýšena přítomností tyčinek v příčném směru vzhledem k proudění krve. Přítomností těchto tyčinek dojde k maximalizaci interakce mezi nádorovými buňkami a EpCAM aktivním povrchem čipu. (Sequist *et al.*, 2009)

Maintrac

Metoda založená na mikroskopickém rozeznávání CTCs ve vzorku. Její hlavní výhodou oproti ostatním je zabránění jakéhokoliv poškození sledovaných buněk. Mezi další pozitiva patří, že jediným nutným preparačním krokem pro přípravu vzorku je centrifugace, při které dojde k oddělení lyzátu obsahujícího červené krvinky od zbytku vzorku.

Technika Maintrac také využívá označení živých nádorových buněk protilátkou EpCAM, která však slouží jako fluorescenční marker potřebný k identifikaci těchto buněk. Následně je ke vzorku přidán ještě propidium jodid, který označí pouze jádra živých buněk. Poté je vzorek zanalyzován automatickým fluorescenčním mikroskopem, který spočítá pouze žijící cirkulující nádorové buňky. (Pachmann *et al.*, 2008)

CellCollector ALS

Jednoduché laboratorní zařízení skládající se ze 160 mm dlouhého sterilního drátku se špičkou pokrytou protilátkami antiEpCAM, které jsou kovalentně navázány k atomům zlata a k tenké vrstvičce hydrogelu. CellCollectorem se vzorek získává z periferní krve zavedením do periferní žíly. Na drátek jsou po ukončení vyšetření naneseny fluorescenční protilátky a následné zkoumání mikroskopem slouží k odhalení možných CTCs, které jsou fluorescenčně označeny. (Saucedo-Zeni *et al.*, 2012)

3.2.3 Metody založené na rozdílných fyzikálních vlastnostech

Clear Cell FX[®]1 System

Jeden z prvních zcela automatizovaných systémů izolujících CTCs. Jedná se o spirálovité mikrofluidní zařízení, kdy se po vložení vzorku krve do přístroje oddělují krevní buňky a CTCs pomocí patentovaných CTChipů[®]FR na základě různé velikosti částic. Vzorek získaný na konci procesu ve zkumavce je obohacený o neporušené a živé cirkulující nádorové buňky a může být použit pro další klinická měření. (podle www.clearbridgebiomedics.com; Chudasama *et al.*, 2016)

ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumour Cells)

ISET je fyzikální metoda, která k vychytávání nádorových buněk využívá rozdílné velikosti CTCs a ostatních složek obsažených v krvi. K rozdělení dochází na základě řízené vakuové filtrace vzorku krve přes membránu s póry o daném průměru 0,8 mikrometru. CTCs díky své větší velikosti zůstanou zachycené na membráně, zatímco velikostně menší zbytek krevních částic projde přes ni. (Vona *et al.*, 2000)

Screen Cell[®]

Jedná se o jednoduché malé zařízení využívající neinvazivní technologii izolující CTCs ve vzorku plné krve na základě filtrace vzorku v krátkém čase. Možná kontrola CTCs, které prošly přes póry filtru pomocí EDTA umístěného za filtrem ve sběrné trubici. Výhodou je malá velikost a kompaktnost zařízení, jeho jednoduchost, používaný pufr, který je stabilní při pokojové teplotě a možnost negativní kontroly po ukončení měření. (podle www.screencell.com/technology; Nicolazzo *et al.*, 2018)

Parsotrix[™] Cell Separation Technology

Systém je prodáván ve formě kazety s mikrofluidním průtokem umožňující zachycení CTCs ze vzorku plné krve (1 až 40 ml) díky jejich rozdílné velikosti a deformaci buněk. CTCs mají na rozdíl od zdravých krevních buněk (hlavně červených a bílých krvinek) tužší cytoskelet a taky předvídatelnou velikost. CTCs pak zůstávají zachycené v kazetě na základě dobře zvolené velikosti otvorů. Na výběr je z mnoha druhů kazet s různou velikostí pórů. (podle www.angleplc.com; Joose *et al.*, 1015)

CytoTrack

Metoda založená na čtecím principu podobném CD/DVD technologii bez nutnosti předpřípravy vzorku. Vzorek je rozprostřen na speciálním skleněném disku, na který se vleze až 100 milionů buněk v jedné tenké vrstvě. Povrch disku je vysokou rychlostí (až 100 milionů buněk za minutu) skenován laserovým systémem a používaný software následně identifikuje všechny CTCs ve vzorku a zachytí přesnou pozici každé CTC na disku. Po prvotním zaměření proběhne u všech nalezených CTCs obrazová analýza a validace. Jednotlivé buňky je možné po jejich identifikaci selektivně odebrat z disku pro další měření (např. PCR). (podle www.cytotrack.com; Hillig *et al.*, 2015)

Rare Cyte

Přímá metoda izolace CTCs sestávající ze tří jednoduchých kroků. V prvním kroku se pomocí rychlé centrifugace oddělí buňky s jádrem od červených krvinek a krevní plazmy. Ve druhém kroku jsou cílové buňky mikroskopicky charakterizovány na základě použití šesti fluorescenčních kanálů. Poté mohou být ve třetím kroku jednotlivé označené CTCs zaměřeny a uvolněny ze vzorku pro další analýzy. (podle www.rarecyte.com; van der Toom *et al.*, 2016)

3.2.4 Metody nepřímé detekce CTCs

Polymerázová řetězová reakce (PCR – polymerase chain reaction)

PCR je dlouhodobě nejrozšířenější běžně používanou nepřímou metodou pro detekci CTCs využívající mnohonásobného zmnožení určitého úseku DNA přítomného právě u hledaných cirkulujících nádorových buněk ve vzorku, tzv. biomarkeru nádorových buněk. (viz kapitola PCR)

4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

PCR je velmi rozšířená in-vitro metoda používaná pro detekci DNA a RNA (případně jen jejich úseku) ve vzorku pomocí jejich amplifikace. Používá se převážně pro nukleové kyseliny do délky 2000 bází. (McPherson a Moller, 2006)

Metoda byla poprvé popsána Karym Mullisem už v roce 1971. Ale poprvé byla prakticky realizována v 80. letech 20. století, kdy byla ještě zdokonalena. K. Mullis za ni v roce 1993 obdržel Nobelovu cenu za chemii. (podle www.nobelprize.org)

Jde o soubor několika optimalizovaných reakcí, které na sebe plynule navazují a cyklicky se opakují do doby, než dojde některá z reakčních komponent. Zjednodušeně se jedná o amplifikaci teplotou denaturované zkoumané DNA od 3'-OH konce navázaného primeru pomocí termostabilního enzymu DNA polymerasy, která je schopna vytvořit nové vlákno DNA komplementární k původnímu DNA vláknu templátu. Obvykle tak vznikne několik milionů naprosto identických kopií původního templátu. (Šmarda *et al.*, 2005)

4.1 Jednotlivé kroky při měření PCR

Proces metody PCR probíhá v laboratoři v tzv. termocyklerech, které dokáží rychle zvyšovat a snižovat teplotu dle potřeby a tím urychlovat celý cyklus reakcí. Časové rozmezí doby jednoho cyklu se liší podle velikosti produktu. U většiny termocyklerů však trvá jeden celý cyklus jednu až dvě minuty. Cykly se opakují minimálně 30krát, aby došlo k dostatečné amplifikaci DNA.

V prvním kroku je DNA templát denaturován navýšením teploty na přibližně 94°C. Vlivem zvýšené teploty dojde k rozpletení dvoušroubovice DNA, a tedy ke vzniku dvou samostatných vláken.

Po rozpletení DNA se celý systém ochladí na teplotu specifickou pro nasedání primeru, tzv. annealingovou teplotu. Oligonukleotidové primery se na základě komplementarity bází naváží na již oddělená vlákna templátové DNA.

Třetím krokem je samotná polymerace, při které dochází k vytváření nového řetězce, který je komplementární k původní DNA pomocí enzymu DNA polymerasy. Dochází tak ke vzniku dvou nových identických řetězců z jednoho původního.

Z důvodu schopnosti DNA polymerasy přidávat nukleotidy pouze od 3'-OH konce řetězce, je v reakci potřeba přítomnosti specifického předem pečlivě zvoleného primeru, který nasedne na první nukleotid požadované sekvence a tím určí replikační počátek, odkud se začne syntetizovat nové vlákno nukleové kyseliny. (McPherson a Moller, 2006)

4.2 Komponenty PCR

Metoda PCR se skládá primárně z několika různých základních komponent zajišťujících vhodné podmínky, stavební materiál nově vznikajících vláken DNA, molekuly určující začátek replikace a enzym syntetizující nový řetězec. Každá komponenta plní svou určitou roli v cyklu jednotlivých po sobě jdoucích reakcí a je nezbytná pro správný průběh celé reakce.

DNA templát

Templát je původní vzorek DNA obsahující cílovou sekvenci, která je předmětem zkoumání. V důsledku působení vysoké teploty na začátku první reakce cyklu dochází k narušení vodíkových můstků templátu a posléze k rozpletení původní dvoušroubovice a vzniku dvou samostatných vláken. (McPherson a Moller, 2006)

Enzym polymerasa

DNA polymerasa je enzym schopný syntetizovat na základě komplementarity vazeb nové vlákno DNA z požadované sekvence. Nejčastěji se pro účely PCR používá Taq DNA polymerasa, která pochází z bakterie *Thermus aquaticus* vyskytující se hlavně v horkých vulkanických vřídlech. Tato polymerasa má největší syntetickou aktivitu při teplotě 80°C. Při vyšších teplotách dochází k denaturaci. Další méně používanou polymerasou je Pfu DNA polymerasa získávaná z termorezistentní bakterie *Pyrococcus furiosus*. Společným důležitým znakem obou těchto polymeras je jejich stabilita při vysokých teplotách, které jsou pro průběh PCR potřebné. (Chien *et al.*, 1976; Kim *et al.*, 2008)

Primery

Primery jsou krátké (obvykle obsahují maximálně 30 bází), předem připravené úseky jednovláknové DNA, které musí být komplementární s požadovanou sekvencí nukleotidů ve zkoumané DNA, jenž se má amplifikovat. Používají se v párech z důvodu syntetizování nových vláken na obou vláknech původní DNA (forward a reverse primer). Primer je důležitý pro nastartování celého procesu syntetizování nového vlákna DNA polymerasou. DNA polymerasa začíná syntetizovat nový řetězec na konci již navázaného primeru. Z toho důvodu je třeba, aby byl primer vhodně zvolený a tím spustil replikaci v požadovaném úseku DNA. (Farrell, 2010)

Nukleotidy

Používané dNTPs (deoxynukleotidtrifosfáty) jsou složeny z jednotlivých bází (adenin, thymin, cytosin a guanin) deoxyribosy a tří fosfátových skupin. V reakci slouží jako hlavní stavební jednotky pro enzym DNA polymerasu, která z nich syntetizuje nový DNA řetězec. (McPherson a Moller, 2006)

Stabilizátory prostředí

Dissolvané hořečnaté (Mg^{2+}) ionty, které vytváří ideální prostředí pro probíhající reakci polymerace. Jejich optimální koncentrace se stanovuje vždy experimentálně zvlášť pro každou novou metodu PCR. (Brown, 2001)

4.3 qPCR/Real-time PCR

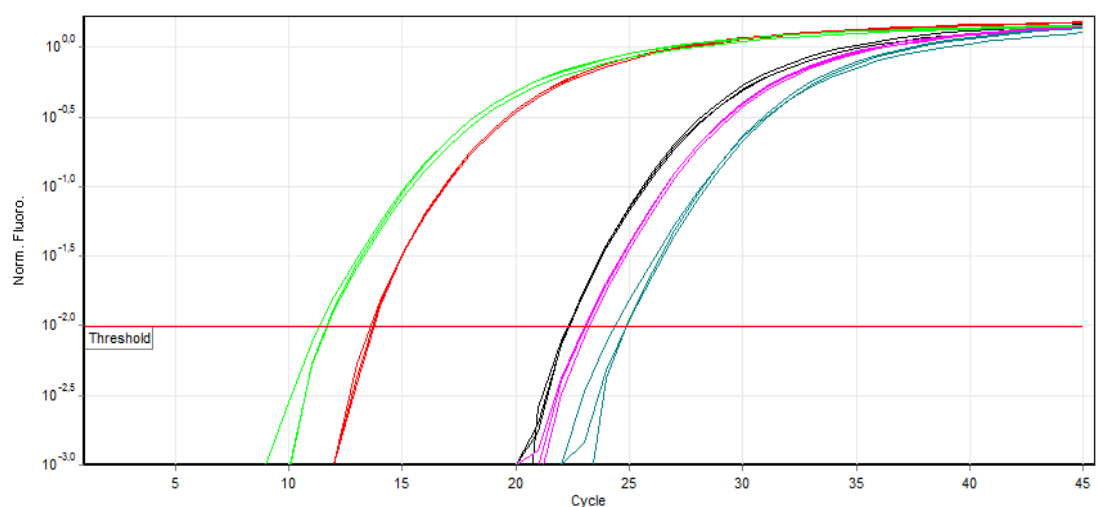
Quantitative /Real-time PCR je díky své přesnosti měření, snížené možnosti kontaminace z důvodu minimální manipulace se vzorkem a vysoké senzitivě jedna z nejvíce používaných technik PCR. Užití v praxi našla především v genetických analýzách a v RNA kvantifikaci.

Metoda sleduje narůstající emisi fluorescence způsobenou amplifikací DNA v reálném čase. Na nově syntetizované úseky DNA, vznikající po každém provedeném cyklu PCR, se váže fluorescenční barvivo typu SYBRGreen, EvaGreen nebo DNA próba s fluorescenční značkou. Vzhledem k nižší ceně se upřednostňuje použití nespecifických

fluorescenčních barviv vážících se na dvouvláknovou DNA před specifickými DNA próbami.

qPCR se dá považovat za metodu poskytující kvalitativní i kvantitativní výsledky měření. Kvalitativním výsledkem je důkaz přítomnosti či absence hledaného úseku DNA. Jako kvantitativní výsledek je brána míra naměřené fluorescence u zkoumaného vzorku.

Pro qPCR se používá zařízení zvané termocykler. Součástí každého termocykleru je integrovaný zdroj světla pro osvětlení vzorku (žárovka, laser, nebo LED dioda), který je schopný po dokončení cyklu osvětlit každý vzorek paprskem světla o přesně dané vlnové délce zvolené podle použitého fluorescenčního označení DNA, dále systém pro detekci emitovaného záření fluorescenčně značené DNA nebo fluorimetr a vhodný software schopný ukázat zaznamenanou změnu fluorescence ve formě amplifikační křivky (viz Obr. 6). (Navarro *et al.*, 2014)



Obr. 6: Graf RT-PCR sledující emitované záření po označení vzorku pomocí barviva SYBR™ Green (wikipedia.org, Filutowska, 2013)

4.4 RT-PCR (Reverzně-transkriptázová PCR)

Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (reverse transcription PCR) se využívá pro detekci RNA, kterou je potřeba převést z důvodu její malé stability na komplementární cDNA. (Farrell, 2010)

Celá metoda se sestává ze tří hlavních kroků. V prvním kroku se matriční RNA templát převádí na jednovláknovou komplementární DNA (cDNA) při teplotě mezi 40 až 50°C podle zvoleného enzymu, nejčastěji za pomoci enzymu MMLV izolovaného z Moloneyho viru myší leukémie, případně enzymu AMV odvozeného z viru ptačí myeloblastosy. Ve druhém kroku je takto připravená cDNA denaturována při teplotě cca 95°C. Ve třetím kroku potom dochází k navázání primeru a k následné amplifikaci pomocí PCR. (Bustin 2000; Farrell, 2010; Šmarda *et al.*, 2005)

Při reverzní transkripci je třeba dbát na možnou kontaminaci vzorku. Ta by při následném měření velice senzitivní metodou PCR mohla způsobit falešně pozitivní výsledek, jenž by znehodnotil všechny připravené vzorky. Z tohoto důvodu se ke každému setu vzorků připravených k měření přidává negativní kontrola, která by měla zaručit čistotu reagensů, případně svou pozitivitou během PCR poukázat na její možnou kontaminaci. (Farrell, 2010)

Existují dvě běžně používané variace RT-PCR - one-tube a two-tube. Při one-tube technice se provádí reverzní transkripce i PCR v jedné jediné zkumavce. V případě použití two-tube se používají pro reverzní transkripci a PCR dvě různé zkumavky. Hlavní výhodou one-tube varianty je snížení rizika kontaminace. Pro two-tube variantu je přední výhodou možnost uchování cDNA jakožto meziprojektu reverzní transkripce. (Bustin 2000)

4.5 Real-time RT-PCR

Metoda real-time reverzně-transkriptázová PCR je založená na pozorování vývoje množství produktu vznikajícího během PCR v reálném čase za pomoci detekce fluorescenčního signálu ve speciálním termocykleru. Tomuto měření předchází přepis mRNA do cDNA za pomoci reverzní transkriptázy.

Ke značení se používají molekuly (fluorofory), které absorbují světlo o určité vlnové délce a emitují světlo jiné vlnové délky. (Šmarda *et al.*, 2005)

4.5.1 Detekce produktů vznikajících při Real-time PCR

4.5.1.1 DNA vazebná fluorescenční barviva

Tato barviva ve volném stavu vyzařují pouze malou fluorescenci. Během prodlužování řetězce DNA se ale velká část volného barviva naváže na novou dvoušroubovici DNA a zaznamenávaný fluorescenční signál se významně zvýší. Obecně během polymerace dochází ke zvýšení fluorescenčního signálu a během denaturace se síla tohoto signálu zmenšuje. (Bustin 2000, Šmarda *et al.*, 2010)

SYBR[®] Green

Kyanidové barvivo vážící se na DNA a v menší míře i na RNA. Slouží k fluorescenčnímu označení nukleových kyselin. Po navázání tento komplex DNA-barvivo absorbuje záření v oblasti UV spektra o vlnové délce $\lambda_{\max} = 494$ nm a emituje záření o přibližné vlnové délce $\lambda_{\max} = 524$ nm. (Zipper *et al.*, 2004) Toto barvivo patří díky rychlosti jeho navázání na nově vzniklou DNA, jeho citlivosti při měření fluorescence a nízké ceně na jeden vzorek mezi nejčastěji používanými fluorescenčními značkami v PCR. (Ponchel *et al.*, 2003). V současnosti dochází vzhledem k prokázané toxicitě k nahrazování tohoto barviva environmentálně šetrným barvivem EVAGreen[®]. (podle www.biotium.com)

EVAGreen®

Vysoce stabilní, na DNA se vázající fluorescenční barvivo používané hlavně v kvantitativní real-time PCR a k post-PCR analýze teploty tání DNA. Hlavní absorpční peak při vzniku komplexu s DNA má vlnovou délku $\lambda_{\max} = 500$ nm. Komplex DNA-barvivo emituje záření o vlnové délce $\lambda_{\max} = 530$ nm. (Mao *et al.*, 2007)

Ethidium bromid (EtBr)

Běžně používané fluorescenční barvivo, jehož vodný roztok má absorpční maxima o vlnové délce $\lambda_{\max} = 210$ a 285 nm a emituje záření o vlnové délce $\lambda_{\max} = 605$ nm. (Higuchi *et al.*, 1992) Jeho používání bývá značně omezeno kvůli jeho prokázané mutagenitě, kdy vlivem EtBR může docházet k vážnému a nenávratnému poškození mitochondriální DNA. (Luo *et al.*, 2013)

4.5.1.2 DNA próby

Hydrolytické próby

Speciální oligonukleotidy s navázanou fluorescenční částí na 5'konci a se zhášečem na 3'konci. Fluorofor je prostorově překrýván zhášečem, který zabraňuje vyzařování fluorescence. Během elongace je próba štěpena pomocí Taq DNA polymerasy. Rozštěpením dojde k oddálení fluoroforu a zhášeče, čímž dojde k vyzáření měřitelné fluorescence. (Bustin 2000)

V současnosti je nejvíce používanou proubou dvojitě označená TaqMan próba. (Mao *et al.*, 2007) Její hlavní nevýhodou je poměrně vysoká cena. (Ponchel *et al.*, 2003)

Hybridizační próby

Pro maximalizaci specifity metoda využívá dvě hybridizační próby. Jedna próba nese na svém 3'konci fluoresceinový donor, který po excitaci emituje zelené fluorescenční světlo. Toto emisní spektrum je přijímáno fluoroforem navázaným na 5'konec druhé próby. Excitací donoru dochází k přenosu fluorescenční rezonanční energie na akceptor. Následně je emitováno červené fluorescenční světlo. Výsledkem je tedy fluorescenční signál, který je výsledkem hybridizace dvou na sobě nezávislých proub na odpovídající cílovou sekvenci. (Bustin, 2000)

Vlásenkové próby obsahující zhášec

Próby se specifickou sekundární strukturou vlásenky stočené do smyčky. Na koncích této próby je navázaný zhášec (5' konec) a fluorofor (3' konec), které jsou smyčkovitou strukturou drženy u sebe. Zhášec takto překrývá fluorofor a není možné pozorovat žádnou fluorescence. Po navázání na komplementární cílový úsek DNA dojde otevřením smyčky k oddělení zhášec od fluoroforu a může být naměřena fluorescence. (Bustin, 2002)

DNA primer-próby

Molekuly oligonukleotidů kombinující v sobě zároveň próbu a primer. Dělí se do tří skupin: harpiny, cyclicony a Angler[®] primer-próby. Dle použité primer-próby se emitovaná fluorescence měří buď během denaturace nebo během prodlužovacího procesu qPCR. Nevýhodou označení pomocí primer-próby je možnost amplifikace nescifických produktů během PCR. Z toho důvodu se doporučuje udělat křivku tání pro zjištění efektivity reakce. (Navarro *et al.*, 2014)

4.6 Specifické markery používané k detekci CTCs u CRC

4.6.1 EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule)

Transmembránový glykoprotein, který se díky své nadměrné expresi u rychle se rozšiřujících epiteliálních karcinomů používá jako obecný biomarker pro různá nádorová onemocnění vyjma nádorů mesodermálního a ektodermálního původu (to znamená neurogenetických nádorů, sarkomů a lymfomů a melanomů). (Trzpis *et al.*, 2007)

Přímo u kolorektálního karcinomu je exprese tohoto markeru velmi výrazná a snadno pozorovatelná. Z toho důvodu se jeho přítomnosti obvykle využívá jako potenciálního diagnostického a terapeutického cíle. V opravdu výjimečných případech může být exprese tohoto proteinu částečně potlačena. To se může stát například v případě, kdy má pacient CRC asociovaný s Lynchovým syndromem. (Kim *et al.*, 2016)

4.6.2 CEA (Carcinomembrionic antigene)

CEA geny jsou velká rodina genů patřící do skupiny imunoglobulinů dělicí se na dvě skupiny – CEACAMs (Cell adhesion molecules) a CEAPSGs (Pregnacy-specific glycoproteins). Zatím co PSGs jsou exprimovány pouze v placentálních trofoblastech, CEA-CAMs jsou geny vylučované mnoha různými buňkami a jejich zvýšená exprese může značit přítomnost nádorového onemocnění v těle. (Pavloupoulou a Scorilas, 2014)

4.6.3 CK 20 (Cytokeratin-20)

Cytokeratin je protein, který patří mezi nejběžněji se vyskytující detekovatelný marker u gastrointestinálních epiteliálních buněk. Detekce jeho mRNA pomocí metody RT-PCR je podle článku Hinze a kolektivu možná v celých 97 % případech nádorů tlustého střeva a konečníku. Avšak pro detekci CTCs pomocí exprese CK20 není tento protein dostatečně prognostický a proto se v praxi spíše využívá pro sledování reakce pacienta na nově nasazenou chemoradioterapii. (Hinz *et al.*, 2017)

4.6.4 EGFR (Epidermal growth factor receptor)

Je tyrosin-kinasový transmembránový receptor často používaný jako nádorový marker, neboť je vylučován u různých nádorových onemocnění. V případě kolorektálního karcinomu je to v 60 až 80 % případech. EGFR je významný gen při vývoji a růstu nádoru. Proto se často používá při terapiích, které přímo blokují tento receptor a tím zpomalují, nebo rovnou brání v dalším rozvoji karcinomu. (Sforza *et al.*, 2016)

IV. Experimentální část

1 METODIKA

1.1 Kultivace a značení nádorových buněk

Instrumentace

Biologický materiál

Buněčná linie HT-29, leukocyty z buffy coatu (krevní konzerva)

Použité chemikálie

McCoy's 5A medium (Sigma Aldrich, USA), 10% fetální bovinní sérum (FCSI; Sigma Aldrich, USA), penicilin (PNC) a streptomycin (STM) (Sigma Aldrich, USA), 200Mm L-glutamin, 1% PBS (phosphate buffered salin), 1% paraformaldehyd, krystalová violet', deionizovaná voda, lyzační roztok, trypanová modř, TrypLE Reagents (ThermoFischer Scientific, USA), TRI Reagent (MRC, USA)

Přístroje a vybavení laboratoře

FlowBox, Inkubátor, mikroskop, Průtokový cytometr, Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter, USA), centrifuga, lednice, mrazák, kultivační lahve 75 cm² a 175 cm² (TPP, Švýcarsko), misky s plochým dnem (Falcon, USA), Bürkerova komůrka, krycí sklo, pipety a špičky (Eppendorf, Německo), 50ml kónické zkumavky se šroubovacím víčkem tzv. falkony (TPP, Švýcarsko), sterilní 25ml injekční stříkačky, jehly

Postup

Kultivace buněk

- 1) Nádorové buňky buněčné linie HT-29 byly rozmraženy a následně promyty 10 ml McCoyova kultivačního média obsahujícího L-Glutamin, 10% FCSI a STM+PCN, poté byly centrifugovány 5 min při 1400 rpm, supernatant byl odstraněn a peletka byla resuspendována cca v 10 ml média. Buňky byly přelity do střední (75 cm²) kultivační lahve a inkubovány při 37 °C a 5% obsahu CO₂.
- 2) Po 24 hodinách byl stanoven mikroskopický obraz a bylo vyměněno kultivační médium.
- 3) Po dalších 24 hodinách byly buňky zpasážovány pomocí 2 ml TrypLE a rozděleny do dvou velkých (175 cm²) kultivačních lahví.

Příprava buněk na experiment

- 4) Buňky byly kultivovány, dokud neporostly 75-80 % plochy kultivačních lahví. Poté byly zpasážovány a přelity do dvou 50ml falkon.
- 5) Obě falkony byly zcentrifugovány 5 min při 1400 rpm, supernatant byl slit a buňky promyty 1% PBS, poté byly buňky znovu zcentrifugovány a supernatant slit.
- 6) Jedna peleta byla resuspendována v kultivačním médiu, druhá v 1% PBS. Z obou bylo odpipetováno 500 µl do speciálních zkumavek. Ty byly vloženy do přístroje ViCELL, pomocí kterého byl spočítán počet živých buněk a celkový počet buněk ve vzorku.

Příprava leukocytů

- 7) Z buffy coatu bylo pomocí sterilní 25ml injekční stříkačky odsáto 20 ml krve a ta byla rozaliquotována po 5 ml do čtyř 50ml falkon.
- 8) Každá falkona byla doplněna do 45 ml lyzačním roztokem, protřepáním zamíchána a erytrocyty byly lyzovány na dně chlazené centrifugy po dobu cca 10 min. Poté byly falkony stočeny 5 min při 4500 rpm a 4 °C.
- 9) Supernatant byl vylit a peletka resuspendována ve 45 ml lyzačního roztoku a opět byl vzorek cetrifugován 5 min při 4500 rpm a 4 °C. Supernatant byl slit a peletka resuspendována ve 20 ml 1% PBS a centrifugována 5 min při 4500 rpm a 4 °C. Tento krok byl opakován 2x. Nakonec byly peletky ve dvou zkumavkách resuspendovány

ve 20 ml 1% PBS a vzorky byly slity do jedné 50ml falkony, druhé dvě peletky byly resuspendovány ve 20 ml kultivačního média a také byly slity do jedné 50ml falkony. Z obou falkon bylo odebráno 500 µl do speciálních zkumavek a buňky byly spočítány pomocí přístroje ViCELL Cell Viability Analyzer.

Koloniformní test

- 10) Do 6 jamkových kultivačních desek bylo napipetováno cca 2 ml kultivačního média do každé jamky.
- 11) Buňky byly resuspendovány v médiu, 100x naředěny a napipetovány do speciálních zkumavek určených pro průtokový cytometr.
- 12) Pomocí průtokového cytometru byly buňky nasortovány do jednotlivých jamek a poté k nim byly připipetovány leukocyty na základě potřebného ředění (viz tab. 1), každá destička pro jedno ředění.

Tab. 1: Použité ředění buněk HT-29 a leukocytů pro koloniformní test

Výsledné ředění	1:1 000 000	1:500 000	1:200 000	1:100 000	1:50 000	1: 20 000	1:10 000	1:5 000
Počet HT-29	10	20	50	10	20	50	100	200
Počet leukocytů	10 000 000	10 000 000	10 000 000	1 000 000	1 000 000	1 000 000	1 000 000	1 000 000

- 13) Destičky byly vloženy do inkubátoru a kultivovány 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂.
- 14) Po 24 hodinách byly odpipetovány leukocyty, jamky byly promyty 1% PBS a do jamek bylo napipetováno cca 3 ml čerstvého kultivačního média. Buňky byly ponechány inkubovat 14 dní při 37 °C a 5% CO₂. Dle potřeby bylo vyměněno médium.
- 15) Po 14 dnech bylo odstraněno kultivační médium, narostlé kolonie byly 2x promyty 1% PBS a byly zafixovány 1% paraformaldehydem.
- 16) Kolonie byly opět 2x promyty 1% PBS, aby byly odstraněny zbytky paraformaldehydu.
- 17) Do každé jamky bylo napipetováno cca 200 µl 0,1% roztoku krystalové violeti v ethanolu a byla ponechána působit 15 min. Poté byl roztok odpipetován do speciálního odpadu a destičky byly promyty pod tekoucí vodou, dokud se zbytky barvy nevyomyly.
- 18) Destičky byly ponechány schnout a následně byly spočítány narostlé kolonie v jednotlivých jamkách.

Příprava TRIzolových lyzátů pro PCR analýzu

- 19) Buňky HT-29 resuspendované v 1% PBS byly postupně naředěny na tisíce, stovky a desítky buněk do několika falkon. Pro ověření bylo každé ředění přepočítáno v Bürkerově komůrce.
- 20) Byly připraveny 1,5ml mikrozkušavky (6 pro každé ředění) a následně popsány příslušným ředěním. Do každé z nich bylo napipetováno 10 000 000 leukocytů resuspendovaných v 1% PBS a příslušný počet buněk HT-29 v PBS (viz tab. 2). Do 6 mikrozkušavek bylo napipetováno pouze 10 000 000 leukocytů jako negativní kontrola.

Tab. 2: Použité ředění buněk HT-29 a leukocytů pro PCR

Výsledné ředění	Leuko	1:1 000 000	1:500 000	1:200 000	1:100 000	1:50 000	1: 20 000	1:10 000	1:5 000
Počet HT-29	0	10	20	50	100	200	500	1000	2000
Počet leukocytů	10 000 000	10 000 000	10 000 000	10 000 000	10 000 000	10 000 000	10 000 000	10 000 000	10 000 000

- 21) Buňky byly centrifugovány 4 min při 4000 rpm, byl odstraněn supernatant a následně byly buňky resuspendovány v 1 ml TRI reagentu. Vzorky byly zamrazeny při -20 °C až do izolace RNA.

1.2 Izolace RNA

Stanovení genové exprese metodou reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) je založeno na izolaci RNA z buněk pacienta, reverzní transkripci a následné PCR analýze.

Instrumentace

Materiál

TRI reagent (Sigma-Aldrich, USA), inhibitor RNAsin ribonukleasa (Promega, USA), RiboPure Kit (Ambion, USA), Isopropanol, chloroform a ethanol (Sigma/Serva, Německo), DEPC ošetřená voda (Ambion, USA), zkumavky typu Eppendorf 1,7ml a

2ml, LoBind zkumavky (Eppendorf, Německo), epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Německo), sterilní skleněné homogenizační kuličky, Tris-HCl, pH 8,1 (Tris-Hydrochlorid, Sigma, T3253, Německo), EDTA (disodium salt, Serva, 11280, Německo) proteináza K (20mg/ml, BioLabs, P8102S, USA), špičky, buničina

Přístroje

Laminární box (BioAir, USA), kombinovaná chladnička (Gorenje, Slovinsko), vortex Genie (Scientific Industries, USA), minicentrifuga (Eppendorf, Německo), Thermal Cycler PTC 100 (MJ Research, Kanada), chlazená centrifuga (Hermle, Německo), termoblok (Eppendorf, Německo), váhy (Scaltec, USA), homogenizátor Mixer Mill 300 (Retsch, Německo), SpeedVac Eppendorf 5031 (Eppendorf, Německo), Nanodrop ND 1000 (Nanodrop, USA)

Postup

Pro izolaci RNA byla použita fenol-chloroformová metodika, komerční chemikálie TRI reagent (MRC), což je směs guanidinu thiokyanátu a fenolu. Ke směsi byl přidán chloroform a následně byla při centrifugaci směs rozdělena do tří fází. Horní vodná fáze obsahovala RNA, interfáze DNA a spodní organická fáze obsahovala DNA a proteiny. Je tedy možné touto metodou současně izolovat DNA a proteiny.

Při použití 1 ml TRI reagentu je možné izolovat RNA z 30-100 mg tkáně a z 5-11 milionů buněk. Typické jsou potom u tkání výtěžky v rozsahu 1-10 μg RNA/mg tkáně, u epiteliálních kultivovaných buněk 8-15 μg RNA/ 10^6 buněk a u krve 3 μg RNA/1 ml krve.

- 1) Byla zkontrolována teplota termobloku (60 °C) a centrifuga byla vychlazena (4 °C).
- 2) První byly připraveny vzorky určené k izolaci. Použity byly čerstvé nebo zamražené buněčné TRI lyzáty, jenž byly připraveny z buněčné linie HT-29 a leukocytů (viz výše), rozmrazení probíhalo při 4°C cca 15 min.
- 3) Vzorky TRI lyzátů v 1,5ml zkumavkách byly ponechány 5 min ve flowboxu při pokojové teplotě, aby mohla proběhnout kompletní disociace nukleoproteinů,

potom bylo ke vzorku přidáno 200 μ l chloroformu a vzorek byl silně zvortexován (cca 30 s). Vzorek byl opět nechán stát 10 min při pokojové teplotě.

- 4) Byl naředěn ethanol na koncentraci 75 % v množství dle vzorku (1,5 ml na vzorek + rezerva) a poté byl nechán zchladnout.
- 5) Vzorky byly centrifugovány 15 min při otáčkách 12 000g a teplotě 4 °C (probíhá separace fází), byly nachystány a popsány 1,7ml zkumavky.
- 6) Po stočení byly ve spodní růžové vrstvě obsaženy detrit, lipidy a proteiny, v prostřední mezivrstvě se nacházel prstenec DNA a v horní, vodné čiré vrstvě byla obsažena RNA.
- 7) Přibližně 500 μ l vrchní vodné fáze obsahující RNA bylo opatrně po částech přeneseno do čisté zkumavky a ke vzorku bylo přidáno stejné množství isopropanolu, jako bylo v předchozím kroku sebráno vodné fáze, tedy 400–500 μ l. Krátkým opakovaným protřepáním (2x – 4x) byly následně obě vrstvy promíchány (nesmí zůstat mléčný prstenec).
- 8) Vzorky byly ponechány stát 5 min při pokojové teplotě, probíhala precipitace RNA.
- 9) Chloroform a TRI reagent byl zlikvidován vlitím do láhví pro nebezpečný odpad.
- 10) Opět byl vzorek zcentrifugován 10 min při 12 000 g a 4 °C (na dně zkumavky by se měla vytvořit bílá popř. průhledná RNA peletka).
- 11) Supernatant byl opatrně odstraněn a RNA peletka byla pomyta 1,5 ml 75% ethanolu, poté byla peletka převrácením zkumavky jemně odlepena.
- 12) Vzorky byly zcentrifugovány 5 min při 12 000 g, 4 °C.
- 13) Supernatant byl odstraněn a peletka byla usušena na vzduchu ve flow-boxu po dobu cca 3-10 min (nesmí se nechat vysušit moc, byla by potom špatně rozpustná), peletka během sušení zprůhlední.
- 14) K RNA peletě bylo přidáno cca 25 μ l DEPC treated vody (21–60 μ l podle velikosti peletky), obsah byl několikrát propipetován (v závislosti na množství RNA může být množství DEPC treated vdy až 300 μ l).
- 15) Rozpuštění RNA bylo urychleno zahřátím vzorku na 60 °C po dobu 10 min, poté byla RNA ochlazená v chladícím stojanu.
- 16) Postupně byla změřena čistota a koncentrace všech vzorků obsahujících RNA na přístroji Nanodrop ND 1000.
- 17) Rozpuštěná RNA byla uchovávána krátkodobě při -18 až -30 °C, dlouhodobě při -70 °C až -80 °C.

1.3 Reverzní transkripce

Instrumentace

Materiál

Náhodné primery (Promega, USA), inhibitor RNAsin ribonukleasa (Promega, USA), deoxyribonukleotidové trifosfáty (Promega, USA) (poznámka: připraveno jako 10mM dNTPs ze 100mM dCTP, dGTP, dTTT, dATP: příprava: 4x0,1ml jednotlivých zásobních nukleotidů doplněno DEPC vodou do 1ml), RevertAidH Minus M-MuLV Reverse transkriptáza (ThermoFisher Scientific, USA), DEPC ošetřená voda (Ambion, USA), 0,2ml Thermo-Tube (ABgene, Velká Británie), ep Dualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Německo)

Přístroje

Laminární box (BioAir, USA), kombinovaná chladnička (Gorenje, Slovinsko), Vortex Genie (Scientific Industries, USA), minicentrifuga (Hanil, Jižní Korea), Thermal Cycler PTC 100 (MJ Research, Kanada)

Postup

Chemikálie byly uchovávány při -18 až -30 °C. Před začátkem práce byly rozmrazeny v lednici 10mM dNTP's, 5x RT pufr, hexamery, DEPC treated vodu. Po rozpuštění byly krátce a na poloviční výkon zvortexovány. RNAsin a RTasa byly přidávány přímo z mrazáku.

- 1) Reverzní transkripce byla provedena ze 3 µg vyizolované celkové RNA v reakčním objemu 30 µl.
- 2) Do vychlazeného stojánku byly připraveny 0,2ml zkumavky, zkumavky byly popsány a v pořadí do nich byla pipetováno voda, RNA a náhodné hexamery. Následně bylo napipetováno množství RNA odpovídající 3 µg RNA (třeba promíchat špičkou před pipetováním), 0,3 µg hexamerů a byla doplněna voda do objemu 19,5 µl. Vzorek byl krátce zvortexován a stočen na poloviční výkon.

- 3) Vzorky byly inkubovány v termocykléru s vyhříváním víčkem při 70 °C po dobu 5 min. Poté byly rychle zchlazeny v chladícím stojanu po dobu cca 1 min.
- 4) Mezitím byla připravena reakční směs (MasterMix). Do 0,2ml zkumavky bylo napipetováno 6 µl 5x RT pufri, 3 µl 10 mM dNTP a 30 U RNAsinu. Množství na jeden vzorek bylo pro transkripci 3 µg RNA ve 30 µl. Vzorek byl krátce zvortexován na poloviční výkon a poté stočen.
- 5) Ke zchlazenému vzorku RNA s hexamery a vodou bylo přidáno 9,75 µl MasterMixu, vzorek byl promíchán špičkou a nechán stát 5 min při pokojové teplotě, např. ve flowboxu. Čas byl měřen od přidání MasterMixu k prvnímu vzorku.
- 6) Zkumavky byly poté rovnoměrně naskládány do termocykléru a inkubovány s vyhříváním víčkem při teplotě 42 °C po dobu 60 min a poté 10 min při 70 °C a následně došlo ke zchlazení programu termocykléru na 4 °C.
- 7) Na zkumavky byly nalepeny štítky, vzorky byly krátce stočeny a uloženy do mrazáku. Vzorky byly skladovány krátkodobě při -18 až -30 °C, dlouhodobě při -70 °C až -80 °C.

1.4 Real-time PCR

Polymerázová řetězová reakce s detekcí v reálném čase (real-time PCR) je enzymatická reakce umožněná primery, specifickou fluorescenčně značenou sondou a termostabilní DNA-polymerázou. Průběh reakce je snímán termocyklérem v reálném čase na základě změn fluorescence. Po přidání standardů k reakci a vytvoření kalibrační křivky, lze hodnotit množství specifické vyšetřované sekvence ve vzorku.

Ke každé polymeráze je dodáván reakční pufr o vhodném složení. Pro každou sadu primerů je testována optimální koncentrace hořčičných iontů. Pro reakci je výhodné použít DNA-polymerázu s tzv. „HotStartem“, pro jejíž aktivaci je nutné 10 až 15minutové zahřívání na 90–95 °C.

1.4.1 Použité primery a próby jednotlivých markerů

Primery jsou krátké oligonukleotidy (o délce cca 20 bp), které vymezují amplifikovaný úsek DNA. Specifická hydrolyzační TaqMan próba je krátký oligonukleotid značený fluorescenční barvou a zhášečem. Syntéza primerů a prób dle vlastního návrhu je prováděna firmou Generi Biotech, s.r.o. (Hradec Králové, CZ). Teplota nasedání primerů je orientačně vypočítána z nukleotidového složení anásledně experimentálně ověřena přioptimalizací amplifikačního cyklu.

Všechny primery a próby jsou dodávány v lyofilizovaném stavu, primery jsou OPC čištěny, zásobní roztoky mají koncentraci 0,1 mM, tj. 100 pmol v 1 μ l.

1.4.1.1 EpCAM

	Sekvence (5' - 3')	Velikost
EpCAM 3:	aaacacaaagcaagagaaaaacct	24bp
EpCAM 4:	aattttggatccagttgataacg	23bp
EpCAM probe:	ttgcggactgcacttcagaagga	23bp
Produkt EpCAM:		95bp

Ředění primerů a próby:

Próba EpCAM probe

Duálně značená próba typu TaqMan je označena hexachlorofluoresceinem (HEX), který je zhášen quencherem BHQ1; na přístroji se zvolí kanál JOE nebo přímo excitační vlnová délka 530 nm a emisní vlnová délka 556 nm. Próba je HPLC čištěna.

Pracovní koncentrace je 1,25 μ M, tj. 4 μ l obsahují 5 pmol próby.

Ředění: 5 μ l zásobního 0,1mM + 395 μ l H₂O = 400 μ l 1,25 μ M pracovního roztoku

Primery EpCAM 1, EpCAM 2

Pracovní koncentrace je 0,005 mM, tj. 1 μ l obsahuje 5 pmol primeru.

Ředění: 15 μ l zásobního 0,1mM + 285 μ l H₂O = 300 μ l 0,005mM pracovního roztoku

Tab. 3: Složení reakční směsi pro real-time PCR s markerem EpCAM

Reakční objem: 25 μ l	Objem	Koncentrace	Konc. na 1 reakci	Konečná koncentrace
EpCAM 1	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
EpCAM 2	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
EpCAM probe	4 μ l	1,25 μ M	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 μ l	10 mM	5 nmol	200 μ M
Taq	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg ²⁺	5,5 μ l	25 mM	137,5 nmol	5,5 mM
Pufr	2,5 μ l	10x	1x	1x
cDNA	1 μ l	0,1 μ g cDNA/ μ l	100 ng	4 ng/ μ l
H ₂ O	7,3	/	/	/

Průběh PCR cyklování:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA

96 °C / 15 minut

2. krok: amplifikace - dvoukroková

95 °C / 15 vteřin - 59 °C / 15 vteřin

snímání v kanálu JOE při 59 °C

1.4.1.2 EGFR

	Sekvence (5'-3')	Velikost
EGFR sense:	acttcaaaaactgcacctccat	22bp
EGFR antisense:	aatcagcaaaaaccctgtgatt	22bp
EGFR probe:	acatcctgccggtggcatttagg	23bp
Produkt EGFR:		149bp

Ředění primerů a próby:

Próba EGFR probe

Duálně značená próba typu TaqMan je označena hexachlorofluoresceinem (HEX), který je zhasen quencherem BHQ1; na přístroji se zvolí kanál JOE nebo přímo excitační vlnová délka 530 nm a emisní vlnová délka 556 nm. Próba je HPLC čištěna.

Pracovní koncentrace je 1,25 μM , tj. 4 μl obsahují 5 pmol próby.

Ředění: 5 μl zásobního 0,1mM + 395 μl H₂O = 400 μl 1,25 μM pracovního roztok

Primery EGFR

Pracovní koncentrace je 0,005 mM, tj. 1 μl obsahuje 5 pmol primeru.

Ředění: 15 μl zásobního 0,1mM + 285 μl H₂O = 300 μl 0,005mM pracovního roztoku

Tab. 4: Složení reakční směsi pro real-time PCR s markerem EGFR

Reakční objem: 25 μl	Objem	Koncentrace	Konc. na 1 reakci	Konečná koncentrace
EGFR sense	2 μl	0,005 mM	10 pmol	400 nM
EGFR antisense	2 μl	0,005 mM	10 pmol	400 nM
EGFR probe	4 μl	1,25 μM	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 μl	10 mM	5 nmol	200 μM
Taq	0,2 μl	5 U/ μl	1 U	0,04 U/ μl
Mg ²⁺	3 μl	25 mM	75 nmol	3 mM
Pufr	2,5 μl	10x	1x	1x
cDNA	1 μl	0,1 μg cDNA/ μl	100 ng	4 ng/ μl
H ₂ O	9,8 μl	/	/	/

Průběh PCR cyklování:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA

96 °C / 15 minut

2. krok: amplifikace - dvoukroková

95 °C / 15 vteřin - 62 °C / 15 vteřin

snímání v kanálu JOE při 62 °C

1.4.1.3 CEA

	Sekvence (5'-3')	Velikost
CEA 3:	taagtgttgaccacagcgacc	22bp
CEA 4:	gttcccatcaatcagccaagaa	22bp
CEA probe:	atgtcctctatggcccagacgacc	25bp
Produkt CEA:		167bp

Ředění primerů a próby:

Próba CEA probe

Duálně značená próba typu TaqMan je označena hexachlorofluoresceinem (HEX), který je zhasen quencherem BHQ1; na přístroji se zvolí kanál JOE nebo přímo excitační vlnová délka 530 nm a emisní vlnová délka 556 nm. Próba je HPLC čištěna.

Pracovní koncentrace je 1,25 μM , tj. 4 μl obsahují 5 pmol próby.

Ředění: 5 μl zásobního 0,1mM + 395 μl H₂O = 400 μl 1,25 μM pracovního roztoku

Primery CEA 3 a CEA 4

Pracovní koncentrace je 0,015mM, tj. 1 μl obsahuje 15 pmol primeru.

Ředění: 30 μl zásobního 0,1mM + 170 μl H₂O = 200 μl 0,015mM pracovního roztoku

Tab. 5: Složení reakční reakční směsi pro real-time PCR s markerem CEA

Reakční objem: 25 μl	Objem	Koncentrace	Konc. na 1 reakci	Konečná koncentrace
CEA 3	0,5 μl	0,015 mM	7,5 pmol	300 nM
CEA 4	1 μl	0,015 mM	15 pmol	600 nM
CEA probe	4 μl	1,25 μM	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 μl	10 mM	5 nmol	200 μM
Taq	0,2 μl	5 U/ μl	1 U	0,04 U/ μl
Mg²⁺	3 μl	25 mM	75 nmol	3 mM
Pufr	2,5 μl	10x	1x	1x
cDNA	1 μl	0,1 μg cDNA/ μl	100 ng	4 ng/ μl
H₂O	12,3 μl	/	/	/

Průběh PCR cyklování:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA

96 °C / 15 minut

2. krok: amplifikace - dvoukroková

95 °C / 15 vteřin - 65 °C / 15 vteřin

snímání v kanálu JOE při 65 °C

1.4.1.4 CK-20

	Sekvence (5'-3')	Velikost
CK 20 sense:	cgacttgaacaggaaattgcta	22 bp
CK 20 antisense:	tgccatccactactcttgc	20 bp
CK 20 probe:	accgccgccttctggaagga	20 bp
Produkt CK 20:		148 bp

Ředění primerů a próby:

Próba CK 20 probe

Duálně značená próba typu TaqMan je označena hexachlorofluoresceinem (HEX), který je zhasen quencherem BHQ1; na přístroji se zvolí kanál JOE nebo přímo excitační vlnová délka 530 nm a emisní vlnová délka 556 nm. Próba je HPLC čištěna.

Pracovní koncentrace je 1,25 μ M, tj. 4 μ l obsahují 5 pmol próby.

Ředění: 5 μ l zásobního 0,1mM + 395 μ l H₂O = 400 μ l 1,25 μ M pracovního roztoku

Primery CK 20 sense, CK 20 antisense

Pracovní koncentrace je 0,005 mM, tj. 1 μ l obsahuje 5 pmol primeru.

Ředění: 15 μ l zásobního 0,1mM + 285 μ l H₂O = 300 μ l 0,005mM pracovního roztoku

Tab. 6: Složení reakční směsi pro real-time PCR s markem CK-20

Reakční objem: 25 μ l	Objem	Koncentrace	Konc. na 1 reakci	Konečná koncentrace
CK 20s	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
CK 20as	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
CK 20 probe	4 μ l	1,25 μ M	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 μ l	10 mM	5 nmol	200 μ M
Taq	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg²⁺	3 μ l	25 mM	75 nmol	3 mM
Pufr	2,5 μ l	10x	1x	1x
cDNA	1 μ l	0,1 μ g cDNA/ μ l	100 ng	4 ng/ μ l
H₂O	9,8 μ l	/	/	/

Průběh PCR cyklování:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA

96 °C / 15 minut

2. krok: amplifikace - dvoukroková

95 °C / 15 vteřin - 60 °C / 15 vteřin

snímání v kanálu JOE při 60 °C

1.4.2 Negativní kontrola a specifické standardy

Negativní kontrola

Jako negativní kontrola bylo pro měření napipetováno místo vzorku 1 μ l DEPC treated vody.

Specifické standardy

Jako specifické standardy byly použity předem připravené amplikony obsahující cílovou sekvenci pro námi zvolené primery (EpCAM, EGFR, CEA, CK-20). Tyto standardy nám po jejich rozmrazení a odpovídajícím naředění posloužily k vytvoření standardizační křivky.

1.4.3 Deoxynukleotidy, DNA polymerasa a pufr

dNTPs

Zásobní koncentrace deoxynukleotidů dTTP, dCTP, dATP, dGTP (Promega) je 100mM. Pracovní koncentrace je 10mM dNTPs.

Thermo-Start DNA Polymerase (ABgene)

Enzymem je chemicky modifikovaná termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza od *Thermus Aquaticus*. Enzym je určen pro hot-start PCR. Pracovní koncentrace je 5 U/μl, používáme 1 U na reakci.

Reakční pufr je 10x koncentrovaný, finální koncentrace je 1x, tj. při celkovém objemu reakční směsi 25μl dáme do reakce 2,5μl 10x koncentrovaného reakčního pufru.

Instrumentace

Materiál

Specifické primery a TaqMan sondy (Generi-Biotech, Česká republika), DEPC ošetřená voda (Ambion, USA), ep Dualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Německo), Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (Qiagen, Austrálie), Thermo-Start Taq DNA Polymerase, MgCl₂, Thermo-Start PCR Buffer (Thermo Fisher Scientific, USA), dNTPs (Promega, USA)

Přístroje

Skleněný PCR box, laminární box (Thermo Scientific, USA), mrazicí box (Gorenje, Slovinsko), kombinovaná chladnička (Liebherr, Německo), vortex (Labnet, USA), minicentrifuga (Eppendorf, Německo), minicentrifuga Combi Spin (Biosan, Lotyšsko), centrifuga 5430 (Eppendorf, Německo), Real-time PCR termocyklér Corbett RotorGene-3000 (Corbett-Research, Austrálie)

Postup

Chemikálie byly uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před začátkem práce byly rozmrazeny v chlazeném stojánku 10 mM dNTP's, primery, próba, DEPC H_2O , reakční pufr a MgCl_2 . Po rozpuštění byly chemikálie krátce zvortexovány a stočeny. Thermo-Start DNA polymeráza byla přidávána přímo z mrazáku po jemném zvortexování a krátkém stočení.

- 1) PCR byla provedena ze 100 ng cDNA v reakčním objemu 25 μl .
- 2) Byl připravena reakční směs (MasterMix) pro jednotlivé markery (EGFR, CEA, CK-20, EpCAM) Uvedené množství v tabulce (Tab. 3, 4, 5 a 6) je vždy pro jeden vzorek, MasterMix byl připravován s rezervou. Vzorek byl krátce zvortexován a stočen.
- 3) Do vychlazené destičky byly připraveny 0,1 ml zkumavky.
- 4) Do zkumavek bylo pipetováno 24 μl MasterMixu, 1 μl cDNA vzorků, 1 μl DEPC vody jako negativní kontrola, 1 μl cDNA pozitivní kontroly a 1 μl specifických standardů.
- 5) Zkumavky byly vloženy do karuselu kde byly případně vyváženy.
- 6) Pomocí softwaru Rotor-Gene 6 byla provedena automatická kalibrace snímání fluorescence přístroje a byl spuštěn příslušný program.
- 7) Po ukončení teplotního cyklování byla provedena analýza real-time PCR reakce.

1.5 Statistika

Pro validační experiment byla závislost pozorovaného podílu HT-29 na očekávaném podílu HT-29 modelována čtyřparametrickou logistickou křivkou. Hodnoty pozorovaných a očekávaných množství HT-29 byly předtím zlogaritmovány při základu 2. Odhady byly vypočteny v softwaru R pomocí funkce nls (nelineární metoda nejmenších čtverců) a funkce ssfpl (čtyřparametrický logistický model).

Při srovnání metody PCR a CFU pro jednotlivé markery byly naměřené hodnoty z CFA a PCR pro danou koncentraci vždy náhodně spárovány a body byla proložena přímkou metodou ortogonální regrese. Byl vypočten Spearmanův korelační koeficient a testována jeho nulovost.

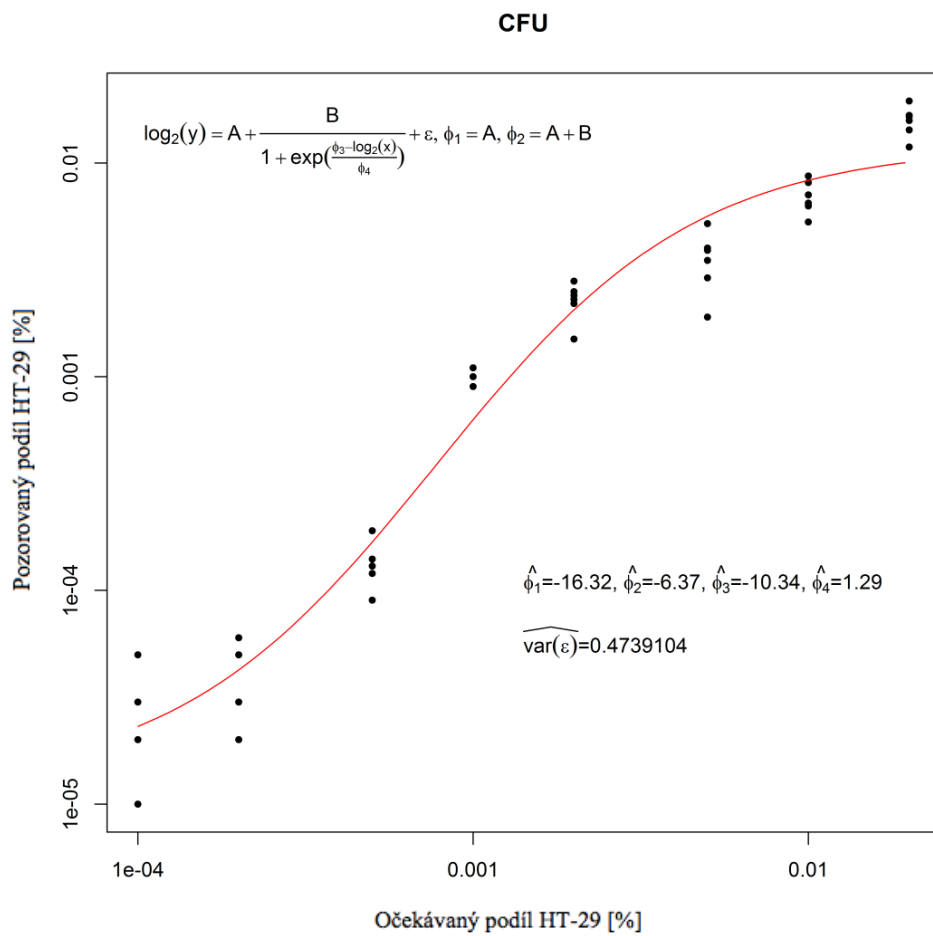
2 VÝSLEDKY

2.1 Validační experiment

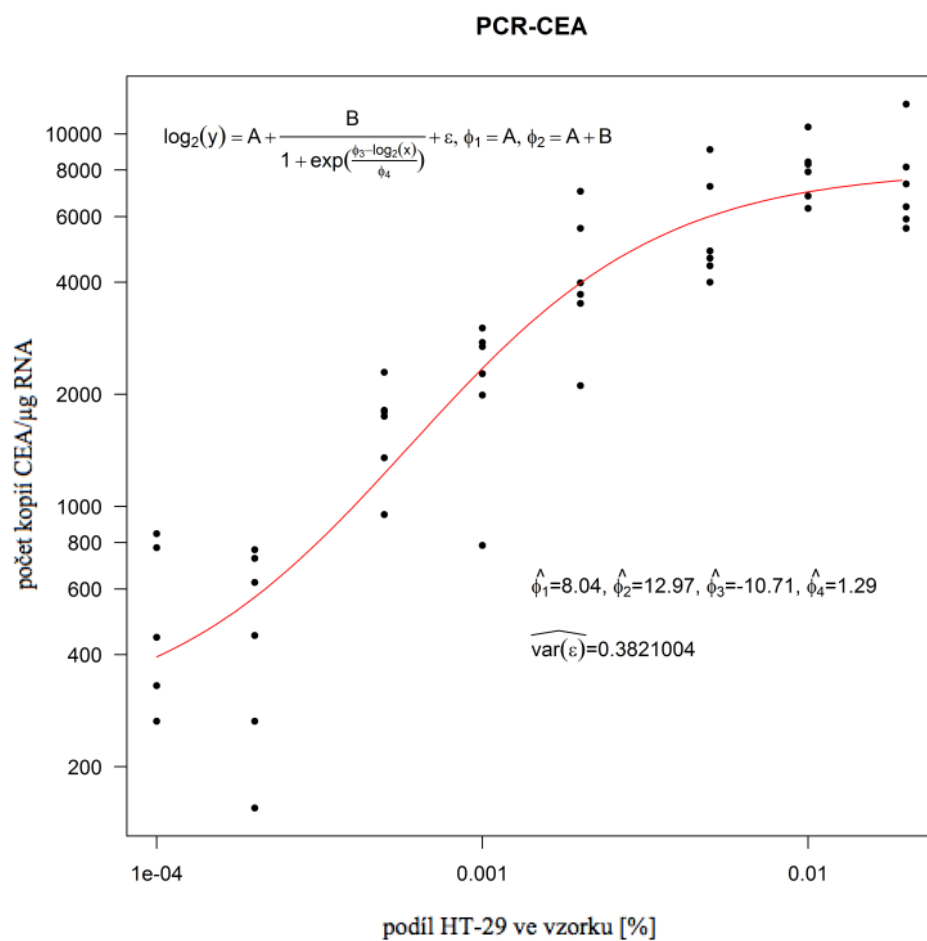
Metodu real-time reverzně transkriptázovou PCR používanou v naší laboratoři pro detekci minimální reziduální choroby u pacientů s kolorektálním karcinomem jsme ověřili validačním experimentem za pomoci koloniformního testu (CFU) za použití nádorových buněk buněčné linie kolorektálního adenokarcinomu HT-29 o různém zředění. Zředění bylo provedeno pomocí čistých leukocytů (viz Tab. 1).

Ověření jsme provedli pomocí obou metod koloniformního testu i metody real-time RT-PCR. Real-time RT-PCR jsme testovali separovaně ve všech zředěních pro každý jeden specifický marker.

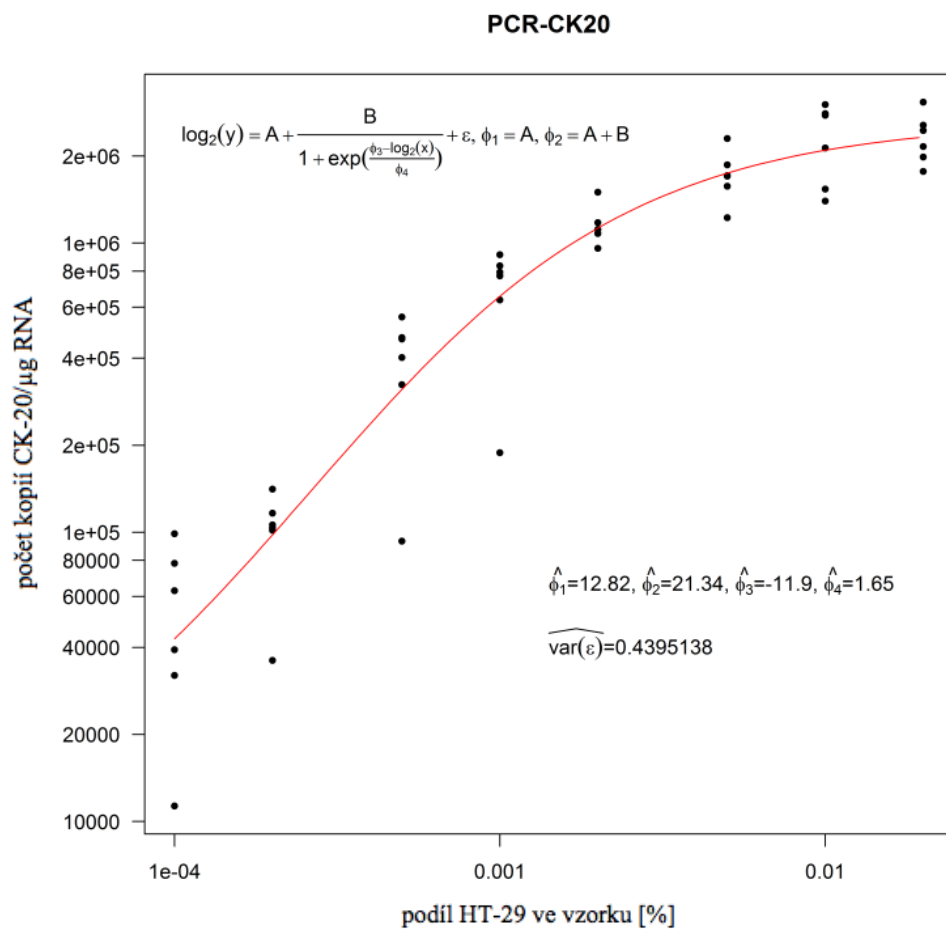
Z důvodu problémů s expresí v buněčné linii HT-29 jsme marker EpCAM z výsledků vyřadili a dále jsme se věnovali pouze zbylým markerům CEA, CK-20 a EGFR, které vykazovaly značnou a pravidelnou genovou expresí. EpCAM byl sice buněčnou linií poměrně vysoce exprimován, nicméně jeho exprese byla značně nestabilní a nebyl pozorován pravidelný nárůst exprese v závislosti na ředění. Na obrázcích níže vidíme hodnoty pozorovaných a očekávaných množství HT-29 zlogaritmované při základu 2 a převedené na čtyřparametrický logistický model. U všech analyzovaných markerů (CEA, EGFR, CK-20) vidíme postupný nárůst počtu kopií na μg testované RNA v závislosti na použitém ředění, tedy počtu buněk HT-29 ve vzorku (viz Obr. 8, 9 a 10). Stejný trend můžeme pozorovat také u CFU, kdy se v závislosti na ředění buněk zvyšuje počet narostlých kolonií na destičce (viz Obr. 7).



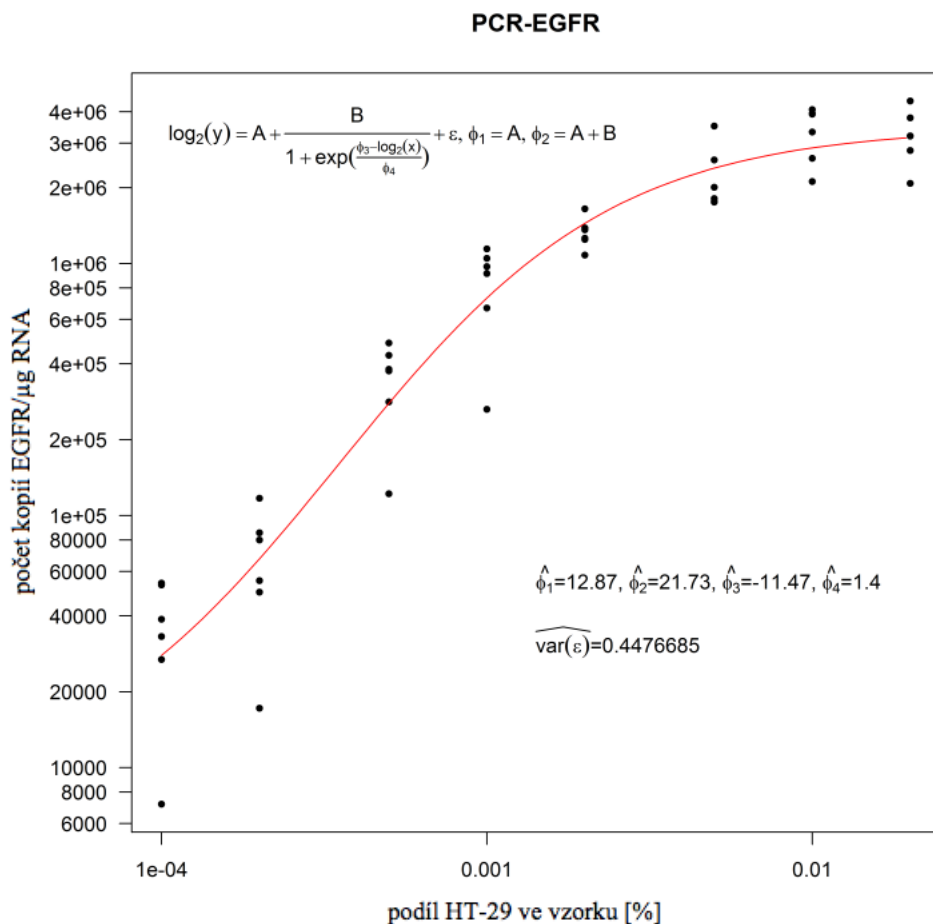
Obr. 7: Čtyřparametrická logistická křivka pro závislost pozorovaného a očekávaného podílu HT-29 testovaného pomocí koloniformního testu



Obr. 8: Čtyřparametrická logistická křivka pro závislost naměřené exprese genu CEA (počet kopií CEA na μg RNA) a očekávaného podílu HT-29 testovaného pomocí PCR



Obr. 9: Čtyřparametrická logistická křivka pro závislost naměřené exprese genu CK-20 (počet kopií CK-20 na μg RNA) a očekávaného podílu HT-29 testovaného pomocí PCR



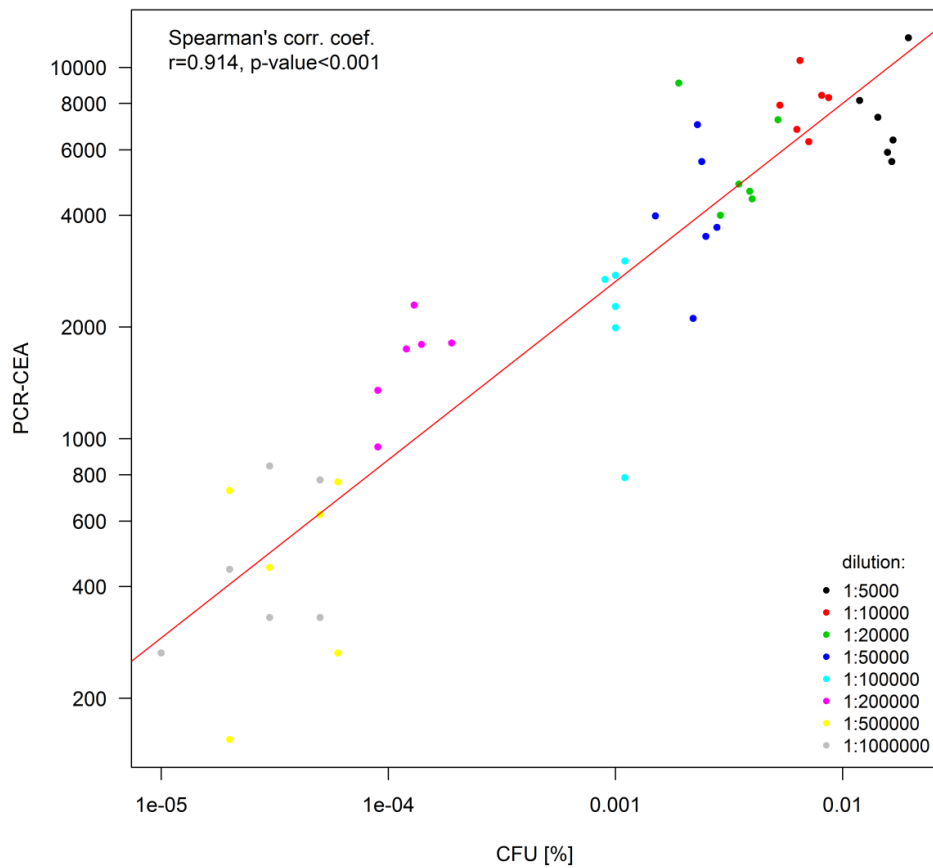
Obr. 10: Čtyřparametrická logistická křivka pro závislost naměřené exprese genu EGFR (počet kopií EGFR na μg RNA) a očekávaného podílu HT-29 testovaného pomocí PCR

2.2 Srovnání výsledků real-time RT-PCR a CFU

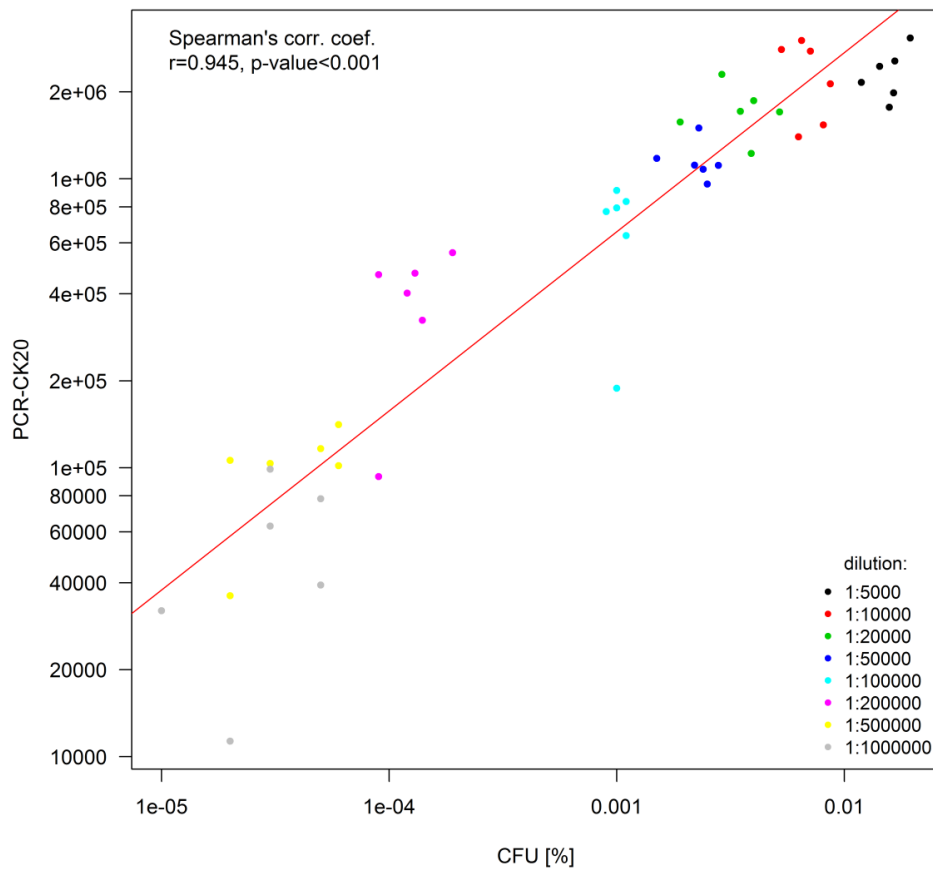
Pro porovnání metod real-time RT-PCR a CFU jsme použili stejné ředění buněk HT-29 a leukocytů. U koloniformního testu jsme počítali množství kolonií vzniklých z původních buněk HT-29. U real-time RT-PCR jsme sledovali míru exprese použitých specifických markerů.

Pomocí metody CFU byly identifikovány všechny vzniklé kolonie ve všech ředěních. U real-time RT-PCR jsme dosáhli senzitivity 97,9 % pro CEA a 100% senzitivity pro marker CK-20.

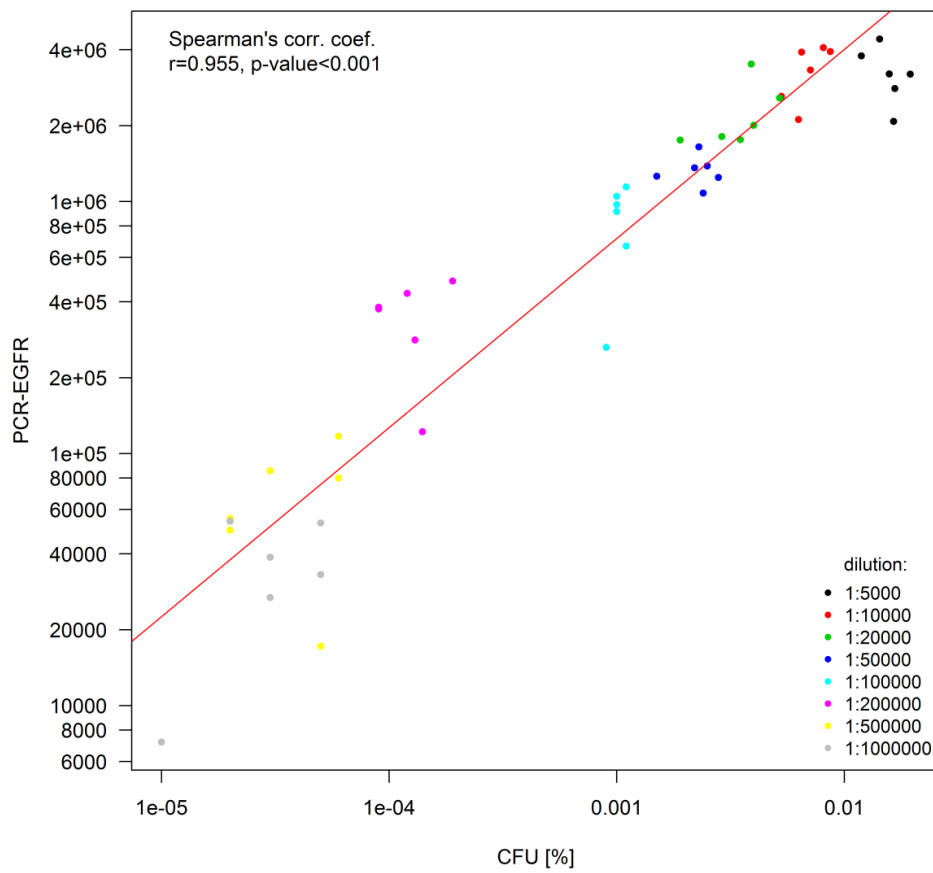
Zjistili jsme, že exprese sledovaných markerů CEA, CK-20 a EGFR detekovaná pomocí real-time PCR se stejně jako počet narostlých kolonií na koloniformním testu lineárně zvyšuje v závislosti na zředění buněk HT-29 (viz Obr. 11, 12 a 13).



Obr. 11: Srovnání výsledků detekce nádorových buněk HT-29 ve směsi s leukocyty pomocí CFU a PCR za použití markeru CEA



Obr. 12: Srovnání výsledků detekce nádorových buněk HT-29 ve směsi s leukocyty pomocí CFU a PCR za použití markeru CK-20



Obr. 13: Srovnání výsledků detekce nádorových buněk HT-29 ve směsi s leukocyty pomocí CFU a PCR za použití markeru EGFR

3 DISKUZE

Nepřímá metoda real-time RT-PCR je sice velmi přesná a spolehlivá, ale ve srovnání s ostatními, nyní běžně používanými přímými metodami pro stanovení minimální reziduální choroby pomocí detekce CTCs je zdlouhavá a komplikovaná na přípravu vzorku. Další nevýhodou použití techniky real-time RT-PCR je nemožnost automatizace a vysoké riziko kontaminace vzorku. Nutnou přípravu vzorku a rizika kontaminace vzorku pro reverzně transkriptázovou PCR popsal ve své práci Farell, 2010. Z toho důvodu není již běžně používaná a je nahrazována jednoduššími metodami vychytávajícími CTCs ze vzorku na základě vhodně zvolených protilátek jako je CellSearch nebo na základě záchytu CTCs pomocí specifických rozdílných fyzikálních vlastností (např. ISET).

V současnosti se v praxi využívá celé škály různých diagnostických přístrojů a jsou vyvíjeny stále nové metody pro přímou detekci cirkulujících nádorových buněk. Dbá se především na jejich dobrou specifitu, jednoduchost a rychlost použití a také na minimalizaci rozměrů těchto přístrojů.

Cílem našeho experimentu bylo ovšem prokázat, že nepřímá metoda detekce CTCs pomocí real-time PCR je stále srovnatelná s metodami přímé detekce a námi používané markery je možné i nadále využívat pro diagnostiku minimální reziduální choroby. Možnost detekce CTCs u CRC pomocí metody RT-PCR byla prokázána v práci Hardingham *et al.*, 2000, ve které konkrétně využívali pro detekci nádorových buněk specifických markerů, z nichž jeden byl právě i námi zkoumaný cytokeratinový marker CK-20.

Experiment jsme prováděli pro nádorové buňky z linie HT-29, které spolehlivě exprimovaly námi používané biomarkery. Stejná buněčná linie byla použita i v práci Furiho *et al.* 2015, kde tato linie byla testována také pro marker CK-20. Kromě tohoto markeru byly v práci použity ještě markery E-cadherin DNMT3. I když buňky z buněčné linie HT-29 nejsou úplně identické jako CTCs u kolorektálního karcinomu, dá se očekávat, že u cirkulujících nádorových buněk bude exprese stejná, nebo alespoň velmi podobná.

Pro diagnostiku minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu se využívá především exprese specifických biomarkerů cytokeratinů 19 a 20, CEA, EGFR

a EpCAM, které jsou všechny běžně detekovatelné u cirkulujících nádorových buněk pro nádory kolorekta.

Jediným markerem, který v našem experimentu nevykazoval očekávanou expresi, byl biomarker EpCAM. EpCAM exprimoval v linii nádorových buněk HT-29 nepravidelně a nemohl být tedy použit pro validační experiment. Je známo, že exprese markeru EpCAM závisí na typu a agresivitě nádoru a může se lišit u různých nádorových buněk (Spizzo *et al.*, 2011). To by mohlo vést k nerovnoměrné expresi tohoto markeru v nádorové buněčné linii, a tedy k výše zmíněným problémům s expresí v závislosti na ředění. Tento fakt také poukazuje na jisté nevýhody moderních metod detekce CTCs založených právě na EpCAM protilátkách. V případě, že nádor tento marker neexprimuje, nebo jej exprimuje jen polovina buněk, si nemůžeme být jisti, že jsou z krve skutečně vycytány všechny nádorové buňky a MRD je správně diagnostikována.

Z toho důvodu jsme pro validační experiment využili zbylé tři markery, které nám díky jejich signifikantní expresi poskytly dostatek dat pro vytvoření validačních křivek potřebných ke srovnání s metodou CFU.

4 ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo validovat detekci cirkulujících nádorových buněk, resp. minimální reziduální choroby, metodou real-time reverzně-transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakcí. Validaci metody jsme provedli pomocí koloniformního testu, který jsme použili ke srovnání námi získaných výsledků. Pro experiment jsme využili v inkubátoru kultivovaných buněk nádorové buněčné linie HT-29, které byly zředěny odpovídajícím alikvótem leukocytů vyizolovaných z lidského buffy coatu.

Provedením experimentu a následným statistickým srovnáním výsledků získaných metodou real-time RT-PCR a výsledků získaných metodou CFU jsme prokázali, že námi používaná metoda real-time RT-PCR vykazuje dostačující senzitivitu a specifitu a je proto prakticky použitelná k detekci cirkulujících nádorových buněk pro stanovení MRD u pacientů. Měřením jsme stanovili, že pomocí metody real-time RT-PCR jsme schopni detekovat i tak malé koncentrace cirkulujících nádorových buněk, které by odpovídaly našemu laboratornímu zředění deseti buněk linie HT-29 v deseti milionech čistých leukocytů. Stejně tak jsme stanovili specifitu pro biomarkery CEA, CK-20 a EGFR. U všech těchto biomarkerů byla síla fluorescenčního signálu přímo úměrná koncentraci nádorových buněk HT-29 ve vzorku. Marker EpCAM přes jeho poměrně vysokou expresi neprokázal dostatečnou specifitu.

Prokázali jsme, že real-time PCR, i když je již považována za zastaralou metodu a je nahrazována modernějšími metodami detekce, je stále „zlatým standardem“ a je možné ji nadále používat pro účely diagnostiky MRD u pacientů s CRC.

V. Použitá literatura

ANGLE plc www.angleplc.com [cit. 2017-10-16]

Bork, U. Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, 20 (30), 10296-10304.

Brown, T. A. Essential molecular biology: a practical approach. 2. vydání. New York: Oxford University Press. 2001. ISBN 0-19-963645-1.

Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 2000, 25: 169-193

Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology* 2002, 29: 23-39

CellSearch www.cellsearchctc.com [cit. 2017-10-18]

Cleatbridge BioMedics www.clearbridgebiomedics.com [cit. 2017-10-18]

CytoTrack www.cytotrack.com [cit. 2018-05-14]

DiGirolamo, C. M.; Stokes, D.; Colter, D.; et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology*. 1999, 107 (2), 275-281.

Dušek, L.; Mužík, J.; Malúšková, D.; et al. Epidemiology of Screening-targeted Cancers According to New Data of the Czech National Cancer Registry. *Klinická onkologie*. 2014, 27 (2), 19-48.

Ferlay, J.; Shin, H. -R.; Bray, F.; et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010, 127 (12), 2893-2917.

Fűri, I.; Kalmár, A.; Wichmann, B.; et al. Cell Free DNA of Tumor Origin Induces a 'Metastatic' Expression Profile in HT-29 Cancer Cell Line. *PLOS ONE*. 2015, 10 (7), 1-16.

Globocan 2012, Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 www.globocan.iarc.fr [cit. 2017-09-11].

- Hardingham, J. E.; Sage, R. E.; Hewett, P. J. Molecular Detection of Blood-Borne Epithelial Cells in Colorectal Cancer Patients And i Patients with Bening Bowel Disease. *Int. J Cancer*. 2000, 89, 8-13.
- Hardingham, J.; Grover, P. Detection and Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer - 20 Years of Progress. *Molecular Medicine*. 2015, 21 (1), 25-31.
- Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S.; Griffith, R. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology*. 1992, 10 (4), 413-417.
- Hillig, T.; Horn, P.; Nygaard, A. B.; et al. In vitro detection of circulating tumor cells compared by the CytoTrack and CellSearch methods. *Tumor Biology*. 2015, 36 (6), 4597-4601.
- Hinz, S.; Hendricks, A.; Wittig, A.; et al. Detection of circulating tumor cells with CK20 RT-PCR is an independent negative prognostic marker in colon cancer patients – a prospective study. *BMC Cancer*. 2017, 17 (1), 1-11.
- Chien, A.; Edgar, D. B.; Trela, J. M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*. 1976, 127 (3), 1550-1557.
- Cho, E.; Smith-Warner, S. A.; Spiegelman, D; et al. Dairy Foods, Calcium, and Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 10 Cohort Studies. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2004, 96 (13), 1015-1022.
- Chudasama, D.; Freydina, D. V.; Freidin, M. B.; et al. Inertia based microfluidic capture and characterisation of circulating tumour cells for the diagnosis of lung cancer. *Annals of Translational Medicine*. 2016, 4 (24), 480-480.
- Josse, S. A.; Gorges, T. M.; Pantel, K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Molecular Medicine*. 2015, 7 (1), 1-11.
- Kim, S. W.; Kim, D. U.; Kim, J. K.; et al. Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008, 42 (4), 356-361.
- Kollárová, H. Vybrané kapitoly z epidemiologie; Univerzita Palackého v Olomouci: Olomouc, 2011. ISBN 978-80-244-2715-7.
- Luo, Y.; Yide H.; Minghui Z.; et al. EtBr-induced selective degradation of mitochondria occurs via autophagy. *Oncology Reports*. 2013, 30 (3), 1201-1208.

- Mao, F.; Leung, W. -Y.; Xin, X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnology*. 2007, 7 (1), 1-16.
- Marrinucci, D.; Bethel, K.; Kolatkar, et al. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Physical Biology*. 2012, 9 (1), 1-19.
- Masuda, T.; Hayashi, N.; Iguchi, T.; et al. Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer. *Molecular Oncology*. 2016, 10 (3), 408-417.
- McPherson, M. J.; Møller, S. M. PCR the Basics, 2. vydání.; Taylor & Francis: Hoboken, 2006. ISBN 9780203002674.
- Mostert, B.; Sleijfer, S.; Foekens, J. A.; Gratama, J. W. Circulating tumor cells (CTCs): Detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2009, 35 (5), 463-474.
- Navarro, E.; Serrano-Heras, G.; Castaño, M. J.; Solera, J. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 2015, 439, 231-250.
- Nicolazzo, C.; Raimondi, C.; Francescangeli, F.; et al. EpCAM-Expressing Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer. *The International Journal of Biological Markers*. 2018, 32 (4), 415-420.
- Nie, K.; Jia, Y.; Zhang, X. Cell-free circulating tumor DNA in plasma/serum of non-small cell lung cancer. *Tumor Biology*. 2015, 36 (1), 7-19.
- Nobel Lecture: The Polymerase Chain Reaction: The Nobel Prize in Chemistry 1993 https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html [cit. 2018-05-08].
- Pachmann, K.; Camara, O.; Kavallaris, A.; et al. Monitoring the Response of Circulating Epithelial Tumor Cells to Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Allows Detection of Patients at Risk of Early Relapse. *Journal of Clinical Oncology*. 2008, 26 (8), 1208-1215.
- Pan, S.; Xia, W.; Ding, Q.; et al. Can plasma DNA monitoring be employed in personalized chemotherapy for patients with advanced lung cancer?. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2012, 66 (2), 131-137.
- Pavlopoulou, A.; Scorilas, A. A Comprehensive Phylogenetic and Structural Analysis of the Carcinoembryonic Antigen (CEA) Gene Family. *Genome Biology and Evolution*. 2014, 6 (6), 1314-1326.

Ponchel, F.; Toomes, C.; Bransfield, K.; et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*. 2003, 3 (1), 1-13.

RareCyte www.rarecyte.com [cit. 2018-05-14]

Saucedo-Zeni, N.; Mewes, S.; Niestroj, R.; et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *International Journal of Oncology*. 2012, 41 (4), 1241-1250.

ScreenCell www.screencell.com [cit. 2017-10-19]

Sequist, L. V.; Nagrath, S.; Toner, M.; et al. The CTC-Chip: An Exciting New Tool to Detect Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients. *Journal of Thoracic Oncology*. 2009, 4 (3), 281-283.

Sforza, V.; Martinelli, E.; Ciardiello, F.; et al. Mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor inhibitors in metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2016, 22 (28), 6345-6361.

Spizzo, G.; Fong, D.; Wurm, M.; et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *Journal of Clinical Pathology*. 2011, 64 (5), 415-420.

Systém pro vizualizaci onkologických dat - Epidemiologie zhoubných nádorů v České Republice www.svod.cz [cit. 2017-9-15]

Šmarda, J. et al. *Metody molekulární biologie*; 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita. 2005. ISBN 80-210-3841-1.

Truini, A.; Alama, A.; Dal Bello, M. G.; et al. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients by CellSearch System. *Frontiers in Oncology*. 2014, 4, 1-6.

Trzpis, M.; McLaughlin, P. M. J.; de Leij, L. M. F. H.; Harmsen, M. C. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients by CellSearch System. *The American Journal of Pathology*. 2007, 171 (2), 386-395.

van der Toom, E. E.; Verdone, J. E.; Gorin, M. A.; Pienta, K. J. Technical challenges in the isolation and analysis of circulating tumor cells. *Oncotarget*. 2016, 7 (38), 62754-62766.

Vona, G.; Sabile, A.; Louha, M.; et al. Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells. *The American Journal of Pathology*. 2000, 156 (1), 57-63.

What is the difference between EvaGreen® and SYBR® Green?
<https://biotium.com/faqs/what-is-the-difference-between-evagreen-and-sybr-green/> [cit. 2018-02-16].

Wikipedia, the free encyclopedia <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4e/Qpcr-cycling.png/800px-Qpcr-cycling.png> [cit. 2018-04-13]

Wittekind, C.; Neid, M. Cancer Invasion and Metastasis. *Oncology*. 2005, 69 (1), 14-16.

Zipper, H. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*. 2004, 32 (12), e103-e103.

VI. Použité zkratky

AMV - virus ptačí myeloblastózy (Avian Myeloblastosis Virus)

cDNA - komplementární deoxyribonukleová kyselina (Complementary Deoxyribonucleic Acid)

CEA - karcinomembrionní antigen (Carcinomembrionic Antigene)

CEACAMs - molekuly buněčné adheze karcinomembrionního antigenu (Cell Adhesion Molecules)

CEAPSGs - glykoproteiny karcinomembrionního antigenu specifické pro těhotenství (Pregnancy-Specific Glycoproteins)

CFU - koloniformní test (Colony Forming Unit Assay)

CFU - koloniformní jednotka (Colony Forming Unit)

CK-20 - cytokeratin 20

CRC - kolorektální karcinom (Colorectal Carcinoma)

CTCs - cirkulující nádorové buňky (Circulating Tumour Cells)

ČR - Česká republika

DEPC - diethyl pyrokarbonát (Diethyl Pyrocarbonate)

DNA - deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)

dNTPs - deoxynukleotidtrifosfáty (Deoxynucleotide Triphosphates)

EGFR - receptor pro epidermální růstový faktor (Epidermal growth factor receptor)

EpCAM - molekula epiteliální buněčné adheze (Epithelial Cell Adhesion Molecule)

EtBr - ethidium bromid

HEX - hexafluorescein

HPLC - vysokoúčinná kapalná chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)

MMLV - virus myší leukémie (Murine Leukemia Virus)

mRNA - mediátorová ribonukleová kyselina (Messenger Ribonucleic Acid)

PBS - fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)

PCR - polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

qPCR - kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

RNA - ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)

RT-PCR - reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction)