



**UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů**

**Analýza výskytu genetických změn
androgenového receptoru ve vzorcích
tekuté biopsie pacientů s pokročilým
karcinomem prostaty**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Radka Spurná
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Eva Szczyrbová
Termín odevzdání práce:	2023

Bibliografické identifikace

Jméno a příjmení autora	Radka Spurná
Název práce	Analýza výskytu genetických změn androgenového receptoru ve vzorcích tekuté biopsie pacientů s pokročilým karcinomem prostaty
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav klinické a molekulární patologie LF Univerzity Palackého
Vedoucí práce	Mgr. Eva Szczyrbová
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Tekutá biopsie je neinvazivní metoda umožňující analýzu cirkulující nebuněčné nádorové DNA z tělních tekutin (především z krevní plazmy) a tím sledovat progresi nádorových onemocnění. Bakalářská práce se zabývá optimalizací analýzy mutací H875Y a T878A genu pro androgenový receptor a variability počtu kopií (CNV) tohoto genu. Pro praktickou část byly využity buněčné linie LNCaP, CWR22rv1, LAPC-4, VCaP pro ověření specifity a citlivosti PCR reakce. Pro detekci mutací a amplifikací androgenového receptoru byla použita kvantitativní PCR, nanodestičková digitální PCR a kapičková digitální PCR. Následně byla provedena analýza 46 vzorků tekuté biopsie od pacientů s pokročilým karcinomem prostaty a 15 vzorků mužů bez nádorového onemocnění jako kontroly. Deset patientských vzorků bylo pozitivních na CNV genu pro androgenový receptor (21,74 %) a data byla ověřena s využitím dvou systémů pro digitální PCR.</p>
Klíčová slova	tekutá biopsie, androgenový receptor, karcinom prostaty, kapičková digitální PCR, nanodestičková digitální PCR
Počet stran	54
Počet příloh	1
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Radka Spurná
Title of thesis	Analysis of the genetics changes of androgen receptor in liquid biopsy samples of patients with advanced prostate cancer
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Clinical and Molecular Pathology LF UP
Supervisor	Mgr. Eva Szczyrbová
The year of presentation	2022
Abstract	Liquid biopsy is a non-invasive method that allows the analysis of circulating non-cellular tumour DNA from body fluids (mainly blood plasma) to monitor cancer progression. The bachelor thesis deals with the optimization of the analysis of H875Y and T878A mutations of the androgen receptor gene and copy number variability (CNV) of this gene. For the practical part, LNCaP, CWR22rv1, LAPC-4, VCaP cell lines were used to verify the specificity and sensitivity of the PCR reaction. Quantitative PCR, nanoplate digital PCR and droplet digital PCR were used to detect mutations and amplifications of the androgen receptor. Subsequently, 46 liquid biopsy samples from patients with advanced prostate cancer and 15 samples from men without cancer as controls were analyzed. Ten patient samples were positive for CNV androgen receptor gene (21.74%) and the data were verified using two digital PCR systems.
Keywords	liquid biopsy, androgen receptor, prostate cancer, droplet digital PCR, nanoplate digital PCR
Number of pages	54
Number of appendices	1
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením paní Mgr. Evy Szczyrbové s použitím citované literatury.

V Olomouci dne 5. 5. 2023

.....

Podpis

Ráda bych poděkovala paní Mgr. Evě Szczyrbové za odborné vedení bakalářské práce, cenné rady, ochotu, vstřícnost a trpělivost při zpracování bakalářské práce. Poděkování patří i doc. Janu Bouchalovi, Ph.D. a kolektivu Ústavu klinické a molekulární patologie LF UPOL za příjemné pracovní prostředí. Dále děkuji paní doc. Ing. Evě Kriegové, Dr. z Ústavu imunologie LF UPOL za umožnění měření na přístroji QIAcuity, paní Mgr. Janě Stránské Ph.D. z Ústavu molekulární a translační medicíny za možnost využití digitální kapičkové PCR, panu Mgr. Pavlovi Sauerovi, Ph.D. z Ústavu mikrobiologie LF UPOL za zapůjčení enzymu Xbal a Mgr. Karlovi Součkovi, Ph.D. z Ústavu experimentální biologie Masarykovy univerzity v Brně za poskytnutí buněčných linií LNCaP, CWR22rv1 a VCaP. Děkuji i rodičům a svým blízkým, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Obsah

	SEZNAM ZKRATEK	8
1	ÚVOD	9
2	CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	Karcinom prostaty	11
3.1.1	Etiologie	11
3.1.2	Stádia	12
3.1.4	Léčba	12
3.2	Androgenový receptor	14
3.2.1	Androgeny a androgenový receptor	14
3.2.2	Interakce molekul s androgenovým receptorem	15
3.2.3	Gen pro androgenový receptor	15
3.2.4	Výskyt mutací genu pro androgenový receptor v buněčných liniích	15
3.2.5	Variabilita počtu kopií	16
3.3	Tekutá biopsie	18
3.4	Digitální PCR	20
3.4.1	Kapičková digitální PCR	20
3.4.2	Nanodestičková digitální PCR	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1	Přístroje a materiály	23
4.1.1	Přístrojové vybavení	23
4.1.2	Spotřební materiál a další pomůcky	23
4.1.3	Chemikálie a roztoky	24
4.1.4	Biologický materiál	25
4.2	Metody	27
4.2.1	Sběr krve a izolace plazmy	27
4.2.2	Izolace ccfDNA/RNA z plazmy	27
4.2.2.1	Přečištění	27

4.2.3	Digitální kapičková PCR	28
4.2.3.1	Příprava vzorků pro digitální kapičkovou PCR	28
4.2.3.2	Provedení digitální kapičkové PCR	28
4.2.4	Kultivace buněčných linií a příprava vzorků pro izolaci DNA	29
4.2.5	Izolace DNA z buněk	29
4.2.6	Kvantitativní PCR pro ověření specifčnosti assayí	30
4.2.7	Elektroforéza pro ověření stavu produktů.....	31
4.2.8	Zjištění citlivosti assayí pomocí kvantitativní PCR	31
4.2.9	Fragmentace DNA a následná kvantitativní PCR	32
4.2.10	Nanodestičková digitální PCR s použitím DNA z buněčných linií	32
4.2.11	Nanodestičková digitální PCR s použitím DNA z buněčných linií a plazem.	34
4.3	VÝSLEDKY	35
4.3.1	Ověření specifčnosti assayí pro mutace T878A a H875Y	35
4.3.2	Zjištění citlivosti assayí	37
4.3.3	Nanodestičková digitální PCR.....	39
4.3.4	Variabilita počtu kopií u DNA buněčných linií	40
4.3.5	Variabilita počtu kopií u vzorků DNA tekuté biopsie	41
5	DISKUZE	44
6	ZÁVĚR	47
	POUŽITÁ LITERATURA	48
	Přílohy	
	Příloha A	

SEZNAM ZKRATEK

ADT	androgen-deprivační terapie
AR	androgenový receptor
ARTA	terapie cílená na androgenový receptor
ccfDNA	cirkulující nebuněčná DNA
CNV	variabilita počtu kopií
CRPC	kastračně-rezistentní karcinom prostaty
CTC	cirkulující nádorové buňky
ctDNA	cirkulující nebuněčná nádorová DNA
DBD	vazebná doména DNA
ddPCR	kapičková digitální PCR
DHT	5 α -dihydrotestosteron
DMEM	kultivační médium (z angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
dPCR	digitální PCR
GTFs	obecné transkripční faktory
HSP	proteiny tepelného šoku
LBD	C-terminální doména vázající ligand
miRNA	mikroRNA
ndPCR	nanodestičková digitální PCR
NTD	N-terminální doména
PBS	fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PCa	karcinom prostaty
PCR	polymerázová řetězová reakce
PSA	prostatický specifický antigen
qPCR	kvantitativní PCR
RNA Pol II	RNA polymeráza II
RPMI	kultivační médium (z angl. Roswell Park Memorial Institute)
TBE	tris-borát EDTA pufr
TEMED	etramethylethylendiamin

1 ÚVOD

Karcinom prostaty je nejčastějším diagnostikovaným onkologickým onemocněním u mužů ve více než polovině zemí světa. Tradičně je diagnostika karcinomu prostaty založena na změření hladiny prostatického specifického antigenu v krvi, následné biopsií prostaty a patologické vyšetření odebraného vzorku tkáně. Novým typem biopsie je tekutá biopsie, která umožňuje analyzovat přítomnost a množství řady znaků v tělních tekutinách. Konkrétním příkladem může být cirkulující nebuněčná nádorová DNA, která se vyskytuje v krevní plazmě a mohla by umožnit odhalení přítomnosti nádorů a metastáz.

U většiny pacientů se využívá adrogen-deprivační terapie, která však nakonec selže a dochází k přechodu do kastračně-rezistentního stádia, což může být způsobeno mimo jiné amplifikací genu pro androgenový receptor nebo jeho mutacemi. Díky amplifikacím jsou buňky karcinomu prostaty citlivější na nízkou hladinu androgenů, což má za následek nadměrnou expresi adrogenového receptoru. Mutace jako jsou H875Y a T878A, mohou změnit vazebnou afinitu ligandu, která vede ke zvýšení citlivosti vůči steroidním ligandům nebo ke změně antiandrogenů na agonisty. Tyto amplifikace a mutace lze detekovat pomocí nejnovějších přístupů využívajících PCR jako je kapičková a nanodestičková digitální PCR. Zmíněné metody by mohly umožnit včas detekovat nádorové onemocnění, predikovat jeho vývoj a určit vhodnou léčbu pro jednotlivé pacienty.

2 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Bakalářská práce měla tyto cíle:

- Zpracování literární rešerše na téma možnosti využití tekuté biopsie u karcinomu prostaty.
- Práce s buněčnými liniemi LAPC-4, LNCaP, CWR22rv1, VCaP se známými alteracemi androgenového receptoru.
- Optimalizace reakce pro použití u nanodestičkové digitální PCR (Qiagen).
- Srovnání metod pro kapičkovou digitální PCR a nanodestičkovou digitální PCR.
- Vyšetření vzorků plazem z tekuté biopsie pacientů s CRPC na mutace androgenového receptoru pomocí digitální PCR.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty (PCa) je nejčastějším diagnostikovaným onkologickým onemocněním u mužů ve více než polovině zemí světa. Zároveň je pátou hlavní příčinou úmrtí na nádorové onemocnění u mužů v roce 2020. Avšak díky pokrokům v léčbě a dřívější detekci došlo k výraznému snížení úmrtnosti na PCa (Sung et al., 2021).

Podezření na PCa může přijít již při rektálním vyšetření na preventivní prohlídce, kdy je prostata vyšetřena hmatem přes konečník. Poté se změří hladina prostatického specifického antigenu (PSA) v krvi s následnou biopsií prostaty (Naji et al., 2018).

Normální prostatu tvoří buňky stromatu, bazální membrána, bazální epiteliální buňky a sekreční buňky. Sekreční epiteliální buňky potřebují pro přežití androgeny a vyznačují se produkcí PSA, což je jeden ze selekčních markerů buněčné diferenciaci. Naopak bazální epiteliální buňky potřebují androgeny pouze pro stimulaci proliferace a neexprimují PSA (Kolář et al., 2015). PCa vzniká v periferní zóně prostaty transformací benigních epiteliálních buněk na jejich maligní fenotyp (Bott et al., 2021).

3.1.1 Etiologie

Etiologie PCa je stále nejasná, ale je známo velké množství přispívajících faktorů. Prvním rizikovým faktorem je věk. Se zvyšujícím se věkem roste pravděpodobnost vzniku PCa. Až u 50 % mužů ve věku od 70 do 80 let se vyskytují histologické známky malignity (Carter et al., 1990).

Zásadní roli zde hraje i genetická predispozice. Muži, jejichž bratr nebo otec má PCa, mají dvojnásobně až čtyřnásobně vyšší riziko vzniku tohoto karcinomu (Kalish et al., 2000).

Bylo zjištěno, že i etnicita má vliv na vznik PCa. U mužů negroidní rasy je výskyt, závažnost i úmrtnost vyšší ve srovnání s europoidní rasou (Pernar et al., 2018). To může být způsobeno tím, že chemokinový receptor v červených krvinkách, který odstraňuje chemokiny z mikroprostředí nádoru prostaty, je u většiny mužů negroidní rasy vyčerpán (Rani et al., 2019).

Se vznikem PCa souvisí i kouření a alkohol. S rostoucím objemem konzumovaného alkoholu, nebo počtem vykouřených cigaret, roste riziko jeho vzniku (Huncharek et al., 2010).

Obezita a metabolický syndrom mají nepříznivý vliv na PCa, oproti tomu fyzická aktivita a zdravá výživa vedou ke snížení rizika úmrtnosti u mužů na PCa (Ma et al., 2008; Kenfield et al., 2011).

S oddálením věku prvního pohlavního styku klesá riziko PCa. Naopak se zvyšujícím se počtem sexuálních partnerek, riziko roste. Ejakulace dvakrát až čtyřikrát týdně snižuje riziko výskytu tohoto karcinomu (Jian et al., 2018). Samozřejmě i další faktory, jako jsou hormony či záněty, mají vliv na růst PCa (Bott et al., 2021).

3.1.2 Stádia

Aby bylo možné určit vhodný typ léčby, je potřeba nejdříve stanovit stádium karcinomu (Bott et al., 2021). Pokud se PCa nachází uvnitř hranice prostatického pouzdra, jedná se o lokalizovaný karcinom. Po jeho proniknutí do okolních struktur hovoříme o lokálně pokročilém karcinomu. Dalším stádiem je tvorba sekundárních ložisek nádorové tkáně, tedy metastáz v okolí prostaty, ale i ve vzdálených orgánech (často kosti, játra či plíce; Adam et al., 2004).

Pro diagnostické účely se využívá tzv. Gleasonovo skóre, pro které je nutno podstoupit biopsii prostaty. Jedná se o systém, který na základě histologického vyšetření tkáně přiřazuje čísla od 1 do 5. Tkáň, kde se vyskytují nádorové buňky, ale je stále zachováno typické uspořádání žlázek je označena číslem 1. Tkáň, která nejvíce ztratila typické uspořádání buněčných struktur je označena číslem 5. Výsledné Gleasonovo skóre zjistíme na základě nejčastějšího a druhého nejčastějšího typu nádorové tkáně. Výsledné skóre může nabývat hodnot od 2 (1 + 1) do 10 (5 + 5; Epstein et al., 2016).

Dále se používá klinicko-patologický systém TNM klasifikace, který je založen na histopatologickém vyšetření (Eiber et al., 2018). Kde T popisuje karcinom číselným označením udávající velikost, N popisuje rozšíření na lymfatické uzliny a M informuje, jestli se karcinom rozšířil a vznikly metastáze (Galon et al., 2014).

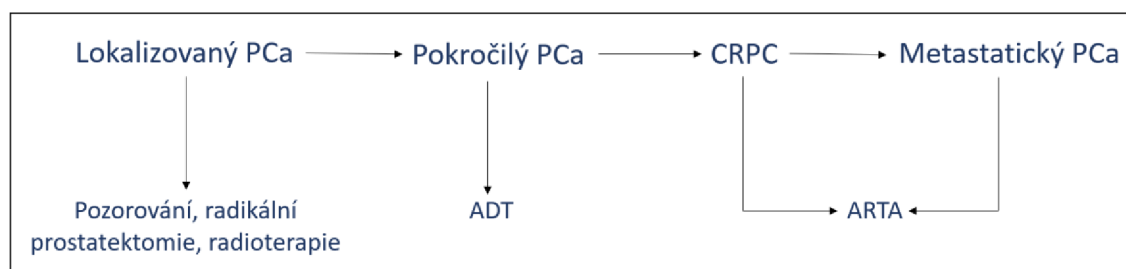
Buňky PCa jsou závislé na androgenech (testosteron a 5 α -dihydrotestosteron (DHT)) pro jejich proliferaci, růst a vývoj. Subklony nádorových buněk, které vznikly vlivem selekčního tlaku androgen-deprivační terapie (ADT), nemají přežití ani růst závislý na androgenech. Díky těmto subklonům vzniká kastročně-rezistentní PCa (CRPC; Kolář et al., 2015).

3.1.4 Léčba

Standardní léčbou pacientů je ADT, která využívá chirurgickou nebo chemickou kastraci. Při chirurgické kastraci dochází k chirurgickému odstranění varlat (orchiektomie), při chemické kastraci se sníží produkce testosteronu ve varlatech použitím agonistů nebo antagonistů hormonů, jež řídí hladinu testosteronu nebo inaktivují jeho funkci (Komura et al., 2017; Crawford et al., 2019). V důsledku kastrace rakovinné buňky nejsou stimulovány androgeny a růst PCa se zastavuje (Bott et al.,

2021). I když je ADT zpočátku úspěšná, tak se nakonec objeví rezistence za vzniku CRPC (Teo et al., 2019).

U CRPC se využívá terapie cílená na androgenový receptor (AR; ARTA), která využívá antagonisty AR a vede k cílené blokaci AR v nádorových buňkách (Ahmed et al., 2014; Obr. 1).



Obr. 1: Schématické znázornění terapie v různých stádiích PCa

Abirateron acetát je inhibitor biosyntézy androgenů, který střídavě přerušuje produkci androgenů ve varlatech, nadledvinách a v samotném nádoru.

Silným blokátorem zacíleným na signální dráhu AR v několika krocích je enzalutamid, který funguje na principu blokace vazby androgenů na AR, inhibici jaderné translokace aktivované AR a na narušení vazby aktivované AR s DNA

V roce 2004 byl k léčbě metastatického CRPC schválen docetaxel, což je derivát taxanu, který se váže na mikrotubuly, zabraňuje jaderné translokaci AR a způsobuje apoptózu. Avšak nakonec se objevuje rezistence i na tento lék (Komura et al., 2017). U pacientů na docetaxel je možné použít cabazitaxel, což je nový taxan vázající tubulin.

Další možností je Sipuleucel-T. Jedná se o aktivní buněčnou imunoterapii z autologních mononukleárních buněk periferní krve s následnou leukaferézou. Bylo zjištěno, že sipuleucel-T má vliv na prodloužení přežití pacientů, ale ne na objektivní progresi onemocnění (Kantoff et al., 2010).

V roce 2013 bylo schváleno radiofarmakum radium-223, které se selektivně zaměřuje na kostní metastázy pomocí částic alfa. Radium se přednostně hromadí v kostech, kde jsou metastázy. Emitované záření alfa částic způsobuje dvouřetězcové zlomy v DNA do 100 um od dosahu bez poškození okolní tkáně (Komura et al., 2017).

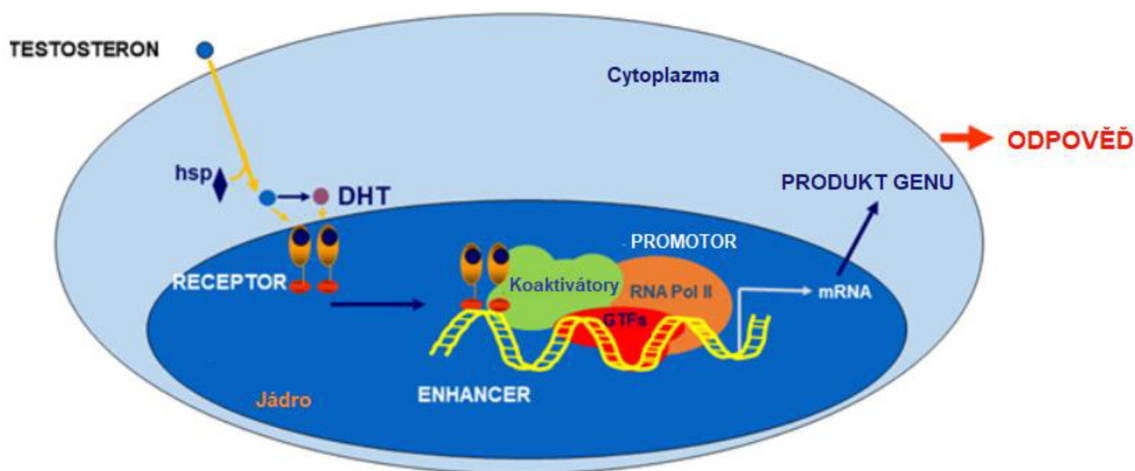
3.2 Androgenový receptor

AR je jedním z jaderných receptorů steroidních hormonů. Jedná se o ligand-dependentní transkripční faktor, který řídí expresi specifických genů. Vazba AR s jeho přirozenými ligandy, kterými jsou DHT a testosteron, vede k aktivaci transkripce genů řízených AR (Tan et al., 2015).

3.2.1 Androgeny a androgenový receptor

Významným androgenem je testosteron, který je syntetizován Leydigovými buňkami ve varlatech, pod regulací luteinizačního hormonu produkovaného přední hypofýzou. Sekrece luteinizačního hormonu je řízena z hypotalamu liberiny a statiny. Vytvořený testosteron cirkuluje většinou vázaný na sérový globulin a albumin, ale do buněk prostaty se dostává pouze volná forma. Testosteron se intracelulárně přeměňuje na účinnější 5 α -redukovaný metabolit testosteronu, DHT, který podporuje růst a přežití buněk prostaty.

Na AR se váže DHT, který vytěsňuje proteiny tepelného šoku (hsp) z AR, řídí interakci mezi N a C konci AR a váže importin- α k translokaci AR do jádra (Tan et al., 2015). V jádře se receptorové dimery vážou na androgenní responzivní elementy v promotorových oblastech pomocí koaktivátorů. Dojde k interakci AR se složkami transkripčního aparátu, jako je RNA polymeráza II (RNA Pol II) a obecné transkripční faktory (GTFs) a probíhá transkripce (Obr. 2; McEwan et al., 2021).



Obr. 2: Schématické znázornění působení androgenů v cílové buňce. Převzato a upraveno z McEwan et al., 2021.

3.2.2 Interakce molekul s androgenovým receptorem

Bylo objeveno velké množství malých molekul, které interagují s AR. Z velké části jsou klasifikovány jako agonisté nebo antagonisté na základě jejich schopnosti aktivovat nebo inhibovat transkripci cílových genů AR.

PCa je spojen se změnami funkcí AR (Tan et al., 2015). Vývoj a růst PCa je řízen testosteronem a DHT, které uplatňují své biologické účinky prostřednictvím vazby na AR (Aurilio et al., 2020).

Buňky PCa, podobné normálním buňkám prostaty, vyžadují k růstu a přežití androgeny. Růst karcinomu prostaty závisí na poměru rychlosti buněčné proliferace k rychlosti buněčné smrti. U buněk PCa je rychlost proliferace vyšší než rychlost úmrtí, což má za následek nepřetržitý růst. Androgeny a AR jsou hlavními regulátory tohoto poměru (Tan et al., 2015).

Byly identifikovány mechanismy rezistence vůči lékům, které vedou k obnovení signalizace AR (Watson et al., 2015). Většina z těchto nádorů nadměrně exprimuje AR a významná část nese amplifikace v genu pro AR (Makkonen et al., 2011). Exprese AR byla nalezena téměř u všech primárních a metastatických PCa, bez ohledu na stadium (Aurilio et al., 2020).

3.2.3 Gen pro androgenový receptor

Gen pro AR se nachází na chromozomu X v lokusu Xq11 - Xq12. Oblast kódující protein má 2757 nukleotidů a zahrnuje osm exonů s introny. Gen pro AR kóduje protein o velikosti 110 kDa složený z 919 aminokyselin (Aurilio et al., 2020). AR se skládá ze tří hlavních funkčních domén a to N-terminální doména (NTD), vazebná doména DNA (DBD) a C-terminální doména vazající ligand (LBD), která je spojena s vazebnou doménou pomocí flexibilní pantové oblasti. Vysoce konzervativní vazebná doména připoutá AR k oblastem promotoru a zesilovače přímou vazbou DNA. Poté aktivační funkce N-terminální domény a C-terminální domény stimulují transkripci závislých genů.

V současné době neexistují žádné strukturní informace o plné délce AR, ale struktury vazebné domény a C-terminální domény byly zkoumány pouze odděleně (Tan et al., 2015).

3.2.4 Výskyt mutací genu pro androgenový receptor v buněčných liniích

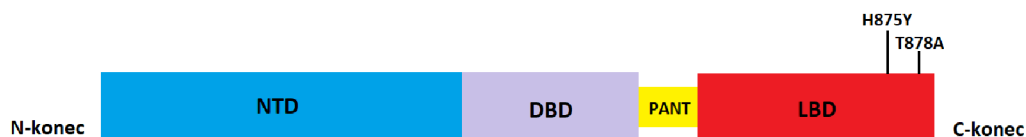
Jak bylo popsáno v předchozí kapitole, léčba PCa je silně založená na blokaci signální dráhy AR (jak ADT, tak i ARTA). Nádory pacientů s kastročně-rezistentní formou onemocnění si vytvořily změny na úrovni DNA či proteinů, vedoucí k proliferaci i za kastročních hladin androgenů. Mezi mechanismy rezistence patří například zvýšená

exprese AR nebo mutace genu pro AR. Z 1029 mutací nalezených v genu, který kóduje AR, predisponuje muže k rakovině prostaty 159 mutací (Tan et al., 2015). Zavedené buněčné linie připomínající situaci u CRPC jsou instrumentálními modely pro zlepšení pochopení molekulárního mechanismu působení AR a vývoje strategií pro zacílení AR u karcinomu prostaty (Makkonen et al., 2011).

U buněk LNCaP se vyskytuje mutace T878A, která byla objevena u 30 % metastatických případů CRPC. Tato mutace umožňuje aktivaci AR jinými adrenálními androgeny, jako je progesteron, dehydroepiandrosteron a androstendiol (Aurilio et al., 2020). Buňky LNCaP obsahují jedinou bodovou mutaci, u které bylo prokázáno, že ovlivňuje jak vazebnou specifitu, tak indukci genové exprese (Garcia et al., 2014).

Buněčná linie CWR22rv1 je androgen-independentní buněčná linie lidského PCa, která byla založena z jednoho hormonálně rezistentního recidivujícího nádoru (Dagvadojr et al., 2008). Obsahuje mutaci H875Y, díky které může dojít k aktivaci AR progesteronem, estrogeny a také různými androgeny (Ledet et al., 2020). U této linie se vyskytuje pouze tato mutace v AR (Dagvadojr et al., 2008).

Mutace jako jsou H875Y a T878A (Obr. 3), mohou změnit vazebnou afinitu ligandu, což má za následek zvýšenou citlivost vůči steroidním ligandům nebo změnu antiandrogenů na agonisty. Všechny tyto mutace lze detekovat pomocí digitální PCR (dPCR; Sumiyoshi et al., 2019).



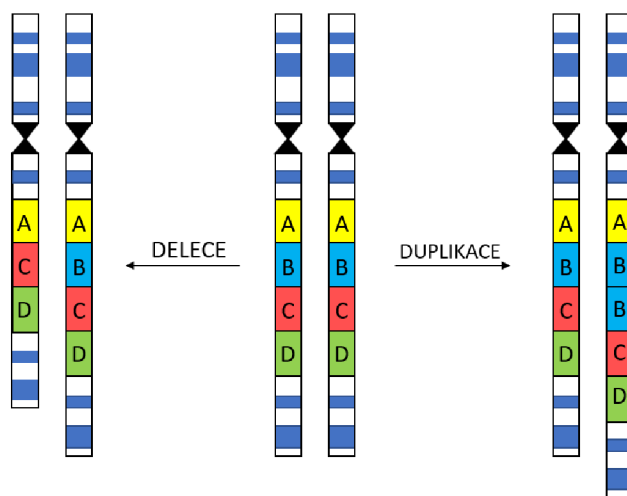
Obr. 3: Schématické znázornění struktury AR s mutacemi H875Y a T878A. NTD je N-terminální doména, DBD je vazebná doména DNA a LBD je C-terminální doména vázající ligand.

Mutace a amplifikace genu AR se vyskytují asi u 1 % primárního PCa a asi u 60 % metastatických nádorů. Pacienti s CRPC léčení antagonisty AR mají vyšší výskyt mutací ve srovnání s pacienty s PCa léčeným samotnou ADT (Aurilio et al., 2020), a proto znalost daného stavu AR by pomohla vybrat nejúčinnější terapii pro každého jednotlivého pacienta (Steinestel et al., 2019).

3.2.5 Variabilita počtu kopií

Důsledkem delece nebo duplikace segmentů DNA dochází k variabilitě počtu kopií (CNV), která vede k různému počtu kopií specifického úseku DNA na homologních chromozomech (Obr. 4). Jedná se o strukturální změnu, která typicky zahrnuje velké segmenty DNA (od 50 bp do několika Mb). V současné době se odhaduje, že běžná

CNV se vyskytuje přibližně v 9,5 % lidského genomu a má nenáhodnou distribuci (Hovhannisyan et al., 2019).



Obr. 4: Schématické znázornění CNV tj. delece nebo duplikace segmentu DNA.

Podle původu jsou CNV jsou rozděleny na CNV vyskytující se spontánně nebo dědičné. CNV rodičovských zárodečných buněk lze detekovat ve všech buňkách potomků, zatímco de novo CNV se nacházejí v konkrétních populacích buněk (například nádorové buňky; Hovhannisyan et al., 2019).

CNV je důležitým zdrojem jak normálních, tak patogenních variací v lidském genomu. Patogenní CNV jsou typicky velmi velké a obsahují více genů zapojených do vývoje a geny, které mají vysoký evoluční počet kopií u savců. Benigní CNV jsou často malé, intergenní nebo zahrnují geny, které mohou tolerovat změnu počtu kopií (Hovhannisyan et al., 2019). CNV je široce přítomna ve tkáních pacientů s malignitami účinnějším a přesnějším způsobem předpovídání chování PCa (Yu et al., 2012).

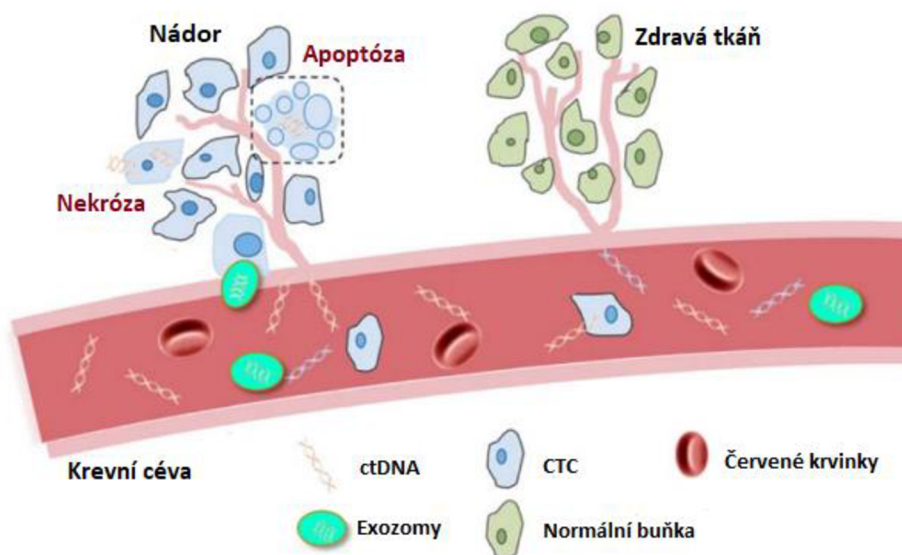
Díky amplifikaci jsou buňky PCa citlivější na nízkou hladinu androgenů, tedy během jedné translace vyrobí několik AR místo jednoho, což pomáhá k nadměrné expresi AR u PCa. Tato amplifikace AR byla zjištěna přibližně u 20 % pacientů s CRPC s metastázemi (Chandrasekar et al., 2015) a vyskytuje se u buněčné linie VCaP (Aurilio et al., 2020).

3.3 Tekutá biopsie

K diagnostice a monitorování PCa je PSA nejrozšířenějším biomarkerem, ale má hned několik nedostatků (Saini, 2016). PSA není specifický jen pro pacienty s nádorovým onemocněním, ale jeho zvýšenou hladinu mohou mít i jedinci s benigní hyperplazií prostaty a prostatitidou. Kvůli nízké specifitě jsou prováděny biopsie prostaty u nenádorových pacientů, což zatěžuje zdravotnický systém i vyšetřovaného jedince (Mistry and Cable, 2003). Dalším nedostatkem je heterogenita nádoru a možné měnící se molekulární složení nádoru, které se může dynamicky vyvíjet v průběhu času, a které nemusí být reflektováno změnou hladiny PSA.

U diagnostice je nezbytné histologické vyšetření vzorku tkáně. U tkáňové biopsie se však setkáváme s problémem, kterým je omezení dostupnosti a opakovatelnosti, cena a časová náročnost. Může dojít k vážným klinickým komplikacím, protože tak, jako každá operace, má i biopsie prostaty řadu rizik (infekce, bolest, krvácení; Yu et al., 2021).

Novou možností sledování vývoje nádorů jsou cirkulující volné materiály jako cirkulující nádorové buňky (CTC) a volné cirkulující nukleové kyseliny jako je například cirkulující nebuněčná nádorová DNA (ctDNA; Wang et al., 2020). Kromě CTC a volných cirkulujících nukleových kyselin se v tělesných tekutinách vyskytují i exosomy (Yu et al., 2021; Obr.5).



Obr. 5: Schéma původu ctDNA, CTC a exozomů z nádorových buněk. Převzato a upraveno z Wang et al., 2017.

Exozomy jsou malé vezikuly uvolňované všemi buňkami do okolních tekutin. Jsou aktivně produkovány nádorovými buňkami, které je využívají k usnadnění růstu a šíření nádoru. Skládají se primárně z proteinů a lipidů tvořících obal, ve kterém může být DNA, mRNA, miRNA (Kok et al., 2020).

Při tvorbě a růstu primárního nádoru se CTC buňky uvolňují do krevního řečiště, kde cirkulují pouze několik hodin. Jejich detekce může probíhat různými metodami, které využívají jejich biologických a fyziologických vlastností. U pacientů s nádorovým onemocněním je k izolaci CTC využívána tekutá biopsie (Heitzer et al., 2015).

Použití CTC jako biomarkerů má omezení v tom, že CTC jsou heterogenní, ne všechny jsou schopny iniciovat metastázy. Mohou poskytnout nové prostředky k monitorování progresu nádorového onemocnění a pomoci při rozhodování o typu léčby, ale jejich použití pro časnou detekci nádorového onemocnění je náročné, ve srovnání s ctDNA (Castro-Giner et al., 2020).

Tekutá biopsie umožňuje analyzovat ctDNA, která se vyskytuje v krevní plazmě, moči a dalších tělních tekutinách. Uvolňování ctDNA do krve může probíhat z CTC, primárních nádorů nebo z metastáz. Tato DNA pochází většinou z nekrotických a apoptických buněk, které uvolňují fragmenty DNA do oběhu (Jahr et al., 2001). Kromě ctDNA, v oběhu proudí ještě bezbuněčná DNA nenádorových buněk (cfDNA), která naředuje ctDNA. U pacientů s pokročilejším onemocněním je obsah ctDNA ve frakci cfDNA asi desetkrát vyšší než u pacientů v brzkém stádiu vývoje rakoviny (Heitzer et al., 2015).

V krvi je nízké a proměnlivé množství ctDNA, proto je potřeba velmi citlivých technologií pro detekci (Alix-Panabières et al., 2016). Analýzy ctDNA u pacientů s karcinomem prostaty mohou odhalit informace o mutacích androgenového receptoru, které souvisí s rezistencí vůči ADT či ARTA (Alix-Panabières et al., 2016).

Tekutá biopsie by mohla sloužit ke sledování nádorově specifických změn v průběhu onemocnění a určení, zda bude specifická léčba použitelná nebo nikoliv a může být použita pro časnou detekci nádorového onemocnění (Heitzer et al., 2015).

Velkou výhodou tekuté biopsie, oproti tkáňové biopsii, je hlavně její neinvazivnost a zisk nových informací odrážejících heterogenitu CRPC. Navíc, jedna tkáňová biopsie je obvykle nedostatečná a neodráží dynamiku nádoru v celé prostatě (Wang et al., 2020).

3.4 Digitální PCR

Jedním z nejnovějších přístupů využívajících polymerázovou řetězovou reakci (PCR) je dPCR, která slouží k absolutní kvantifikaci nukleových kyselin. Dochází k separaci celé reakční směsi do nanolitrových oddílů. Jednotlivé molekuly analytu se rozdělují do replikačních reakcí při limitním ředění, kdy je v každé reakci jedna nebo nula molekul (Hindson et al., 2013). Čím je větší počet kompartmentů, tím je lepší přesnost a lze rozlišit malé koncentrační rozdíly mezi sekvencemi nukleových kyselin ve vzorku. Po proběhnutí dostatečného množství PCR cyklů lze vyhodnotit přítomnost cílové sekvence v dané reakci jako pozitivní nebo negativní na základě fluorescence specifické sondy či nespecifického fluorescenčního barviva. V současné době se využívají dva systémy dPCR a to kapičková dPCR (ddPCR) a nanodestičková dPCR (ndPCR; Hindson et al., 2011).

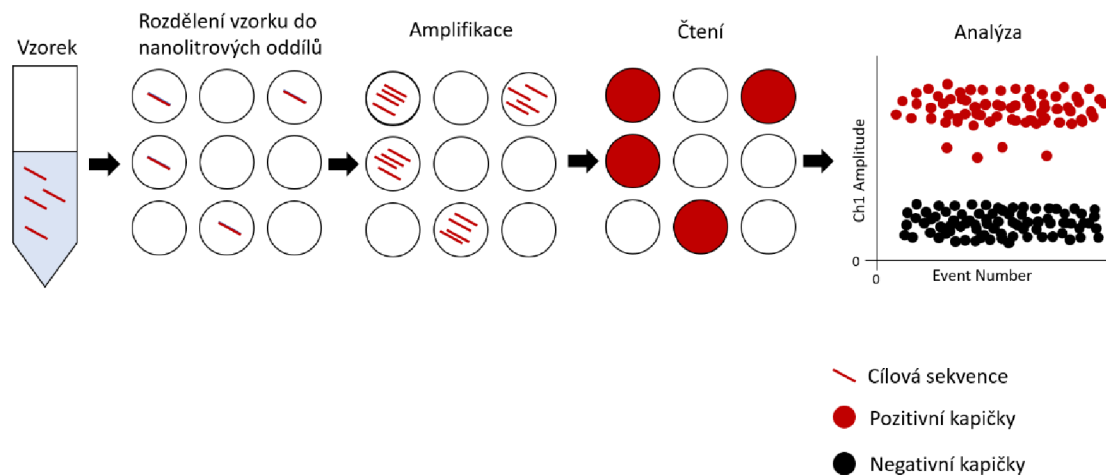
Výhodami dPCR je větší přesnost a citlivost než kvantitativní PCR (qPCR). Koncové měření navíc umožňuje kvantifikaci nukleových kyselin nezávisle na účinnosti reakce a přiřazování pozitivního nebo negativního signálu každé kapce. Také při přítomnosti kontaminantů, které mohou částečně inhibovat Taq polymerázu a nasedání primerů, je ddPCR přesnější než real-time PCR (Taylor et al., 2017).

3.4.1 Kapičková digitální PCR

U ddPCR se ke kompartmentaci hydrofilní PCR směsi používá míchání s olejem, díky kterému dochází k rozdělení vzorků do nanolitrových oddílů. Využívá se mikrofluidních obvodů a chemie povrchově aktivních látek k rozdělení 20 μ l směsi na 20 000 monodisperzních kapiček, ve kterých probíhají jednotlivé amplifikace templátových molekul. Po proběhnutí PCR odečítá průtokový cytometr každou sadu kapiček (Hindson et al., 2011). Stejně jako u qPCR se zde využívají TaqMan sondy, což jsou dvojité barvené sondy, které na 5' konci nesou reportérový fluorofor a na 3' konci molekulu zhášeče (Heid et al., 1996).

Provedení ddPCR zahrnuje několik kroků (Obr. 6). Připraví se reakční směs, která má stejné složení jako pro qPCR, a přenesou se do jednorázové destičky, která se zalaminuje fólií. Destička se vzorky se vloží do generátoru kapek, kde s pomocí oleje a vakua dojde k vytvoření monodisperzních kapiček. Kapky stabilizované povrchově aktivní látkou proudí do sběrného místa, kde se koncentrují v důsledku rozdílné hustoty mezi olejovou a vodnou fází. Destička se ručně přenesou do cycleru a dochází k samotné PCR amplifikaci. Poté se destička vloží do čtečky (readeru), kde jsou kapičky postupně nasávány, odděleny za pomoci injekční cesty s distanční kapalinou a směřovány k detektoru. Specifické štěpení sond TaqMan generuje silný fluorescenční signál

u kapiček, které obsahují templát a jsou detektorem vyhodnoceny jako pozitivní. Negativní kapičky mají vlastní fluorescenční signál z nedokonalého zhášení fluorogenních sond umožňující jejich detekci. Přístroj tedy určí kapku jako pozitivní nebo negativní na základě amplitudy fluorescence a detekčního limitu.



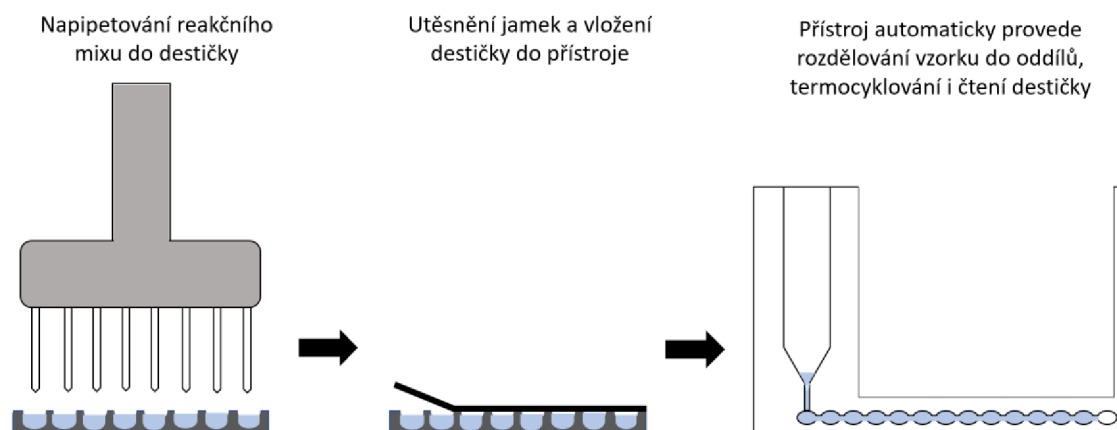
Obr. 6: Schématické znázornění průběhu kapičkové dPCR.

Ideální metodou pro přesnou kvantifikaci nukleových kyselin i z klinických vzorků je ddPCR. Příkladem je určení variability počtu kopií (CNV), kde díky velkému počtu replikátů, je dostatečná přesnost pro měření počtu kopií určitého genu (Hindson et al., 2011).

3.4.2 Nanodestičková digitální PCR

Druhým systémem umožňujícím dPCR je ndPCR, při které se reakční směs rozděluje pomocí mikrofluidní destičky.

Pro provedení ndPCR je potřeba připravit reakční směs, stejně jako pro qPCR, přenést ji na nanodestičku a utěsnit jamky pryžovým těsněním (Obr. 7). Následně se destička vloží do přístroje QIAcuity, který může mít dva nebo pět detekčních kanálů (Qiagen, 2021; Tiwari et al., 2022). V jedné směsi může být detekováno až pět PCR produktů. Po termocyklování je každá jamka analyzována a zpracována pomocí QIAcuity Software Suite (Tiwari et al., 2022). Přítomnost a množství specifických sekvencí, genů, ampliconů nebo mutací je identifikováno specifickými TaqMan sondami. Oddíly obsahující cílovou molekulu DNA, emitují výrazný fluorescenční signál na rozdíl od oddílů neobsahujících cílovou sekvenci sondy. Absolutní kvantifikace pomocí ndPCR eliminuje potřebu použití standardních křivek k určení množství cílové DNA v daném vzorku. Kromě absolutní kvantifikace poskytuje možnost detekce mutací, analýzu editací genomu, CNV a analýzu genové exprese (Qiagen, 2021).



Obr. 7: Schématické znázornění průběhu nanodestičkové dPCR.

Hlavní výhodou ndPCR je, vysoká míra automatizace, která eliminuje lidskou chybu (Qiagen, 2021). Využívá se plně integrovaného systému, kde oddělování reakční směsi do nanolitrových oddílů, termocyklování i zobrazování probíhá na jednom přístroji a odpadá tudíž nutnost manipulace se vzorky během dPCR procesu.

Dále je velký rozdíl v rychlosti provedení ndPCR a ddPCR, přičemž ndPCR probíhá podstatně rychleji (Tiwari et al., 2022) a zároveň je i přesnější díky rovnoměrnému rozdělení do oddílů. Naopak u ddPCR se kapičky mohou lišit svou velikostí, což zkresluje distribuci cílových molekul. Jak u ddPCR, tak i u ndPCR dochází při tvorbě kapiček ke ztrátám, tedy ne celý objem vzorku je analyzován, což může vést k falešně negativním výsledkům u vzorků s nízkou abundancí cílových sekvencí (např. mutace; Qiagen, 2021).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a materiály

4.1.1 Přístrojové vybavení

automatický generátor kapiček (Bio-Rad),
centrifuga 3K30 (Sigma),
centrifuga BR4i (Jouan),
centrifuga Galaxy MiniStar (VWR),
centrifuga LMC-3000 (Biosan),
centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf),
centrifuga MR22i (Jouan),
elektroforetický systém Mini PROTEAN® TetraCell (Bio-Rad),
laminární box MSC-Advantage (Thermo Scientific),
inkubátor HERA cell (Heraeus),
laminární box Aura vertical S.D.4 (Bio-Air),
Light cycler® 480 (Roche),
magnetická míchačka MR 1000 (Heidolph Instruments),
PX1TM PCR utěšňovač fólie na destičku pro ddPCR (Bio-Rad),
Qiacity čtyřplatformový systém pro ndPCR (Qiagen),
QX200TM čtečka kapiček (Bio-Rad),
spektrofotometr Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific),
světelný mikroskop Eclipse TS100 (Nikon),
T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad),
termoblok TS-100C (Biosan),
UV transilluminátor G:BOX (Syngene),
vodní lázeň TW8 (Julabo),
vortex Lab Dancer (IKA),
vortex-Genie 2 (Scientific Industries),
zdroj elektrického napětí (Major Science).

4.1.2 Spotřební materiál a další pomůcky

96-jamkové destičky pro PCR a fólie (Roche),
automatické pipety (Eppendorf),
Bürkerova komůrka (Meopta),
destičky pro ddPCR™ 96-Well Plates (Bio-Rad),
DG32TM Automated Droplet Generator Cartridges (Bio-Rad),

chladicí stojánek (IsoFreeze),
kultivační láhve (Thermo Plastic Products),
mikrozkumavky 2ml (Eppendorf),
mikrozkumavky LoBind 1,5 ml (Eppendorf),
ndPCR destičky QIAcuity Nanoplate 26k 24-jamkové (Qiagen),
ndPCR fólie (Qiagen),
ndPCR stojánek (Qiagen),
ndPCR váleček (Qiagen),
PCR Plate Heat Seal, fólie (Bio-Rad),
sérologické pipety 5 ml (SPL Life Sciences),
sérologické pipety 10 ml (VWR International AVANTOR),
stripy pro PCR (Bioplastic),
špičky na automatické pipety (Eppendorf),
zkumavky 15 ml (Qiagen),
zkumavky 15 ml (GAMA Group).

4.1.3 Chemikálie a roztoky

0,5% trypsin (Sigma),
Amonium persulfát 10% (Serva),
AR CNV assay 20x TaqMan Copy Number Assay 4400291 (ThermoFisher Scientific),
Assay 40x H + WT TaqMan Copy Number Assay C-175239649-10-qsy (ThermoFisher Scientific),
Assay 40x H TaqMan Copy Number Assay rs137852581 (ThermoFisher Scientific),
Assay 40x T878A + WT TaqMan Copy Number Assay C175239651-10-qsy (ThermoFisher Scientific),
Assay 40x T878A TaqMan Copy Number Assay rs137852578 (ThermoFisher Scientific),
deionizovaná voda,
DMEM médium (PAA Laboratories),
DNA-free voda (Qiagen),
EDTA pasážování (Sigma),
ethanol 96% (Fagron),
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000x (Biotium),
isopropanol (mikroCHEM),
mastermix LC480 20x pro qPCR (Roche),
mastermix pro ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad),
mastermix pro ndPCR 20x QIAcuity Probe PCR Kit (Qiagen),

N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva),
nanášecí pufr pro DNA (40 % sacharóza; 0,1M EDTA 0,25% bromfenolová modř),
PBS pasážování (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 2 mM KH₂PO₄,
pH 7,4-7,5),

pufr NeBuffer (BioLab),

QIAamp ccfDNA/RNA Kit (Qiagen):

- RNA spike I,
- Rnase-free voda,
- RPE pufr,
- RPL pufr,
- RPP pufr,
- RWT pufr,

QIAamp DNA Blood Mini Kit:

- AE pufr,
- AL pufr,
- AW1 pufr,
- AW2 pufr,
- proteináza K,
- RNAsa A,

restrikční enzym XbaI (BioLab),

RNAsaP assay 20x TaqMan Copy Number Assay 4403326 (ThermoFisher Scientific),
RPMI médium (Sigma),

směs polyakrylamid s bisakrylamidem 30% (Serva),

standard molekulové hmotnosti-HyperLadder 25 bp (Bioline),

TBE pufr 5x (445 mM Tris (NH₂C(CH₂OH)₃), 445 mM kyselina boritá (H₃BO₃), 10 mM
EDTA, pH 8,2-8,4).

4.1.4 Biologický materiál

V této práci byly použity buněčné linie LNCaP, CWR22rv1, LAPC-4 a VCaP odvozené od karcinomu prostaty. Buněčné linie LNCaP, CWR22rv1 a VCaP byly zakoupeny z American Type Culture Collection (ATCC), linie LAPC-4 byla získána od Mgr. Karla Součka, Ph.D (Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita, Brno).

Pro experimentální ověření přítomnosti CNV AR a mutací genu pro AR byl použit soubor 46 vzorků izolované DNA, která byla získána pomocí izolačního kitu QIAamp ccfDNA/RNA Kit (QIAGEN) podle návodu výrobce. Vstupním materiálem pro izolaci byla krevní plazma od pacientů s karcinomem prostaty a pacientů bez nádorového

onemocnění z urologické kliniky, kteří podepsali informovaný souhlas. Průměrný věk pacientů s karcinomem prostaty byl 64 let, přičemž průměrný věk začátku ARTA byl 74 let. Aktuální klinická data 43 pacientů s karcinomem prostaty byla doplněna k datu 8. 3. 2023 (Tab. 1), ale informace k třem patientským vzorkům (PL 308, PL 320 a PL 325) zatím nebyly dodány. Tato práce byla schválena etickou komisí UP a Fakultní nemocnice Olomouc.

Tab. 1: Klinická data souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty (n=43).

Charakteristika	Počet pacientů
Hormonálně senzitivní PCa	2
Metastatický hormonálně senzitivní PCa	10
Kastračně-rezistentní PCa	2
Metastatický kastračně-rezistentní PCa	29
Léčba ARTA	38
z toho abirateron	26
z toho enzalutamid	6
jiná	6
Kastrace	43
Docetaxel	8

4.2 Metody

4.2.1 Sběr krve a izolace plazmy

Plná krev byla odebírána na Onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc pacientům s indikovanou léčbou ARTA do 7,5 ml zkumavky s EDTA. Nesrážlivá krev byla do 2 hodin od odběru zcentrifugována (120 g, 20 min, pokojová teplota) a plazma byla přenesena po 1 ml do 2 ml mikrozkušavky a zamražena. Od jednoho pacienta byla takto získána mezi 2 a 3 ml plazmy. Plazma byla skladována v -80°C do izolace nukleových kyselin.

4.2.2 Izolace ccfDNA/RNA z plazmy

Z 2 ml plazmy byla izolována ccfDNA/RNA pomocí QIAamp ccfDNA/RNA kitu podle postupu od výrobce. K plazmě byly přidány 2 µl RNA spike I (1 µl na 1 ml plazmy) a 300 µl RPL pufru (300 µl na 1 ml plazmy). Směs byla vortexována 5 sekund a inkubována 3 minuty při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 100 µl RPP pufru (100 µl na 1 ml plazmy) a vortexováno více než 20 sekund s navazující inkubací 3 minuty na ledu. Poté byl vzorek centrifugován 3 minuty při 12 000 g.

Supernatant (asi 1 ml) byl přenesen do nové patnácti mililitrové zkumavky, která byla chlazená na ledu. K supernatantu bylo přidáno stejné množství vychlazeného izopropanolu a přerušovaně vortexováno.

Dále byly 4 ml vzorku přeneseny na kolonu Rneasy Midi spin column v patnácti mililitrové zkumavce. Kolony byly centrifugovány 1 minutu při 5000 g. Eluát byl vylit a pokud zbyl vzorek, tak tento krok byl zopakován. Na kolonu byly přidány 4 ml RWT pufru a kolona byla centrifugována 1 minutu při 5000 g. Eluát byl vylit a na kolonu bylo napipetováno 2,5 ml RPE pufru s následnou centrifugací 5 minut při 5000 g. Kolona byla přenesena do nové patnácti mililitrové zkumavky a bylo přidáno 200 µl Rnase-free water přímo na střed kolony. Proběhla inkubace 1 minutu a vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 5000 g.

4.2.2.1 Přechištění

K 200 µl eluátu bylo přidáno 200 µl RPL pufru a 800 µl 96% etanolu. Směs byla zvortexována a 700 µl bylo přeneseno na kolonku RNeasy MinElute spin column. Kolonky byly centrifugovány 30 sekund při 8000 g a eluát byl vylit do odpadu. Tento krok byl opakován i se zbytkem vzorku. Kolonka byla promyta 500 µl RPE pufru a 500 µl 80% etanolu vždy s následnou centrifugací 30 sekund při 8000 g.

Kolonka byla přemístěna do nové mikrozkušavky bez víčka a centrifugována 5 minut při plné rychlosti (18407 g). Následně byla předána do nové mikrozkušavky. Na střed kolony bylo napipetováno 20 µl vody (Rnase free-water) s 1 minutovou inkubací. Poté byla kolonka centrifugována 1 minutu při plné rychlosti (18407 g). V eluátu byla izolována ccfDNA/RNA, jejíž koncentrace byla následně změřena pomocí nanodropu. K vyblankování bylo použito 1,3 µl vody a pro měření 1 µl vzorku.

4.2.3 Digitální kapičková PCR

4.2.3.1 Příprava vzorků pro digitální kapičkovou PCR

Změřené koncentrace izolované ccfRNA byly přepočítány na koncentrace DNA podle vzorce $cDNA = \frac{cRNA \times 50}{40}$, kde cDNA je koncentrace DNA [ng/µl] a cRNA je koncentrace RNA [ng/µl].

Vzorky byly naředěny na koncentraci 4 ng/µl pro celkový objem 12 µl. Kromě DNA z plazem bylo ještě použito 5 µl 50% DNA buněk VCaP jako pozitivní kontrola a jako negativní kontrola sloužilo 12 µl vody.

Do stripů bylo napipetováno dané množství vody, mastermixu, CNV assay (20x) a RNAsaP assay (20x). Mix byl promíchán, krátce zcentrifugován a rozpipetován do destičky pro ddPCR. K mixu byla pipetována ccfDNA o koncentraci 4 ng/µl (Tab. 2).

Tab. 2: Množství složek v jamkách pro ddPCR.

Složka	Objem v jedné jamce [µl]	Objem v 96 jamkách [µl]	Objem v 96 jamkách + rezerva [µl]
Voda	4	384	400
Mastermix	11	1056	1100
CNV assay (20x)	1	96	100
RNAsaP assay (20x)	1	96	100
DNA (4ng/ul)	5	480	500
celkem	22	2112	2200

4.2.3.2 Provedení digitální kapičkové PCR

Na destičku byla položena stříbrná fólie a destička byla vložena do kovového stojánku přístroje PX1™ PCR plate sealer, kde byla fólie přitavena k destičce. Destička byla vortexována 5 sekund na každém rohu a na dvou pozicích uprostřed a krátce zcentrifugována.

Do generátoru kapiček byla vložena destička se vzorky na chladícím stojánku a bylo spuštěno generování kapiček. Následně byla na destičku zatavena nová fólie

pomocí přístroje PX1™ PCR plate sealer a vložena do cycleru (T100™ Thermal Cycler). Byl spuštěn program dle Tab. 3.

Tab. 3: Program pro ddPCR.

Program	Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
1	Preinkubace	95	10 min	1
	Denaturace	95	15	45
	Annealing	60	30	
	Extenze	60	30	
	Chlazení	4	30	1

Po skončení programu byla destička přesunuta do stojánuk čtečky kapiček (QX200 droplet reader) a byla zajištěna kovovým poklopem. Byl spuštěn software QuantaSoft, ve kterém byly označeny vzorky a nastaveny názvy vzorků, experimentu a assayí. Po dokončení čtení byly jednotlivé jamky analyzovány a nastaveny tresholdy 6000 a 5000 (na základě předchozích experimentů).

4.2.4 Kultivace buněčných linií a příprava vzorků pro izolaci DNA

Nádorové buňky LNCaP s mutací T878A byly kultivovány v RPMI médiu, které obsahovalo 180 ml RPMI, 20 ml fetálního hovězího séra, 2 ml pyruvátu sodného 2 ml L-glutaminu a 2 ml PN-ST. V tomto médiu byly kultivovány i nádorové buňky linie CWR22rv1 s mutací H875Y.

Nádorové buňky linie LAPC-4, jež neobsahují mutaci AR a nádorové buňky linie VCaP byly kultivovány v DMEM médiu, obsahující 180 ml DMEM, 20 ml fetální hovězí sérum, 2 ml L-glutamin a 2 ml PN-ST. Kultivace probíhala v kultivačních lahvích v inkubátoru o teplotě 37 °C a dle potřeby bylo provedeno pasážování. Po pasážování byly buňky rozsuspendovány v PBS, 3x omyty v PBS, centrifugovány a nakonec nasucho zamrazeny při -80 °C.

4.2.5 Izolace DNA z buněk

Izolace DNA z buněk byla provedena pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) podle postupu od výrobce. Pelet buněk byl rozsuspendován v 180 µl 1x PBS. Ke vzorku bylo napipetováno 20 µl proteinázy K, 4 µl RNasy A a 200 µl AL pufru. Směs byla vortexována 15 sekund a inkubována 10 minut při 56 °C, přičemž v polovině kultivace byl vzorek lehce promíchán. Vzorek byl krátce centrifugován při 6000 g a bylo přidáno 200 µl 96% etanolu. Poté byl vzorek vortexován 15 sekund a krátce centrifugován při 6000 g.

Následně byl vzorek přenesen na kolonu a centrifugován 1 minutu při 6000 g. Eluát byl vylit do odpadu a na kolonu bylo nanášeno 500 µl AW1 pufru. Následovala centrifugace 1 minutu při 6000 g. Eluát byl opět vylit a na kolonu bylo napipetováno 500 µl AW2 pufru. Kolona byla centrifugována 3 minuty při 20 000 g a následně přenesena do nové mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Na kolonu bylo napipetováno 50 µl AE pufru a vzorek byl inkubován 1 minutu při pokojové teplotě, poté centrifugován 1 minutu při 6000 g. V eluátu byla izolovaná DNA, jejíž koncentrace byla změřena pomocí nanodropu. K vyblankování bylo použito 1,3 µl AE pufru a pro měření 1 µl vzorku.

4.2.6 Kvantitativní PCR pro ověření specifčnosti assayí

Nejdříve byla naředěna izolovaná DNA z buněk LNCaP, CWR22rv1, VCaP a LAPC-4 na koncentraci 5 ng/µl. Následně byly připraveny dva mixy (každý pro 8 jamek, v jedné jamce bylo 20 µl reakční směsi), které obsahovaly mastermix, vodu a assay, přičemž do jednoho mixu byla přidána assay pro detekci mutace H875Y a do druhého mixu assay pro detekci T878A (Tab. 4).

Tab. 4: Množství složek v jamkách pro qPCR

Složka	Objem v jedné jamce [µl]	Objem pro 8 jamek [µl]
Mastermix (2x konc.)	10,0	80,0
Voda	5,5	44,0
Assay (40x konc.)	0,5	4,0
DNA (5 ng/µl)	4,0	32,0

Mixy byly rozpipetovány do stripů pro PCR a na závěr byly přidány 4 µl DNA o koncentraci 5 ng/µl (20 ng DNA na jamku), tak aby DNA z každé buněčné linie (LNCaP, LAPC-4, CWR22rv1, VCaP) byla v mixu pro mutaci T878A i v mixu pro mutaci H875Y v duplikátu. Jako negativní kontrola byla místo DNA použita voda. Stripy byly uzavřeny, vortexovány, 1 minutu centrifugovány a vloženy do cycleru LightCycler® a byl spuštěn program dle Tab. 5. Po dokončení programu byly výsledky vyhodnoceny.

Tab. 5: Program pro qPCR.

Program	Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
1	Preinkubace	95	15 min	1
	Denaturace	95	20	50
	Annealing	60	20	
	Extenze	72	20	
	Chlazení	40	30	1

Stejný postup byl použit i při qPCR s assayemi, které sloužily k detekci mutované i nemutované alely (wild type, WT).

4.2.7 Elektroforéza pro ověření stavu produktů

Byla sestavena elektroforetická aparatura s použitím skel pro tloušťku gelu 1,5 mm a byl vybrán vhodný hřebínek. Byl připraven 6% polyakrylamidový gel smícháním 22,96 ml deionizované vody, 7 ml 30% směsi polyakrylamid s bisakrylamidem, 3,5 ml 5x Tris-borát-EDTA (TBE) pufru, 400 μ l 10% amonium persulfátu a 22,5 μ l N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu (TEMED). Směs byla promíchána, nanášena mezi sestavená skla a byl vložen hřebínek.

Po ztuhnutí gelu (po 45 minutách) byl vytažen hřebínek. Skla byla vložena do elektroforetické komory a zalita 700 ml 0,5x TBE pufru. Do jednotlivých jamek gelu byly nanášeny vzorky připravené smícháním 10 μ l PCR produktu (PCR produkty z kapitoly 4.2.6) s 1 μ l nanášecího pufru (celkový objem vzorku v jamce činil 10 μ l). Jako poslední byly do jamky napipetovány 3 μ l hmotnostního standardu pro kontrolu molekulové hmotnosti.

Následně byla elektroforetická komora připojena ke zdroji elektrického napětí s nastavením na 100 V. Po elektroforetické separaci (po 60 minutách) byl gel vložen do barvicího roztoku (Gel-red) na 45 minut a poté do deionizované vody. Vizualizace separovaných PCR produktů byla provedena pomocí UV transiluminátoru.

4.2.8 Zjištění citlivosti assayí pomocí kvantitativní PCR

Byla připravena diluční řada smícháním DNA z buněčných linií LNCaP s mutací T878A a CWR22rv1 s mutací H875Y dle Tab. 6. Vzorky byly připraveny do objemu 48 μ l o koncentraci 5 ng/ μ l DNA.

Tab. 6: Diluční řada DNA z LNCaP a CWR22rv1.

Zastoupení DNA z LNCaP [%]	Zastoupení DNA z CWR22rv1 [%]
100,0	0,0
99,9	0,1
99,0	1,0
90,0	10,0
75,0	25,0
50,0	50,0
25,0	75,0
10,0	90,0
1,0	99,0
0,1	99,9
0,0	100,0

Byly připraveny tři mixy, které obsahovaly mastermix, vodu a assay, přičemž do jednoho mixu byla použita assay pro mutaci H875Y, do druhého assay pro mutaci T878A (Tab. 7) a do třetího byly smíchány obě assay (Tab. 8). Mix byl rozpipetován do PCR destičky a na závěr byly přidány 4 μ l DNA o koncentraci 5 ng/ μ l (20 ng DNA na jamku). Na PCR destičku byla nalepena fólie. Destička byla centrifugována 2 minuty při 280 g a vložena do cycleru LightCycler®. Byl použit stejný program jako v Tab. 5. Po ukončení programu byly vyhodnoceny výsledky.

Tab. 7: Množství složek v jamkách s použitím buď assaye pro mutaci H875Y nebo T878A.

Složka	Objem v jedné jamce [μ l]	Objem pro 23 jamek [μ l]
Mastermix 2x	10,0	230,0
Voda	5,5	126,5
Assay 40x	0,5	11,5
DNA (5 ng/ μ l)	4,0	92,0

Tab. 8: Množství složek v jamkách s použitím obou assayí (pro H875Y i T878A).

Složka	Objem v jedné jamce [μ l]	Objem pro 23 jamek [μ l]
Mastermix 2x	10,00	230,00
Voda	5,50	126,50
Assay H 40x	0,25	5,75
Assay T 40x	0,25	5,75
DNA (5 ng/ μ l)	4,00	92,00

4.2.9 Fragmentace DNA a následná kvantitativní PCR

Byla připravena diluční řada stejně jako v Tab. 6, s rozdílem, že vzorky byly připraveny do objemu 17 μ l o koncentraci 20 ng/ μ l DNA. Ke každému vzorku bylo přidáno 2,5 μ l pufru NeBuffer a 0,5 μ l enzymu XbaI. Směs byla inkubována jednu hodinu při 37 °C.

Stejně jako v kapitole 4.2.8 byly připraveny tři mixy, které byly rozpipetovány do PCR destičky a byl přidán 1 μ l připravené naštěpené DNA (20 ng DNA na jamku). Destička byla centrifugována 2 minuty při 280 g a vložena do cycleru LightCycler®. Byl použit stejný program jako v Tab. 5. Po dokončení programu byly výsledky vyhodnoceny.

4.2.10 Nanodestičková digitální PCR s použitím DNA z buněčných linií

Byl připraveny mixy dle Tab. 9 a 10. První mix (Mix 1) byl připraven pro 9 jamek (jedna jamka byla rezervní) smícháním mastermixu, vody, assaye pro RNasuP a assaye pro mutaci H875Y a WT. Druhý mix (Mix 2) byl připraven pro 9 jamek (jedna jamka byla rezervní) stejně jako Mix 1, jen místo assaye pro mutaci H875Y a WT byla použita assay

pro mutaci T878A, které bylo použito poloviční množství, jelikož nemá fluorofor pro WT. Tyto mixy byly rozpipetovány do stripů po 40,95 μl a byl přidáno 1,05 μl DNA o koncentraci 20 ng/ μl (20 ng DNA na jamku). Do Mixu 1 byla přidána 100,0%, 99,9%, 99,0% a 90% DNA z LNCaP a CWR22rv1 z Tab. 6 vždy v duplikátu. K Mixu 2 byla pipetována 10,0%, 1,0%, 0,1% a 0% DNA DNA z LNCaP a CWR22rv1 z Tab. 6 vždy v duplikátu (Tab. 9).

Tab. 9: Množství složek v mixu 1 a 2 pro ndPCR

Složka	Objem v jedné reakci (42 μl) [μl]	Mix 1 [μl]	Mix 2 [μl]
Mastermix (4x)	10,500	94,500	94,500
Voda	27,830	255,150	259,880
Assay T (40x)	0,525	0,000	4,725
Assay H (40x)	1,050	9,450	0,000
Assay RNasaP (20x)	1,050	9,450	9,450
Assay CNV AR (20x)	0,000	0,000	0,000
DNA	1,050	9,450	9,450

Následující mixy byly připraveny přímo do stripů dle Tab. 10 a byla použita DNA 50% z LNCaP a 50% z CWR22rv1, která byla nachystána v kapitolách 4.2.8 a 4.2.9. Třetí mix (Mix 3) obsahoval obě assaye pro mutace (pro H875Y i T878A). Mix byl připraven přímo do stripu a bylo pipetováno čtyřnásobné množství DNA (80 ng DNA na jamku). Ve čtvrtém mixu (Mix 4) byly také obě assaye pro mutace, ale bylo zde pětikrát menší množství DNA (4 ng DNA na jamku). Pátý mix (Mix 5) obsahoval obě assaye pro mutace a 20 ng DNA (20 ng DNA na jamku).

Šestý mix (Mix 6) obsahoval i assay pro detekci CNV genu pro AR. DNA i v tomto posledním mixu bylo 20 ng na jamku.

Tab. 10: Množství složek v mixu 3, 4, 5 a 6 pro ndPCR

Složka	Mix 3 [μl]	Mix 4 [μl]	Mix 5 [μl]	Mix 6 [μl]
Mastermix (4x)	10,500	10,500	10,500	10,500
Voda	24,680	28,665	27,825	25,200
Assay T (40x)	0,525	0,525	0,525	1,050
Assay H (40x)	1,050	1,050	1,050	2,100
Assay RNasaP (20x)	1,050	1,050	1,050	2,100
Assay CNV AR (20x)	0,000	0,000	0,000	0,000
DNA	4,200	0,210	1,050	1,050

Všechny stripy se vzorky byly vortexovány a krátce centrifugovány. Následně byly jednotlivé vzorky, připravené do stripů, pipetovány po 40,2 μl (0,2 μl rezerva) do ndPCR destičky, která byla upevněna ve stojánku. Následně byla na destičku

nalepena fólie, která byla pomocí válečku ještě lépe upevněna. Destička byla vložena do cycleru pro ndPCR a byl spuštěn program z Tab. 11, přičemž byly zapnuty všechny kanály pro detekci signálu. Po dokončení programu byly výsledky vyhodnoceny.

Tab. 11: Program pro ndPCR.

Program	Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
1	Preinkubace	95	2 min	1
	Denaturace	95	20	50
	Annealing	60	20	
	Extenze	72	20	

4.2.11 Nanodestičková digitální PCR s použitím DNA z buněčných linií a plazem

Byly připraveny mixy dle Tab. 12. Ve všech mixech byl mastermix, voda, assay pro RNAsuP, assay pro CNV AR, assay pro detekci mutace T878A a assay pro mutaci H875Y a WT. První mix (Mix A) byl připraven pro 7 jamek (jedna jamka rezerva) vzorků buněčné DNA. Po připravení tohoto mixu byl mix rozpipetován do stripu a vždy v duplikátu bylo přidáno 1,05 µl buněčné DNA (koncentrace DNA byla 20 ng/µl, 20 ng DNA na jamku) 10% VCaP, 1% VCaP, a 0,1% VCaP. Druhý mix (Mix B) byl určen pro DNA izolovanou z plazem a to pro 10 jamek (jedna jamka negativní kontrola, jedna jamka rezerva). Po rozpipetování mixu B do stripů bylo pipetováno 5,25 µl DNA z plazmy (koncentrace DNA byla 4 ng/µl, 20 ng DNA na jamku) vždy v duplikátu. Jako negativní kontrola byl použit Mix B s vodou místo DNA.

Tab. 12: množství složek v mixu A a B.

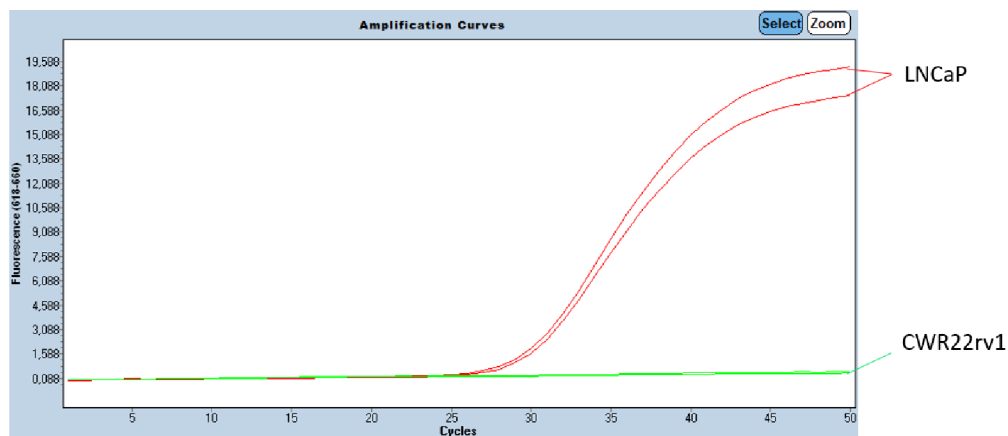
Složka	Objem v jedné reakci (42µl) [µl]	Mix A pro 7 reakcí [µl]	Mix B pro 10 reakcí [µl]
Mastermix (4x)	10,500	73,500	105,000
Voda	27,775	194,425	217,750
Assay T (40x)	0,525	3,675	5,250
Assay H (40x)	1,050	7,350	10,500
Assay RNAsaP 20x	1,050	7,350	10,500
Assay CNV AR (20x)	1,050	7,350	10,500
DNA	1,050	7,350	52,500

Všechny stripy se vzorky byly vortexovány a krátce centrifugovány. Následně byly jednotlivé vzorky, připravené do stripů, pipetovány po 40,2 µl (0,2 µl rezerva) do ndPCR destičky, která byla upevněna ve stojánku. Následně byla na destičku nalepena fólie, která byla pomocí válečku ještě lépe upevněna. Destička byla vložena do cycleru a byl spuštěn program z Tab. 11, přičemž byly zapnuty všechny kanály pro detekci signálu. Po dokončení programu byly výsledky vyhodnoceny.

4.3 VÝSLEDKY

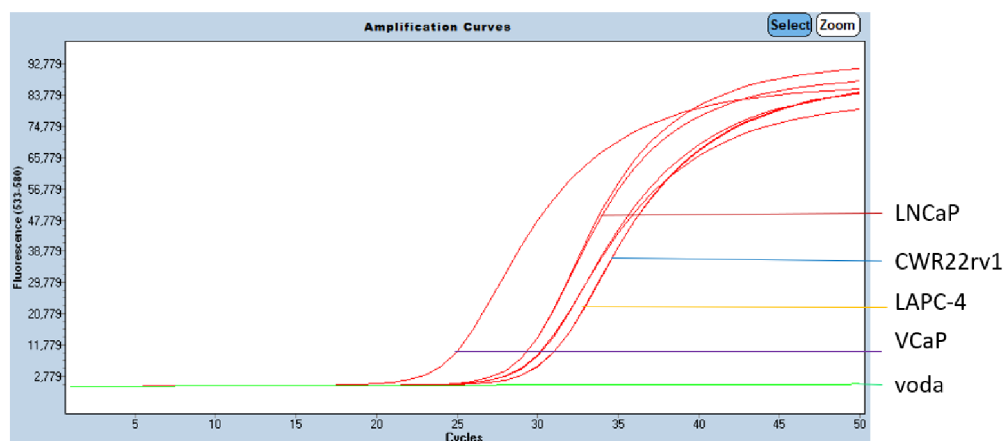
4.3.1 Ověření specifičnosti assayí pro mutace T878A a H875Y

Byla provedena qPCR s využitím dvou detekčních kanálů. Kanál ROX (580-623 nm) pro assay k detekci mutace T878A a kanál ATTO (533-580 nm) pro assay k detekci mutace H875Y. Při použití assaye pro detekci mutace T878A byl pozitivní signál u DNA buněčné linie LNCaP a negativní u CWR22rv1, což bylo očekáváno (Obr. 8). Bylo tedy zjištěno, že tato assay byla specifická.



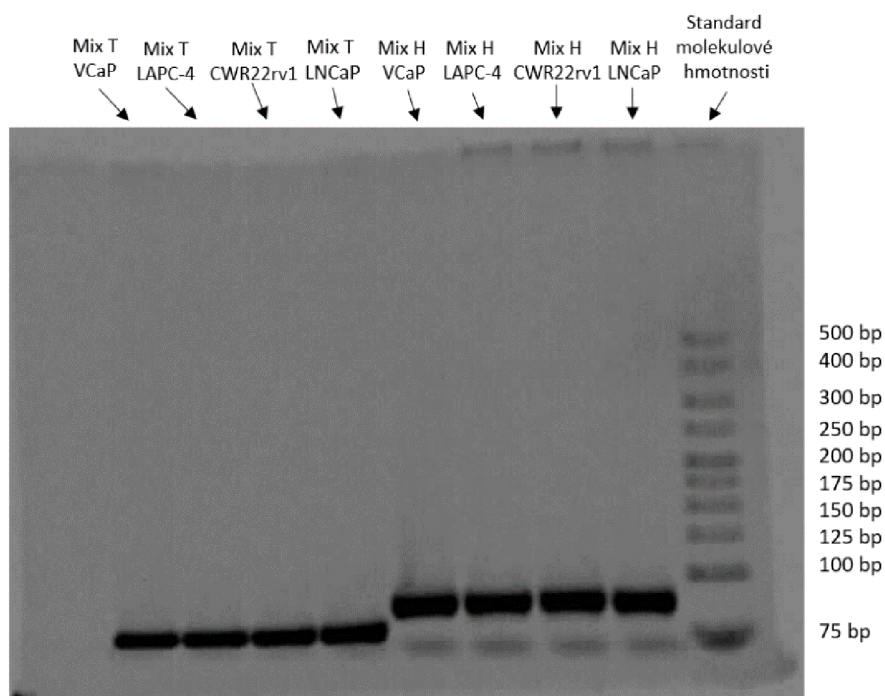
Obr. 8: Křivky qPCR za podmínek z Tab. 4 s použitím assaye pro detekci mutace T878A.

Při použití assaye pro detekci mutace H875Y, byl patrný pozitivní signál ve všech vzorcích DNA buněčných linií (Obr. 9). Pozitivní signály u DNA všech buněčných linií odpovídaly přítomnosti genu pro AR. U vzorku DNA buněčné linie VCaP, který nese amplifikaci genu pro AR, byla pozorována hodnota Ct nižší než u DNA ostatních linií, což odpovídalo naší teorii, že tato assay odrazovala množství AR, ale ne příslušnou mutaci. Assay pro detekci mutace H875Y tedy nebyla specifická.



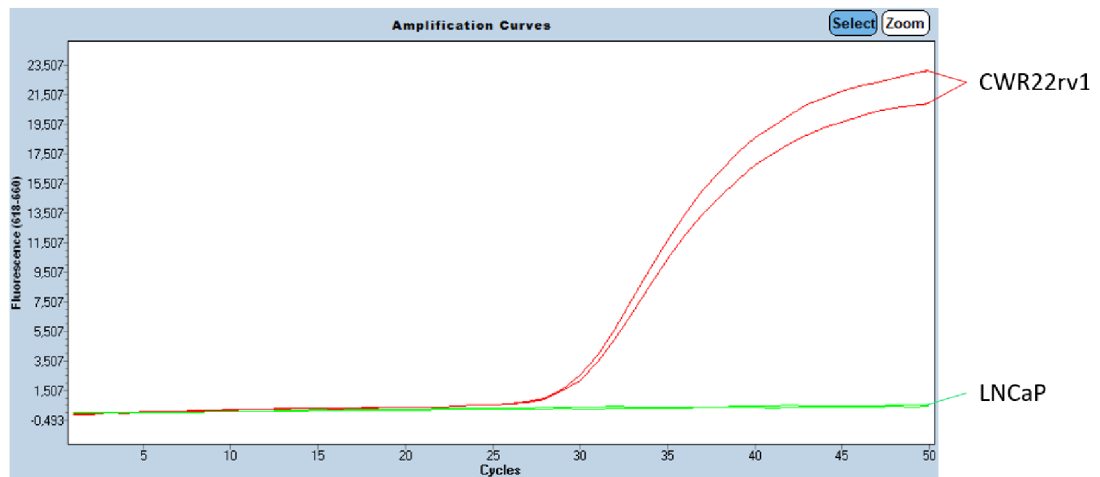
Obr. 9: Křivky qPCR za podmínek z Tab. 4 s použitím assaye pro detekci mutace H875Y.

Pro kontrolu stavu produktů byla provedena gelová elektroforéza, při které bylo zjištěno, že v každé jamce byl přítomen PCR produkt, a to i u vzorků, které byly na qPCR negativní (Obr. 10). Během PCR reakce tedy došlo k amplifikaci DNA, ale taq-man sonda specifická pro mutaci negenerovala signál, a proto byl vzorek negativní v případě assaye pro detekci mutace T878A. qPCR produkty se lišily svojí velikostí, kdy při použití assaye pro detekci mutace H875Y měl produkty menší molekulovou hmotnost než při použití assaye pro detekci mutace T878A. Navíc se u assaye pro detekci mutace H875Y vyskytoval ještě druhý band o velikosti 70 bp.



Obr. 10: Kontrola produktů qPCR vzorků DNA buněčných linií s assayí pro detekci mutace H875Y a s assayí pro detekci mutace T878A pomocí gelové elektroforézy. Produkty qPCR byly očekávány o velikosti 75-100 bp. U assaye pro detekci mutace H875Y byl přítomen i produkt nespecifické reakce o menší velikosti.

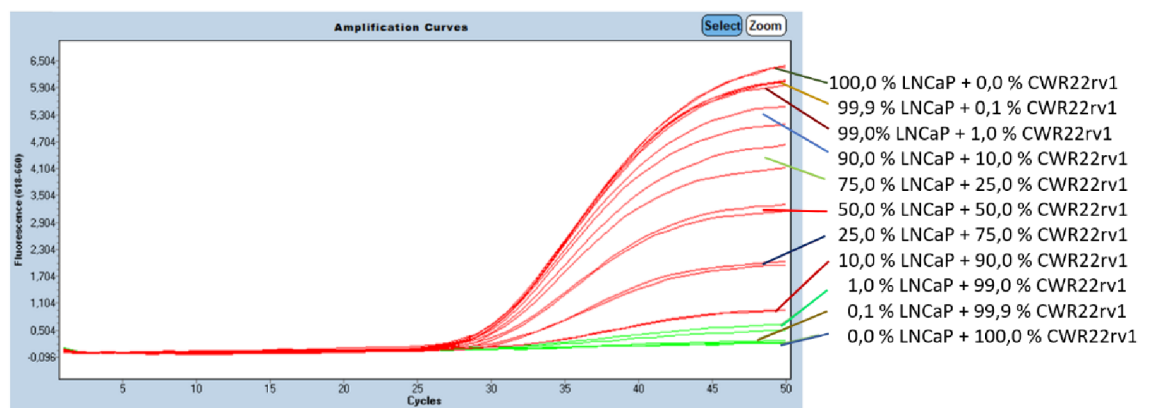
Kvůli nespecifičnosti assaye pro detekci mutace H875Y byla použita assay, která detekovala mutaci H875Y i WT alelu pomocí 2 fluoroforů. Byla provedena qPCR s touto assay, při které bylo zjištěno, že signál je pozitivní u DNA buněčné linie CWR22rv1, ale negativní u LNCaP (Obr. 11). Tedy assay pro detekci mutace H875Y spolu s WT alelou AR byla již specifická a všechny další experimenty byly prováděny s touto assayí.



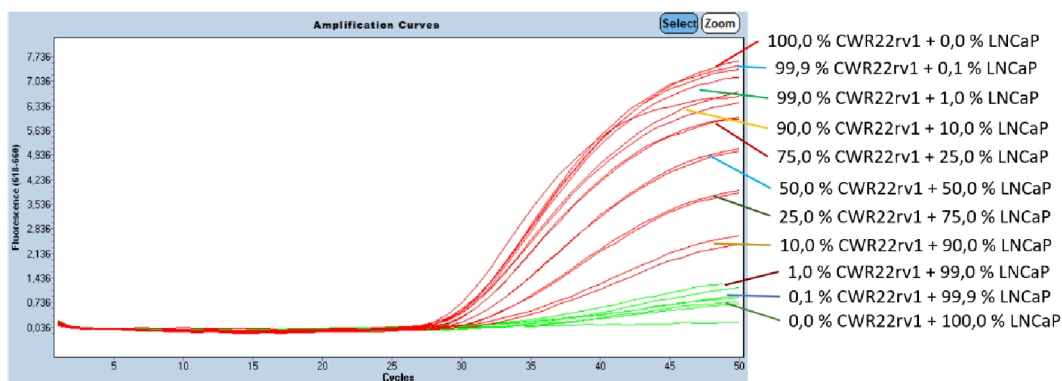
Obr. 11: Křivky qPCR za podmínek z Tab. 4 s použitím assaye pro detekci mutace H875Y a WT alely AR.

4.3.2 Zjištění citlivosti assayí

Pro zjištění citlivosti assayí pro detekci mutace T878A a H875Y byla připravena diluční řada, která obsahovala různé koncentrace DNA z buněčných linií LNCaP a CWR22rv1. Po provedení qPCR pro detekci mutace T878A bylo zjištěno, že s klesající koncentrací DNA LNCaP na pozadí DNA CWR22rv1 klesá i průběh křivky. Byla zjištěna citlivost assaye, a to 10 % DNA LNCaP na pozadí 90 % DNA CWR22rv1 (Obr. 12). Nižší zastoupení DNA LNCaP již nebylo možné odlišit, jelikož křivka neměla charakteristický pozitivní průběh. U mutace H875Y byla detekována stejná citlivost assaye, a to 10 % CWR22rv1 na pozadí 90 % LNCaP (Obr. 13).

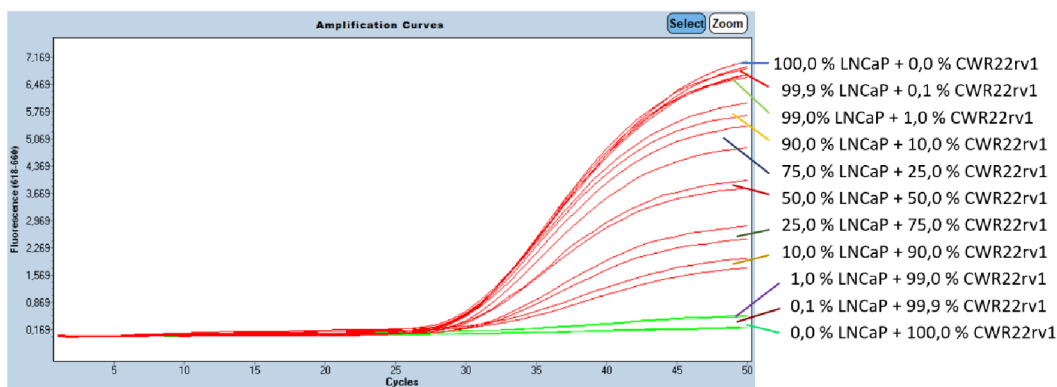


Obr. 12: Křivky qPCR diluční řady s použitím assaye pro detekci mutace T878A za podmínek z Tab. 4.

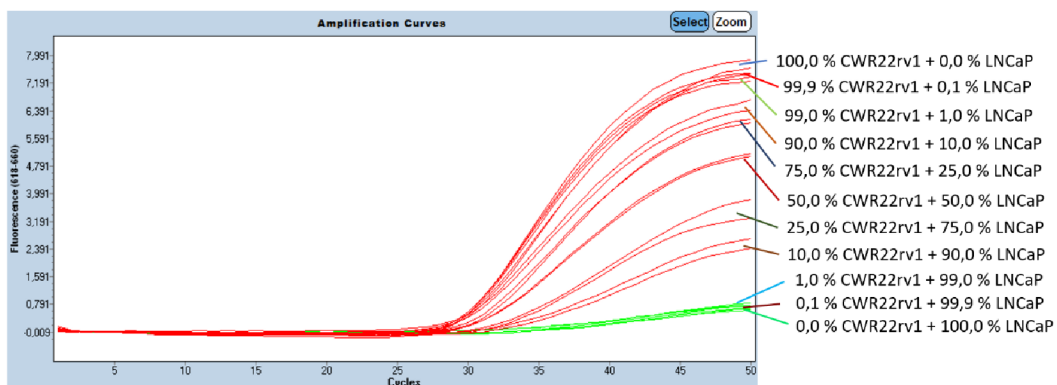


Obr. 13: Křivky qPCR diluční řady s použitím assaye pro detekci mutace H875Y za podmínek z Tab. 4.

Vzorky diluční řady DNA byly naštěpeny pomocí enzymu XbaI na fragmenty odpovídající fragmentované ccfDNA v lidské plazmě u pacientů s pokročilým PCa a pomocí qPCR bylo ověřeno, zda reakce i po naštěpení proběhla stejně. Bylo dosaženo stejných výsledků jako u nenaštěpené DNA, jak u mutace T878A (Obr. 14), tak i u mutace H875Y (Obr. 15).



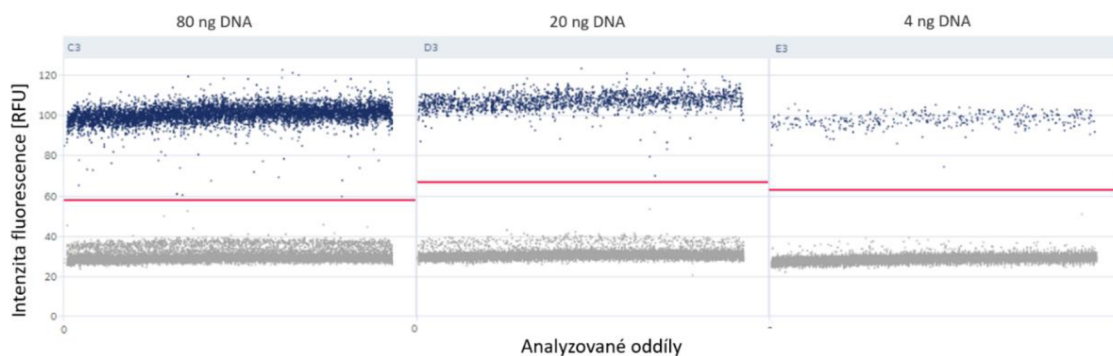
Obr. 14: Křivky qPCR diluční řady fragmentované DNA s použitím assaye pro detekci mutace T878A za podmínek z Tab. 4.



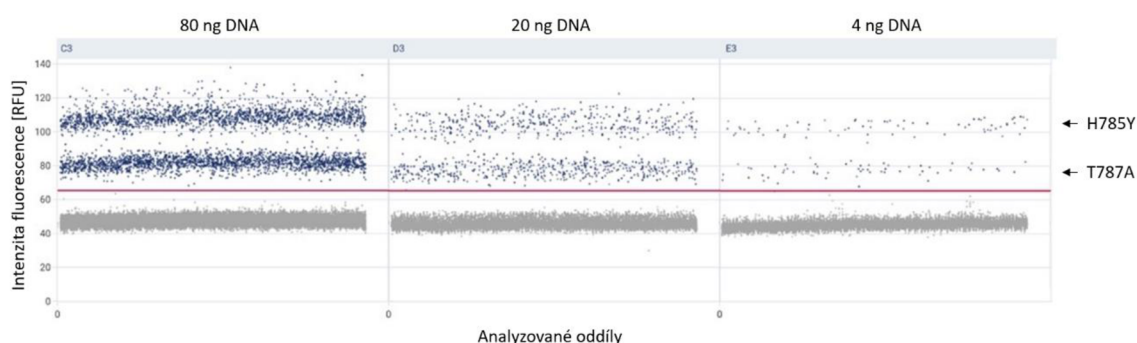
Obr. 15: Křivky qPCR diluční řady fragmentované DNA s použitím assaye pro detekci mutace H875Y za podmínek z Tab. 4.

4.3.3 Nanodestičková digitální PCR

Pro zjištění optimálního množství DNA pro ndPCR bylo použito 80 ng, 20 ng a 4 ng na jamku DNA buněčných linií LNCaP a CRW22rv1 v poměru 1:1. (Obr. 16). Čím více DNA reakce obsahovala, tím více bylo detekováno pozitivních analyzovaných oddílů. U 80 ng DNA byl 4x větší signál pro RNAsuP než u 20 ng DNA. U 4 ng DNA byl signál 5x menší než u 20 ng DNA. Čím více DNA reakce obsahovala, tím více bylo pozitivních analyzovaných oddílů. Tím bylo ověřeno, že detekce kontrolního genu RNAsaP reflektuje množství použité DNA. Pro další experimenty bylo tedy použito 20 ng DNA na jamku, kdy byl jasně detekován signál RNAsyP i mutace. Množství 80 ng DNA v reakci bylo nadměrným množstvím, a naopak nejnižší množství (4 ng DNA) bylo nedostatečné pro spolehlivou analýzu. Stejných změn signálu bylo dosaženo i u assayi pro detekci mutace H875Y a T878A. Populace pozitivních oddílů pro mutaci H875Y se vyskytovala okolo intenzity fluorescence 100 RFU a pro T878A okolo 80 RFU (Obr. 17).



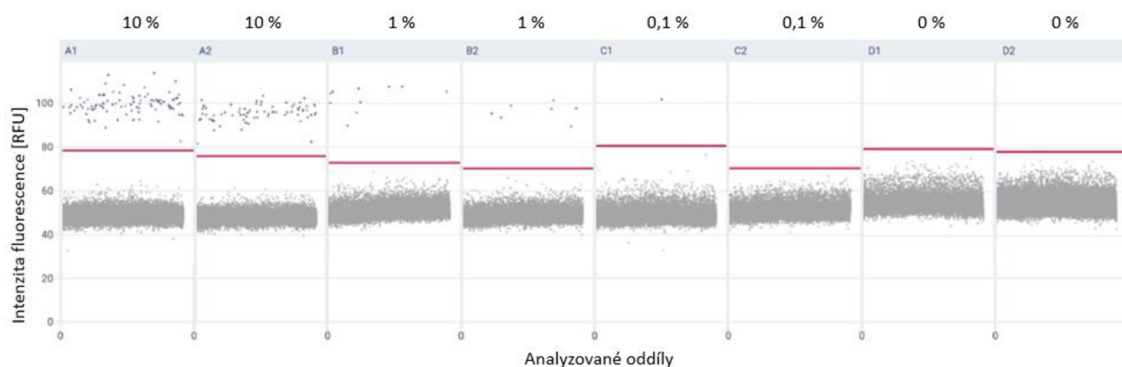
Obr. 16: Záznam z ndPCR RNAsyP při snižujícím se množstvím DNA (80 ng, 20 ng a 4 ng) buněčných linií LNCaP a CWR22rv1.



Obr. 17: Záznam z ndPCR mutace H875Y a T878A při snižujícím se množstvím DNA (80 ng, 20 ng a 4 ng) buněčných linií LNCaP a CWR22rv1.

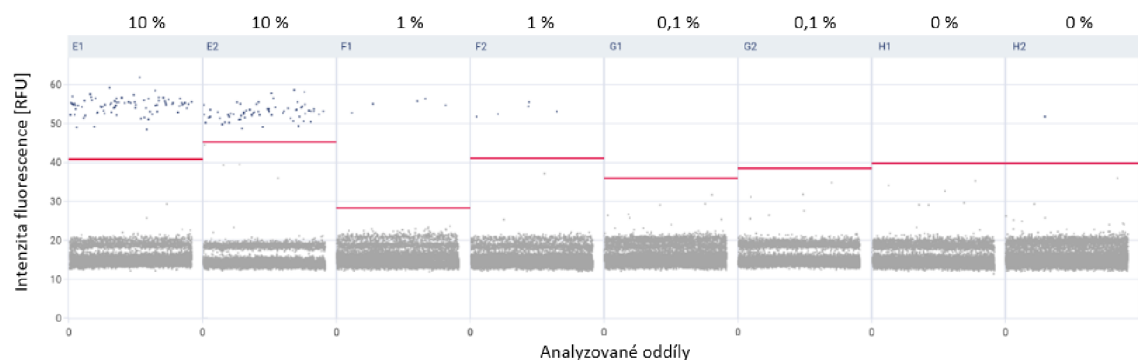
Bylo zjištěno, že pomocí ndPCR bylo možné spolehlivě detekovat mutaci při 1% zastoupení DNA LNCaP na pozadí CWR22rv1 (Obr. 18). Signál byl detekován u 0,1 %

ale pouze v jednom z duplikátu, tudíž tento výsledek nebyl brán jako spolehlivý, a tedy citlivost ndPCR rozeznat mutaci byla 1 %.



Obr. 18: Záznam z ndPCR mutace T878A při snižujícím se zastoupení DNA LNCaP na pozadí DNA CWR22rv1.

Stejně citlivosti jako u mutace T878A bylo dosaženo i u mutace H875Y (Obr. 19). Jeden analyzovaný oddíl byl sice detekován u 0% zastoupení DNA CWR22rv1 na pozadí LNCaP, ale to bylo způsobeno chybou přístroje.



Obr. 19: Záznam z ndPCR mutace H875Y při snižujícím se zastoupení DNA CWR22rv1 na pozadí DNA LNCaP.

U 8 změřených vzorků DNA tekuté biopsie pacientů s pokročilým PCa pomocí ndPCR nebyla nalezena žádná mutace genu pro AR.

4.3.4 Variabilita počtu kopií u DNA buněčných linií

Gen pro AR je umístěn na pohlavním chromozomu X, tedy pouze jedenkrát v buňce. Na rozdíl od toho je gen pro RNAsuP (RPPH1) situován na chromozomu 14 (Imaizumi et al., 2019) a v buňce je zastoupen dvakrát (Kohli et al., 2018). Tedy u jedinců bez CNV genu pro AR by měla být koncentrace RNAsyP dvakrát vyšší než AR. Proto byla hodnota CNV genu pro AR vypočítána na základě detekce pozitivních signálů z ndPCR u DNA buněčných linií podle vzorce $CNV = \frac{Koncentrace\ AR \times 2}{Koncentrace\ RNAsa\ P}$ (Tab. 13).

Tab. 13: Výsledky CNV genu pro AR buněčných linií měřené pomocí ndPCR.

Vzorek	Koncentrace AR [kopie/ μ l]	SD AR	Koncentrace RNAsaP [kopie/ μ l]	SD RNAsaP	CNV
10% VCaP	189,6	1,4	108,5	2,5	3,5
1% VCaP	67,1	0,3	115,0	6,6	1,2
0,1% VCaP	62,5	0,1	121,1	4,4	1,0

4.3.5 Variabilita počtu kopií u vzorků DNA tekuté biopsie

Pomocí ddPCR byla zjištěna přítomnost CNV genu pro AR ve vzorcích DNA z kontrolních plazem, přičemž nebyly zjištěny žádné hodnoty vyšší než 1,5, tedy žádná plazma pacienta urologické kliniky bez nádorového onemocnění neobsahovala CNV genu pro AR (Tab. 14). Hodnota CNV 1,5 byla použita jako cut-off pro hodnocení patientských plazem jako pozitivní nebo negativní.

Tab. 14: Výsledky CNV genu pro AR DNA kontrolních plazem měřené pomocí ddPCR.

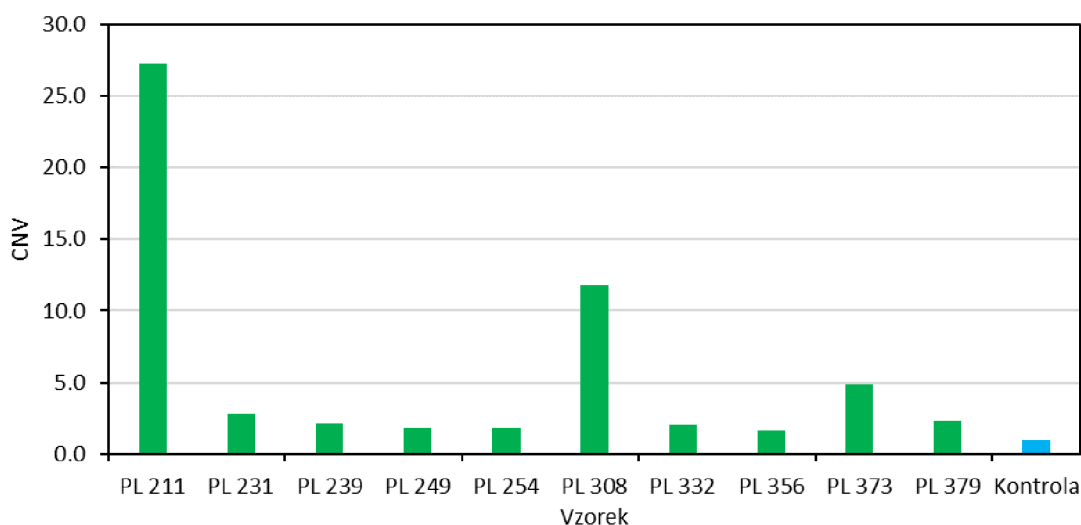
Vzorek	Koncentrace AR [kopie/ μ l]	SD AR	Koncentrace RNAsaP [kopie/ μ l]	SD RNAsaP	CNV
CTRL 1	2,75	0,21	5,15	0,78	1,1
CTRL 2	2,90	0,99	5,45	0,21	1,1
CTRL 3	1,40	0,14	2,75	0,21	1,0
CTRL 4	2,65	0,07	4,05	0,07	1,3
CTRL 5	13,50	0,57	26,85	1,48	1,0
CTRL 6	0,04	0,05	0,55	0,36	0,1
CTRL 7	106,00	7,07	219,50	2,12	1,0
CTRL 8	61,55	0,49	136,00	1,41	0,9
CTRL 9	2,60	0,28	4,25	0,64	1,2
CTRL 10	0,42	0,06	0,66	0,49	1,3
CTRL 11	1,25	0,07	1,85	0,21	1,4
CTRL 12	9,00	0,85	15,85	2,33	1,1
CTRL 13	0,22	0,21	0,60	0,01	0,7
CTRL 14	0,76	0,18	1,20	0,14	1,3
CTRL 15	15,40	0,99	30,85	0,64	1,0

Stejných výsledků bylo dosaženo i pomocí ndPCR, při které byly změřeny tři kontrolní vzorky a všechny byly negativní na CNV genu pro AR (Tab. 15).

Tab. 15: Výsledky CNV genu pro AR DNA kontrolních plazem měřené pomocí ndPCR.

Vzorek	Koncentrace AR [kopie/ μ l]	SD AR	Koncentrace RNAsaP [kopie/ μ l]	SD RNAsaP	CNV
CTRL 1	0,72	0,27	1,32	0,24	1,1
CTRL 2	0,89	0,04	1,56	0,04	1,1
CTRL 3	0,29	0,14	0,62	0,14	0,9

Dále bylo změřeno 46 vzorků DNA z plazmy pacientů s pokročilým PCa pomocí ddPCR (příloha A), přičemž 10 bylo pozitivních na CNV genu pro AR (21,74 %; Obr. 20).



Obr. 20: Graf znázorňující vzorky, u kterých byla detekována CNV genu pro AR a jeden kontrolní vzorek (CNV = 1).

Z těchto 46 vzorků bylo vybráno osm pro ověření správnosti měření pomocí druhého systému pro dPCR. Při analýze na ddPCR nesly dva vzorky amplifikaci genu pro AR (PL 211 a PL 231; Tab. 16) stejně jako u přeměření vzorků pomocí ndPCR (Tab. 17).

Tab. 16: Výsledky CNV genu pro AR DNA plazem pacientů s pokročilý PCa měřené pomocí ddPCR.

Vzorek	Koncentrace AR [kopie/ μ l]	SD AR	Koncentrace RNAsaP [kopie/ μ l]	SD RNAsaP	CNV	CNV hodnocení
PL 202	18,75	0,07	44,50	1,84	0,8	negativní
PL 207	2,40	0,42	4,10	0,42	1,2	negativní
PL 210	27,35	4,88	57,55	7,00	1,0	negativní
PL 211	118,50	10,61	8,70	0,14	27,2	pozitivní
PL 212	0,21	0,03	0,42	0,05	1,0	negativní
PL 213	44,80	3,39	103,25	20,86	0,9	negativní
PL 214	16,15	6,29	32,95	15,06	1,0	negativní
PL 231	44,05	0,21	31,10	1,70	2,8	pozitivní

Tab. 17: Výsledky CNV genu pro AR DNA plazem pacientů s pokročilý PCa měřené pomocí ndPCR.

Vzorek	Koncentrace AR [kopie/ μ l]	SD AR	Koncentrace RNAsaP [kopie/ μ l]	SD RNAsaP	CNV	CNV hodnocení
PL 202	12,31	3,08	25,81	1,17	1,0	negativní
PL 207	0,84	0,40	2,06	0,49	0,8	negativní
PL 210	14,55	1,51	30,98	0,93	0,9	negativní
PL 211	51,51	0,11	4,51	0,20	22,9	pozitivní
PL 212	0,16	0,00	0,22	0,00	1,5	negativní
PL 213	8,90	0,03	17,44	1,03	1,0	negativní
PL 214	7,61	0,71	16,82	2,16	0,9	negativní
PL 231	22,54	0,91	14,23	0,81	3,2	pozitivní

5 DISKUZE

Pro naše testování byly vybrány buněčné linie LNCaP s mutací T878A, CWR22rv1 s mutací H875Y, VCaP, u které je amplifikace genu pro AR a LAPC-4, která má nemutovaný AR.

Při návrhu experimentů jsme vycházeli z řady studií, které byly publikovány v odborných časopisech (Makkonen et al., 2011; Watson et al., 2015; Conteduca et al., 2017; Du et al., 2020). K ověření specifčnosti assayí pro detekci mutací T878A a H875Y jsme použili qPCR. K jejich analýze standardně slouží fluorogenní TaqMan sondy, které obsahují dvě sondy pro dvě alely (Heid et al., 1996). Pro použití s ndPCR jsme však navrhli assaye, které obsahovaly pouze jednu značenou probu a nesloužily k detekci WT alely AR. Navrhnutá assay pouze pro detekci mutace H875Y však nebyla specifická, což bylo potvrzeno i na základě následně provedené gelové elektroforézy. Tato nespecifita se projevila tím, že použitá sonda odpovídala zastoupení genu pro AR v genomu dané linie, ale nereflektovala přítomnost dané mutace. Amplifikace DNA při qPCR probíhala u všech použitých linií a na základě provedené gelové elektroforézy bylo zjištěno, že produkty byly tvořeny ve všech vzorcích. Podobná situace byla pozorována u druhé assaye pro detekci mutace T878A, která však správně generovala signál specifický pro přítomnost mutované alely. Dalším důkazem nespecifity assaye pro detekci pouze mutace H875Y byl výskyt druhého bandu o velikosti přibližně 70 bp. Při PCR reakci tedy došlo k nespecifické amplifikaci DNA. Assay pro detekci mutace H875Y s WT již byla specifická a signál byl detekován pouze u DNA obsahující dané mutace. Rozdílné výsledky při použití assaye pouze pro detekci mutace H875Y a assaye pro detekci mutace H875Y i WT byly zapříčiněny designem assaye, který firma vytvořila. Při použití assaye pro detekci mutace H875Y i WT společně s assayí k detekci mutace T878A však nebylo možné od sebe odlišit jednotlivé mutace, protože assay pro detekci H875Y obsahovala dva fluorofory. Společná reakce tak dává informaci, zda je nějaká ze dvou měřených mutací přítomna ve vzorku či nikoliv. V případě potřeby je možné reakce zopakovat v separátních zkumavkách.

Po provedení qPCR ke zjištění citlivosti detekce mutací jsme zjistili, že qPCR umožňovala detekci mutace při 10% zastoupení DNA uvedených buněčných linií s mutacemi H878Y a T875A. Pomocí ndPCR bylo detekováno i 1% zastoupení. Tato zvýšená citlivost a přesnost je právě daná principem dPCR, kdy je reakční směs rozdělena do oddílů (Hindson et al., 2013). V práci Sumiyoshi et al. z roku 2019 byli schopni detekovat pomocí dPCR i 0,5% zastoupení DNA buněčných linií LNCaP a CWR22rv1 pro detekci mutací T878A a H875Y.

Díky mutacím genu AR dochází u pacientů s CRPC k rezistenci na léky jako je abirateron či enzalutamid (Wyatt et al., 2016). Abirateron nepřímo blokuje dráhu AR přes inhibici biosyntézy androgenů a enzalutamid působí na AR přímo jako antagonist (Sumiyoshi et al., 2019).

V našem experimentu nebyla pomocí ndPCR zjištěna ani jedna z vybraných mutací (T878A a H875Y) u pacientů s pokročilým PCa, což mohlo být způsobeno malým počtem změřených vzorků, jelikož mutace T878A se ve studii Ledet et al. z roku 2020 vyskytovala přibližně u 14,5 % pacientů s CRPC a mutace H875Y u 11,4 % z 892 pacientů s pokročilým PCa. Zároveň detekce mutací v této studii probíhala pomocí sekvenování nové generace, a nikoliv pomocí PCR metod. Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii Chen et al. z roku 2020, kde mutace T878A byla detekována genomickým sekvenováním u 3 z 18 pacientů s CRPC. V práci Conteduca et al. z roku 2017 byla s pomocí ddPCR detekována mutace T878A u 11 % pacientů ze 73, kteří podstoupili léčbu docetaxelem, ale u žádného pacienta bez předchozí chemoterapie. Pro nalezení pozitivních vzorků by mohlo být podstatné, jaký typ terapie pacienti již podstoupili, protože mutace AR mohou vznikat na základě selekčního tlaku léčby (Watson et al., 2015). Tato informace bude u našich pacientů k dispozici po rozšíření analyzovaného souboru.

Buněčné linie LNCaP a CWR22rv1 neobsahují amplifikaci genu pro AR (Makkonen et al., 2011; Watson et al., 2015), a proto byly ve všech provedených experimentech negativní na CNV genu pro AR (hodnota CNV byla rovna 1). Naopak buněčná linie VCaP již CNV genu pro AR obsahuje. V našich experimentech bylo možné detekovat pomocí dPCR CNV při zředění DNA VCaP na 10 %. Při menším zastoupení VCaP se již hodnota CNV pohybovala okolo 1, tedy CNV nebyla prokázána. Ve studii Sumiyoshi et al. z roku 2019 byla detekována CNV pomocí dPCR i při 1% zastoupení DNA VCaP. Zároveň v této studii byla zjištěna CNV genu pro AR u 46 z 83 (55,4 %) vzorků pacientů s CRPC odebraných při progresi onemocnění, ale pouze u 1 z 19 (5,3 %) vzorků, které byly odebrány během odpovědi na léčbu. Celkem tedy ze 102 pacientů s CRPC mělo 46,1 % amplifikaci genu pro AR, což je přibližně dvojnásobně větší zastoupení než v naší analýze. Podobných výsledků z tekuté biopsie dosáhla i studie Wyatt et al. z roku 2016, kde byla CNV AR detekována u 43 % pacientů s CRPC, kterým byl podáván enzalutamid. Pro detekci CNV využili komparativní genomovou hybridizaci. Ve studii Conteduca et al. z roku 2017 detekovali amplifikace genu pro AR u 10 ze 73 pacientů bez předchozí terapie a u 33 pacientů z 98 léčených docetaxelem. K detekci kromě ddPCR využili i sekvenování nové generace. Rozdílného procentuálního zastoupení CNV genu pro AR v naší práci mohlo být dosaženo malým počtem změřených vzorků (jen 46) nebo velmi malým podílem CNV genu pro AR u námi

vybraných pacientů. Také většina pacientů tohoto souboru byla léčena abirateronem a nikoli enzalutamidem. Správnost výsledků měření z ddPCR byla potvrzena pomocí ndPCR.

Metoda qPCR nám umožnila ověřit specifčnost použitých assayí rychle a levněji než ddPCR nebo ndPCR. Díky ddPCR jsme pak byli schopní detekovat CNV genu pro AR. Pomocí ndPCR jsme detekovali mutace H875Y a T878A u buněčných linií a zároveň i CNV genu pro AR, což ušetřilo velké množství času, vzorků i spotřebního materiálu. Navíc po vložení destičky do přístroje QIAcuity už vše probíhalo automaticky. Naopak u ddPCR bylo nutné destičku mezi jednotlivými kroky manuálně přesouvat mezi přístroji, proto se ndPCR jeví jako praktičtější metoda, která přináší úsporu času a poskytuje více údajů z jediného měření. ndPCR je novým přístrojem na trhu, a proto je velmi limitovaný počet studií s jejím použitím. Zatím byla ndPCR využita ve studii týkajících se identifikace mutací ze vzorku tekuté biopsie karcinomu plic a kolorektálního karcinomu (Crucitta et al., 2023), karcinomu štítné žlázy (Romaneli et al., 2021) nebo gliomu (Zaytseva et al., 2022).

6 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na zpracování literatury na téma využití tekuté biopsie u pacientů s PCa, detekci mutací AR H875Y a T878A a na analýzu CNV genu pro AR u buněčných linií LNCaP, CWR22rv1, LAPC-4, VCaP a u vzorků ccfDNA izolovaných z krevní plazmy pacientů s pokročilým PCa za použití PCR metod.

Pro experimentální část byla využita qPCR, ddPCR, ndPCR a gelová elektroforéza. Pro detekci mutací H875Y a T878A byla nejdříve ověřena specifita použitých assayí pomocí qPCR, přičemž assay pro detekci mutace H875Y musela být nahrazena assayí pro společnou detekci mutace H875Y i WT alelu AR. Nespecifita assaye pro detekci samotné mutace H875Y byla potvrzena i na základě gelové elektroforézy. qPCR byla využita i při stanovování citlivosti assayí pro detekci mutací H875Y a T878A u nenaštěpené i naštěpené DNA buněčných linií LNCaP a CWR22rv1. Citlivost assayí pomocí qPCR byla o jeden řád horší než při použití ndPCR. Bylo také zjištěno ideální množství DNA pro ndPCR reakci, které činilo 20 ng. Při analýze vzorků pacientů s pokročilým PCa nebyla zatím nalezena mutace H875Y ani T878A.

Na základě koncentrace AR a RNAsyP zjištěné pomocí ndPCR byla vypočítána hodnota CNV genu pro AR. Nejdříve byla zhodnocena u různého procentuálního zastoupení DNA buněk VCaP na pozadí DNA buněk LNCaP. Následně byly vyšetřeny vzorky pacientů z urologické kliniky bez nádorového onemocnění a také vzorky pacientů s pokročilým PCa. Pomocí ddPCR bylo změřeno 46 vzorků pacientů s PCa, z nichž bylo 21,74 % pozitivních na CNV genu pro AR. Pro ověření správnosti výsledků bylo osm z těchto 46 vzorků ověřeno i s použitím ndPCR, přičemž oba systémy pro dPCR poskytly stejný výsledek a vzorky pozitivní na CNV genu AR na ddPCR byly pozitivní i na ndPCR. Cíle bakalářské práce byly splněny. Práce bude dále rozvíjena a získané výsledky budou podrobeny statistické analýze ve vztahu s klinickými daty pacientů. Tato metodika by mohla mít v budoucnosti velký klinický význam pro monitorování pacientů s nádorovým onemocněním jako je PCa.

POUŽITÁ LITERATURA

Adam Z., Vorlíček J., Vaníček J. (2004): Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. 2., aktualiz. a dopl. vyd., pp. 172-174, Praha: Grada, ISBN 80-247-0896-5.

Ahmed A., Ali S., Sarkar H. F. (2014): Advances in androgen receptor targeted therapy for prostate cancer. *Journal of Cellular Physiology* 229(3):271-276.

Alix-Panabières C., Pantel K. (2016): Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discovery* 6(5):479-491.

Aurilio G., Cimadamore A., Mazzucchelli R., Lopez-Beltran A., Verri E., Scarpelli M., Massari F., Cheng L., Santoni M., Montironi R. (2020): Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells* 9(12):2653.

Bott R. J. S., Ng L. K., ed. (2021): Prostate Cancer [online]. Brisbane (AU): Exon Publications. [cit. 2022-09-16] <<https://doi.org/10.36255/exonpublications.prostatecancer.2021>>.

Carter B. H., Piantadosi S., Isaac T. J. (1990): Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *The Journal of Urology* 143(4):742-746.

Castro-Giner F., Aceto N. (2020): Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis. *Genome Medicine* 12(1):31.

Conteduca V., Wetterskog D., Sharabiani A. T. M., Grande E., Fernandez-Perez P. M., Jayaram A., Salvi S., Castellano D., Romanel A., Lolli C., Cassadio V., Gurioli G., Amadori D., Font A., Vazquez-Estevéz S., Alba G. A., Mellado B., Fernandez-Calvo O., Méndez-Vidal J. M., Climent A. M., Duran I., Gallardo E., Rodríguez A., Santander C., Sáez I. N., Puente J., Tandefelt G. D., Wingate A., Dearnaley D., Premiere Collaborators, Spanish Oncology Genitourinary Group, Demichelis F., Giorgi D., Gonzales-Billalabeitia, Attard G. (2017): Androgen receptor gene status in plasma DNA associates with worse outcome on enzalutamide or abiraterone for castration-resistant prostate cancer: a multi-institution correlative biomarker study. *Annals of Oncology* 331(1):57-65.

Crawford D. E., Heidenreich A., Lawrentschuk N., Tombal B., Pompeo C. L. A., Mendoza-Valdes A., Miller K., Debruyne M. J. F., Klotz L. (2019): Androgen-targeted therapy in men with prostate cancer: evolving practice and future considerations. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 22(1):24-38.

Crucitta S., Ruglioni M., Novi C., Manganiello M., Arici R., Petrini I., Pardini E., Cucchiara F., Marmorino F., Cremolini Ch., Fogli S., Danesi R., Re D. M. (2023): Comparison of digital PCR systems for the analysis of liquid biopsy samples of patients affected by lung and colorectal cancer. *Clinica Chimica Acta* 541:117239.

Dagvadorj A., Tam S. H., Liao Z., Cavalli R. L., Haddad R. B., Nevalainem T. M. (2008): Androgen-regulated and highly tumorigenic human prostate cancer cell line established from a transplantable primary CWR22 tumor. *Clinical Cancer Research* 14 (19): 6062-6072.

Du M., Huang Ch. Ch., Tan W., Kohli M., Wang L. (2020): Multiplex Digital PCR to Detect Amplifications of Specific Androgen Receptor Loci in Cell-Free DNA for Prognosis of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers* 12(8):2139.

Eiber M., Herrmann K., Calais J., Hadaschik B., Giesel L. F., Hartenbach M., Hope T., Reiter R., Maurer T., Weber A. W., Fendler P. W. (2018): Prostate Cancer Molecular Imaging Standardized Evaluation (PROMISE): Proposed miTNM Classification for the Interpretation of PSMA-Ligand PET/CT. *The Journal of Nuclear Medicine* 59(3):469-478.

Epstein I. J., Zelefsky J. M., Sjoberg D. D., Nelson B. J., Egevad L., Magi-Galluzzi C., Vickers J. A., Parwani V. A., Reuter E. V., Fine W. S., Eastham A. J., Wiklund P., Han M., Reddy A. C., Ciezki P. J., Nyberg T., Klein A. E. (2016): A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *European Urology* 69(3):428-435.

Galon J., Mlecnik B., Bindea G., Angell K. H., Berger A., Lagorce Ch., Lugli A., Zlobec I., Hartmann A., Bifulco C., Nagtegaal D. I., Palmqvist R., Masucci V. G., Botti G., Tatangelo F., Delrio P., Maio M., Laghi L., Grizzi F., Asslaber M., D'Arrigo C., Vidal-Vanaclocha F., Zavadova E., Chouchane L., Ohashi S. P., Hafezi-Bakhtiari, Wouters G. B., Roehrl M., Nguyen L., Kawakami Y., Hazama S., Okuno K., Ogino S., Gibbs P., Waring P., Sato N., Torigoe T., Itoj K., Patel S. P., Shukla N. S., Wang Y., Kopetz S., Sinicrope A. F., Scripcariu V., Ascierto A. P., Marincola M. F., For A. B., Pagès F. (2014): Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *The Journal of Pathology* 232(2):199-209.

Garcia R. R., Masoodi Z. K., Pascal E. L., Nelson B. J., Wang Z. (2014): Growth of LAPC4 prostate cancer xenograft tumor is insensitive to 5 α -reductase inhibitor dutasteride. *American Journal of Clinical and Experimental Urology* 2(1):82-91.

Heid A. Ch., Stevens J., Livak J. K., Williams P. M. (1996): Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.

Heitzer E., Ulz P., Geigl B. J. (2015): Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical Chemistry* 61(1):112-123.

Hindson J. B., Ness D. K., Masquelier A. D., Belgrader P., Heredie J. N., Makarewicz J. A., Bright J. I., Lucero Y. M., Hiddessen L. A., Legler C. T., Kitano K. T., Hodel R. M., Petersen F. J., Wyatt W. P., Steenblock R. E., Shah H. P., Bousse J. L., Troup B. C., Mellen C. J., Wittmann K. D., Erndt G. N., Cauley H. T., Koehler T. R., So P. A., Dube S., Rose A. K., Montesclaros L., Wang S., Stumbo P. D., Hodges P. S., Romine S., Milanovich P. F., White E. H., Regan F. J., Karlin-Neumann A. G., Hindson M. Ch., Saxonov S., Colston W. B. (2011): High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute. *Analytical Chemistry* 83(22):8604-8610.

Hindson M. Ch., Chevillet R. J., Briggs A. H., Gallichotte N. E., Ruf K. I., Hindson J. B., Vessella L. R., Tewari M. (2013): Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods* 10(10):1003-1005.

Hovhannisyan G., Harutyunyan T., Aroutiounian R., Liehr T. (2019): DNA Copy Number Variations as Markers of Mutagenic Impact. *International Journal of Molecular Sciences* 20(19):4723.

Huncharek M., Haddock S. K., Reid R., Kupelnick B. (2010): Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *American Journal of Public Health* 100(4):693-701.

Chandrasekar T., Yang C. J., Gao C. A., Evans P. Ch. (2015): Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational Andrology and Urology* 4(3):365-380.

Chen J. E., Sowalsky G. A., Gao S., Cai Ch., Voznesensky O., Schaefer R., Loda M., True D. L., Ye H., Troncso P., Lis L. R., Kantoff W. P., Montgomery B. R., Nelson S. P., Bublely J. G., Balk P. S., Taplin M. E. (2015): Abiraterone treatment in castration-resistant prostate cancer selects for progesterone responsive mutant androgen receptors. *Clinical Cancer Research* 21(6):1273-1280.

Imaizumi T., Yamamoto-Shimajima K., Yamamoto T. (2019): Advantages of ddPCR in detection of PLP1 duplications. *Intractable & Rare Diseases Research* 8(3):198-202.

Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer O. F., Hesch R. D., Knippers R. (2001): DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research* 61(4):1659-1665.

Jian Z., Ye D., Li H., Wang K. (2018): Sexual Activity and Risk of Prostate Cancer: A Dose-Response Meta-Analysis. *Journal of Sexual Medicine* 15(9):1300-1309.

Kalish A. L., McDougal S. W., McKinlay B. J. (2000): Family history and the risk of prostate cancer. *Urology* 56(5):803-806.

Kantoff W. P., Higano S. C., Shore D. N., Berger R. E., Small J. E., Penson F. D., Redfern H. Ch., Ferrari C. A., Dreicer R., Sims B. R., Xu Y., Frohlich W. M., Schellhammer F. P. (2010): Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The new england journal of medicine* 363(5):411-422.

Kenfield A. S., Stampfer J. M., Giovannucci E., Chan M. J. (2011): Physical activity and survival after prostate cancer diagnosis in the health professionals follow-up study. *Journal of Clinical Oncology* 29(6):726-732.

Kohli M., LI J., Du M., Hillman W. D., Dehm M. S., Tan W., Carlson R., Campion B. M., Wang L., Wang L., Zhang H., Zhang P., Kilari D., Huang Ch. Ch., Wang L.: Prognostic association of plasma cell-free DNA-based androgen receptor amplification and circulating tumor cells in pre-chemotherapy metastatic castration-resistant prostate cancer patients. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 21(3):411-418.

Kok C. V., Yu C. C. (2020): Cancer-Derived Exosomes: Their Role in Cancer Biology and Biomarker Development. *International Journal of Nanomedicine* 15:8019-8036.

Kolář Z. a kolektiv (2003): *Molekulární patologie nádorů*, pp. 122-124, Olomouc: Epava ISBN 80-86297-15-2.

Komura K., Sweeney J. Ch., Inamoto T., Ibuki N., Azuma H., Kantoff W. P. (2017): Current treatment strategies for advanced prostate cancer. *International Journal of Urology* 25(3):220-231.

Ledet M. E., Lilly B. M., Sonpavde G., Lin E., Nussenzveig H. R., Barata C. P., Yandell M., Nagy J. R., Kiedrowski L., Agarwal N., Sartor O. (2020): Comprehensive Analysis of AR Alterations in Circulating Tumor DNA from Patients with Advanced Prostate Cancer. *The Oncologist* 25(4):327-333.

Ma J., LI H., Giovannucci E., Mucci L., Qiu W., Mguyen L. P., Gaziano M. J., Pollak M., Stampfer J. M. (2008): Prediagnostic body-mass index, plasma C-peptide concentration, and prostate cancer-specific mortality in men with prostate cancer: a long-term survival analysis. *The Lancet Oncology* 9(11):1039-1047.

Makkonen H., Kauhanen M., Jääskeläinen T., Palvimo J. J. (2011): Androgen receptor amplification is reflected in the transcriptional responses of Vertebral-Cancer of the Prostate cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 331(1):57-65.

McEwan J. I., Brinkmann O. A. (2021): *Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders* [online], South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc. [cit. 2022-09-18] <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279028/>>.

Mistry K., Cable G. (2003): Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *Journal of the American Board of Family Practice* 16(2):95-101.

Naji L., Randhawa H., Sohani Z., Dennis B., Lautenbach D., Kavanagh O., Bawor M., Banfield L., Profetto J. (2018): Digital Rectal Examination for Prostate Cancer Screening in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of Family Medicine* 16(2):149-154.

Pernar H. C., Ebot M. E., Wilson M. K., Mucci A. L. (2018): The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives Medicine* 8(12).

Qiagen (2021): *QIAcuity User Manual* (online). QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden, Německo.

Rani A., Dasgupta P., Murphy J. J. (2019): Prostate Cancer: The Role of Inflammation and Chemokines. *The American Journal of Pathology* 189(11):2119-2137.

Romanelli K., Wells J., Patel A., Torres M. M., Costello J., Jensen K., Vasko V. (2021): Clinical and molecular characterization of thyroid cancer when seen as a second malignant neoplasm. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* 12:20420188211058327.

Saini S. (2016): PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cellular Oncology* 39(2):97-106.

Steinestel J., Leudeke M., Arndt A., Schnoeller J. T., Lennerz K. J., Wurm C., Maier Ch., Cronauer M., Steinestel K., Schrader J. A. (2019): Detecting predictive androgen receptor modifications in circulating prostate cancer cells. *Oncotarget* 10(41):4213-4223.

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(1):4030.

Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer Journal for Clinicians* 71(3):209-249.

Tan E. H. M., Li J., Xu E. H., Melcher K., Yong E. (2015): Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* 36(1):3-23.

Taylor C. S., Laperriere G., Germain H. (2017): Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports* 7(1):2409.

Teo Y. M., Rathkopf E. D., Kantoff P. (2019): Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annual Review of drMedicine* 70:479-499.

Tiwari A., Ahmed W., Oikarinen S., Scherchan P.S., Heikinheimo A., Jiang G., Simpson L. S., Greaves J., Bivins A. (2022): Application of digital PCR for public health-related water quality monitoring. *Science of the Total Environment* 837:155663.

Wang J., Chang S., Li G., Sun Y. (2017): Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Frontiers in Medicine* 11(4): 522-527.

Wang J., Ni J., Beretov J., Thompson J., Graham P., Li Y. (2020): Exosomal microRNAs as liquid biopsy biomarkers in prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 145:102860.

Watson A. P., Arora K. V., Sawyers L. Ch. (2015): Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nature Reviews Cancer* 15(12):701-711.

Wyatt W. A., Azad A. A., Volik V. S., Annala M., Beja K., McConeghy B., Haegert A., Warner W. E., Mo F., Brahmhatt S., Shukin R., Le Bihan S., Gleave E. M., Nykter M., Collins C. C., Chi N. K. (2016): Genomic alterations in cell-free DNA and enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncology* 2(12):1598-1606.

Yu P. Y., Song Ch., Tseng G., Ren G. B., Laframboise W., Michalopoulos G., Nelson J., Luo J. H. (Jian-Hua) (2012): Genome abnormalities precede prostate cancer and predict clinical relapse. *The American Journal of Pathology* 180(6):2240-2248.

Yu W., Hurley J., Roberts D., Chakraborty K. S., Enderle D., Noerholm M., Breakefield O. X., Skog K. J. (2021): Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. *Annals of Oncology* 32(4):466-477.

Zaytseva M., Usman N., Salnikova E., Sanakoeva A., Valiakhmetova A., Chervova A., Papusha L., Novichkova G., Druy A. (2022): Methodological Challenges of Digital PCR Detection of the Histone H3 K27M Somatic Variant in Cerebrospinal Fluid. Pathology and Oncology Reserch. 28:1610024.

Přílohy

Příloha A: Všechny výsledky CNV DNA plazem pacientů s pokročilým PCa měřené pomocí ddPCR.

Vzorek	Koncentrace AR [kopie/ μ l]	SD AR	Koncentrace RNAsaP [kopie/ μ l]	SD RNAsaP	CNV	CNV hodnocení
PL 202	18,75	0,07	44,50	1,84	0,8	negativní
PL 207	2,40	0,42	4,10	0,42	1,2	negativní
PL 209	1,60	0,85	2,85	0,92	1,1	negativní
PL 210	27,35	4,88	57,55	7,00	1,0	negativní
PL 211	118,50	10,61	8,70	0,14	27,2	pozitivní
PL 212	0,21	0,03	0,42	0,05	1,0	negativní
PL 213	44,80	3,39	103,25	20,86	0,9	negativní
PL 214	16,15	6,29	32,95	15,06	1,0	negativní
PL 217	1,55	0,35	3,70	0,14	0,8	negativní
PL 231	44,05	0,21	31,10	1,70	2,8	pozitivní
PL 235	13,10	2,83	28,70	1,13	0,9	negativní
PL 236	3,85	0,07	8,90	0,99	0,9	negativní
PL 239	0,54	0,16	0,51	0,30	2,1	pozitivní
PL 240	10,00	0,14	18,40	0,14	1,1	negativní
PL 247	21,35	2,76	43,85	1,48	1,0	negativní
PL 248	17,65	0,07	39,05	0,78	0,9	negativní
PL 249	7,20	0,28	8,05	0,64	1,8	pozitivní
PL 254	2,30	0,57	2,50	0,71	1,8	pozitivní
PL 258	83,35	5,16	180,00	4,24	0,9	negativní
PL 259	49,00	3,25	104,00	11,31	0,9	negativní
PL 263	6,85	0,49	12,70	1,41	1,1	negativní
PL 270	4,90	0,42	10,15	0,35	1,0	negativní
PL 276	22,35	1,91	41,45	7,00	1,1	negativní
PL 283	1,60	0,28	3,35	0,35	1,0	negativní
PL 296	1,40	0,00	3,25	0,49	0,9	negativní
PL 297	8,20	0,71	17,70	1,56	0,9	negativní
PL 308	4,60	0,71	0,78	0,31	11,8	pozitivní
PL 319	58,00	2,97	118,50	0,71	1,0	negativní
PL 320	1,02	0,40	2,60	0,42	0,8	negativní
PL 321	0,52	0,01	0,97	0,62	1,1	negativní
PL 322	2,85	0,49	4,25	0,92	1,3	negativní
PL 325	1,65	0,49	3,50	0,42	0,9	negativní
PL 331	11,80	1,84	25,45	2,33	0,9	negativní
PL 332	0,60	0,08	0,59	0,10	2,0	pozitivní
PL 345	17,80	0,14	35,20	4,24	1,0	negativní
PL 348	34,10	0,99	68,20	3,54	1,0	negativní
PL 352	7,25	0,07	10,80	1,27	1,3	negativní
PL 356	135,50	9,19	167,00	12,73	1,6	pozitivní
PL 361	1,95	0,64	3,10	0,57	1,3	negativní
PL 362	19,30	1,13	40,80	2,83	0,9	negativní
PL 366	8,50	0,14	14,80	0,42	1,1	negativní
PL 369	42,70	0,14	89,90	1,56	0,9	negativní

Vzorek	Koncentrace AR [kopie/ μ l]	SD AR	Koncentrace RNAsaP [kopie/ μ l]	SD RNAsaP	CNV	CNV hodnocení
PL 373	13,65	0,21	5,60	0,42	4,9	pozitivní
PL 376	7,15	0,21	13,40	0,42	1,1	negativní
PL 379	83,70	1,84	74,00	8,49	2,3	pozitivní
PL 381	20,40	2,83	44,00	0,85	0,9	negativní