

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**Vyšetřování volné nádorové DNA v periferní krvi
pacientů s kolorektálním karcinomem**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce : RNDr. Lucie Benešová, Ph.D.

Garant bakalářské práce: doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D

Praha/ Hradec Králové 2010

Barbora Belšánová

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Praze 28.8.2010

Barbora Belšánová

Poděkování:

Velice bych chtěla poděkovat mé vedoucí práce RNDr. Lucii Benešové, Ph.D., za všechny čas a podporu, kterou mi projevovala jak během studií tak při vypracování této bakalářské práce. Velice si cením jejích rad, trpělivosti a času, který mi věnovala. Dále řediteli společnosti Genomac RNDr. Marku Minárikovi, Ph.D. za pozitivní přístup k mým studiím. Celé rodině, přátelům a spolupracovníkům za pochopení, kterého se mi od nich dostalo.

Obsah:

1	Úvod.....	5
2	CRC na molekulární úrovni.....	6
2.1	Molekulární podstata CRC	6
2.2	Základní typy CRC	7
2.3	Charakteristika nejznámějších genů analyzovaných v souvislosti s CRC.....	8
2.3.1	Gen KRAS	8
2.3.2	Gen APC	9
2.3.3	Gen TP53	10
3	Metody zjišťování přítomnosti nádorového onemocnění.....	11
3.1	Současné využívané metody	11
3.1.1	Testy okultního krvácení do stolice	11
3.1.2	Kolonoskopie	12
3.1.3	Tumorové markery	13
3.2	Nové možnosti detekce CRC.....	13
3.2.1	Cirkulující nádorové buňky	13
3.2.2	Detekce cirkulujících nádorových buněk	13
4	Volně cirkulující nukleová kyselina	15
4.1	Původ volně cirkulující nukleové kyseliny.....	15
4.2	Získávání cfDNA.....	17
4.2.1	Základní principy	17
4.2.2	Zpracování odebrané krve	17
4.2.3	Izolace plazmy a její kvantifikace	17
4.3	Možnosti analýzy cfDNA	19
4.3.1	Základní přístupy	19
5	Vlastní zkušenosti s detekcí cfDNA	23
5.1	Popis projektu	23
5.2	Optimalizace metodiky detekce cfDNA	23
5.3	Výsledky	24
6	Závěr	27
7	Seznam použitých zkratk	28
8	Seznam použité literatury	30

1 Úvod

Nádorová onemocnění spolu s chorobami srdce a cév patří mezi nejrozšířenější onemocnění jak u nás tak ve světě. V České republice na nádorová onemocnění zemře přibližně 27 000 tisíc obyvatel ročně, což činí 23% z celkové mortality u nás (www.szu.cz). Podstatou nádorového onemocnění je nekontrolovatelné bujení maligně transformovaných buněk. Tato maligní transformace může postihnout buňky kterékoliv tkáně a aby k ní došlo, je třeba nahromadění několika mutací, které vedou k zabránění působení kontrolních mechanismů a tím k následné nekontrolovatelné proliferaci buňky. Vznik mutací nastává zejména působením karcinogenů fyzikální, chemické nebo biologické povahy (Leber a Efferth 2009).

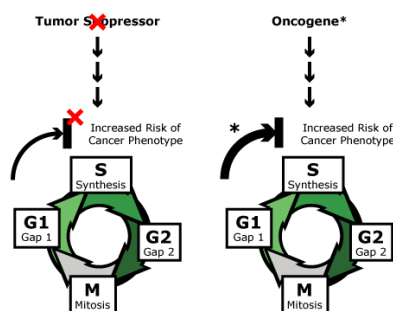
Jedním nejčastěji diagnostikovaným novotvarem v České republice je nádor tlustého střeva a konečníku (dále jen CRC = colorectal carcinom). Česká republika zaujímá světové prvenství ve výskytu tohoto onemocnění u mužů a smutná je i devátá pozice u žen (www.uzis.cz). V posledních letech dochází ke stagnaci incidence a dokonce k mírnému poklesu mortality (Vyzula 2009). To může být zapříčiněno zvyšující se osvětou lidí zaměřenou na prevenci a stále se zlepšujícími screeningovými metodami, díky kterým může dojít k brzkému zachytu nádoru a jeho včasnému chirurgickému odstranění. V případě zjištění rakoviny v pozdějším stádiu je největším problémem CRC jeho velká invazivita a časté metastazování do ostatních orgánů, které právě bývá pro pacienty osudným. Jedním z prognostických a diagnostických faktorů by mohla být neinvazivní metoda, založená na sledování volné nádorové DNA nebo cirkulujících nádorových buněk v plazmě pacientů. Cílem této bakalářské práce je seznámit se s problematikou detekce a významu volně cirkulující DNA prostřednictvím recentní literatury a krátká prezentace praktických zkušeností z této oblasti v laboratořích Genomac.

2 CRC na molekulární úrovni

2.1 Molekulární podstata CRC

Příčinou vzniku zhoubných nádorů je postupné hromadění mutací u genů důležitých pro vnitrobuněčnou regulaci buňky (Kapras a kol. 1996).

Geny podílející se na nádorových zvratech se dělí do dvou tříd a to na tumor-supresorové geny a protoonkogeny, které se vlivem mutace mění na onkogeny. Tumor-supresorové geny jsou zapojené do regulace buněčného cyklu. Jejich hlavní funkcí je pozastavení buňky v G1 fázi nebo inhibice jejího růstu, dále jsou zodpovědné za opravu poškozené DNA a udržení integrity genomu. Vzniklé mutace způsobují ztrátu jejich funkce (Obr. 1).



Obr. 1

Působení mutací v tumor-supresorových genech a protoonkogenech na buněčný cyklus.

(http://missinglink.ucsf.edu/lm/cell_cycle/images/oncogenes2.png)

Častá obnova buněk sliznice tlustého střeva podporuje jejich náchylnost ke vzniku změn v genetické výbavě (Alberts a kol. 1998). Hromadění mutací je doprovázeno postupnou přeměnou buněk z neporušeného epitelu tlustého střeva přes adenomatózní polyp ke vzniku adenokarcinomu (CRC) a vzdálených metastáz. Z tohoto důvodu je CRC často využíván při zkoumání vývoje a progresu nádorového onemocnění na bázi molekulární genetiky a mnoho genů účastnících se signálních drah vedoucích ke vzniku CRC je již detailně prozkoumáno.

2.2 Základní typy CRC

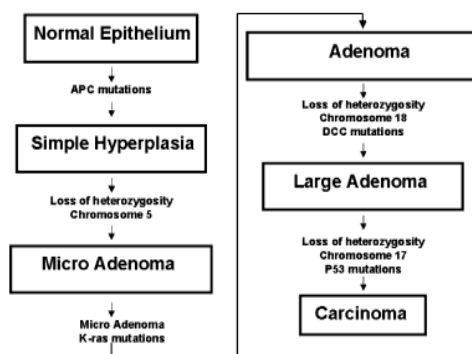
CRC můžeme rozdělit na vrozené a sporadické formy. U vrozené formy jsou mutace přítomny ve všech buňkách těla. Nejznámějšími typy vrozených kolorektálních nádorů zastoupených z 20% všech CRC jsou Familiární adenomatózní polypóza (FAP – Familial Adenomatous Polyposis) a Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC = Hereditary nonpolyposis colorectal cancer). FAP je onemocnění projevující se výskytem sta či tisíců polypů v tlustém střevě a rektu. Většinou je toto onemocnění způsobeno zárodečnými mutacemi v genu APC (adenomatous polyposis coli) a dále v genu MYH (mutY homolog (E. coli)) (Hisamuddin a Yang 2004). HNPCC, známá také pod označením Lynchův syndrom, je dominantně dědičné onemocnění s vysokým rizikem vzniku CRC bez předchozího rozvoje mnohočetných polypů. Vzniká na základě mutací v tzv. mismatch-repair genech, které zajišťují opravy náhodně vzniklých chyb při replikaci DNA (Marra a Boland 1995).

Sporadické formy vznikají především na základě působení vnějších faktorů a tvoří kolem 80% případů kolorektálních nádorů (Obr. 2).



Obr. 2
Endoskopické zobrazení kolorektálního karcinomu (ÚVN Praha)

Proces vývoje sporadického CRC na molekulární úrovni je popsán tzv. Vogelsteinovým modelem. Podle tohoto modelu se v časně vývojové fázi vyskytují mutace v genu APC, následně vznikají v genu KRAS, dále dochází k mutacím a rozsáhlým delecím genu DCC a nakonec, ve fázi pokročilého karcinomu, je možné detekovat mutace a genové delece v genu TP53 (Fearon a Vogelstein 1990) (Obr. 3).



Obr. 3
Karcinogeneze – Vogelsteinův model (Minarik a kol. 2004)

Výsledky některých prací jsou v souladu s tímto modelem (Müller a Sonnenberg 1995, Hoff a kol. 1996), jiné ovšem ne (Jass 2002, Minárik a kol. 2004, Smith a kol. 2006), což by mohlo být vysvětleno existencí dalších drah, jejichž aberace vedou ke vzniku CRC. Jedná se například o mutace v genech FAS, FASL podílejících se na vzniku a přenosu apoptotického signálu do buňky (Moeller a kol. 1994, Zavoral a kol. 2003). Pro sporadický CRC jsou typické mutace v genech APC, KRAS, TP53 plus další BRAF, CTNNB1, PIKC3CA (www.sanger.ac.uk, <http://tools.niehs.nih.gov>). Mutace mohou být představovány formou jednobodových změn, delecí či insercí (Tab. 1).

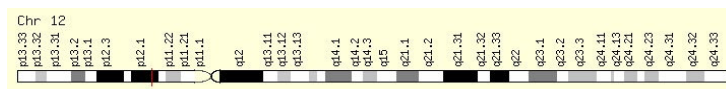
Tab. 1
Přehled nejčastěji se vyskytujících mutací v CRC (www.sanger.ac.uk, <http://tools.niehs.nih.gov>)

název genu	procentuelní zastoupení detekovaných mutací	nejčastěji v exonu:	nejčastěji v kodónech:
KRAS	30-50 %	1	12, 13
TP53	60-75%	5	175
		6	248, 245
		7	196, 213
		8	273, 282
APC	60-80%	15	654-1600

2.3 Charakteristika nejznámějších genů analyzovaných v souvislosti s CRC

2.3.1 Gen KRAS

Gen KRAS (kirsten rat sarkoma) je protoonkogen nacházející se na 12. chromozómu krátkého raménka, přesnější lokalizace je 12p12.1 (Obr. 4). Velký je přibližně 42kbp jeho mRNA 1486 bp a skládá se celkem ze 6 exonů.



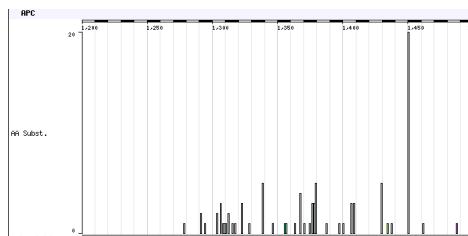
Obr. 4

Lokalizace genu Kras na 12 chromozomu (www.genecards.org/pics/loc/GC12M025358.KRAS.png)

Gen KRAS kóduje malý GTP vazebný protein, jež aktivuje signální dráhu v odpovědi na vazebný receptor růstového faktoru. Protein pro svojí malou molekulovou hmotnost – 21 kDa bývá označován jako p21^{ras}. Díky mutacím vyskytujícím se nejčastěji v 1. exonu kodónech 12,13 dochází k trvalé aktivaci proteinu p21^{ras} a to může vést ke stálému přenosu růstových signálů do buňky a k následnému nekontrolovatelnému dělení vedoucímu ke vzniku tumoru (Waldmann a Rabes 1996, Smith a kol. 2006). Přeměněný protein je příčinou vzniku mnoha tumorů (např. u plicního adenokarcinomu, adenokarcinomu slinivky) a u sporadického kolorektálního karcinomu se vyskytuje ve 30-50 % (Javle a Hsueh 2009).

2.3.2 Gen APC

APC je gen lokalizovaný v oblasti 5q21-22 a skládá se z 15 exonů. Kóduje tumor-supresorový protein APC, jehož hlavní funkcí je negativní regulace buněčného cyklu a inhibice buněčné proliferace. Také působí na procesy jakými jsou buněčná migrace a adheze, transkripční aktivace a apoptóza (<http://www.genecards.org>). Zárodečný defekt proteinu způsobuje vznik FAP (viz. Kap. 2.2) a somatická forma mutace způsobuje vznik adenomu, který obvykle vygraduje ve zhoubný nádor. U kolorektálního karcinomu se většina mutací vyskytuje v exonu 15 v tzv. MCR (MCR = mutation cluster region) oblasti pokrývající rozsah kodónů 1286-1513, nejčastěji však v kodónech 1309 a 1450 (Beroud a Soussi 1996). Uvádí se, že gen nese mutaci nebo je deletovaný u přibližně 50% sporadických adenomů a u 60-80% sporadických CRC (Obr. 5) (Boland 2002).



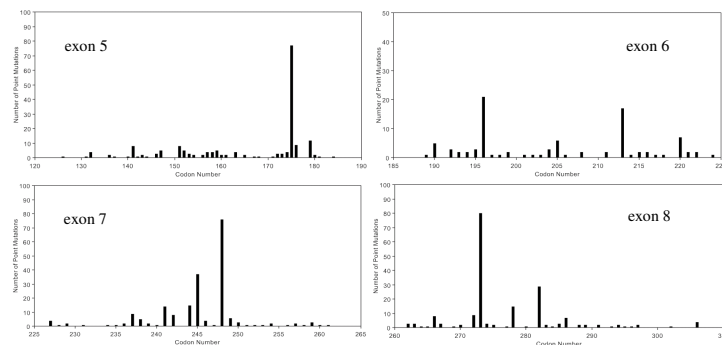
Obr. 5

Zobrazení MCR oblasti, ve které se vyskytuje nejvíce mutací.

(<http://www.sanger.ac.uk/tmp/cancer/cosmic/SJ/d01RqmSO81we8871N6.png>)

2.3.3 Gen TP53

Gen TP53 je tumor-supresorový gen lokalizovaný na krátkém raménku 17. chromozómu přesněji 17p13.1. Jedná se o gen kódující protein p53, který odpovídá za regulaci vybraných genů působících např. na zástavu buněčné proliferace, apoptózu, opravy DNA a na změny metabolismu buňky. V normálních buňkách je protein p53 exprimován v nízkém stupni, kdežto v pozmeněných buněčných liniích se exprimuje ve stupni vysokém, kde způsobuje maligní transformaci. p53 je vazebný protein obsahující místo transkripční aktivace, vazebné místo pro navázání DNA k aktivaci exprese proteinů a oligomerizační domény. Mutace v genu TP53 se nachází u různých nádorových onemocnění. U CRC se výskyt mutací pohybuje kolem 75% a nejčastěji v exonech 5 (kodón 175), 6 (kodón 196), 7 (kodón 248) a 8 (kodón 273) (Obr. 6) (Lea a kol. 2009).



Obr. 6

Znázornění výskytu bodových mutací v exonech genu p53.

(<http://tools.niehs.nih.gov/CFIDE/GraphData.cfm?graphCache=wc50&graphID=Images/1363586580100058.JPG>)

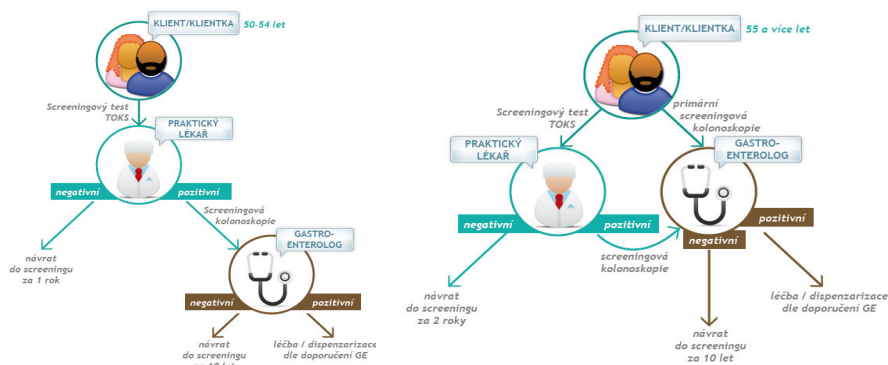
3 Metody zjišťování přítomnosti nádorového onemocnění

3.1 Současně využívané metody

V současné době se zjišťuje přítomnost karcinomu rekta a tlustého střeva několika metodami. Nejčastěji používané jsou testy na okultní krvácení, kolonoskopie a další z možností je detekce tumoru pomocí tumorových markerů.

3.1.1 Testy okultního krvácení do stolice

Okultním krvácením se označuje chemický průkaz nepatrných stop krve ve stolici při normálním makroskopickém vzhledu. Mikroskopické krvácení ve stolici může být totiž jediným příznakem nádoru tlustého střeva. Testy okultního krvácení do stolice (TOKS) jsou nízkonákladové testy, které se využívají jako úvodní metoda při screeningovém sledování CRC (Obr. 7). Tento program je v České republice zaveden od roku 2000 a jedná se o populační screening bezpříznakových jedinců nad 50 let ve dvouletém intervalu. Testy jsou levné, rychlé, pacient si je provádí sám v domácím prostředí a jsou zcela hrazeny pojišťovnou (Frič a Zavoral 2010).



Obr. 7

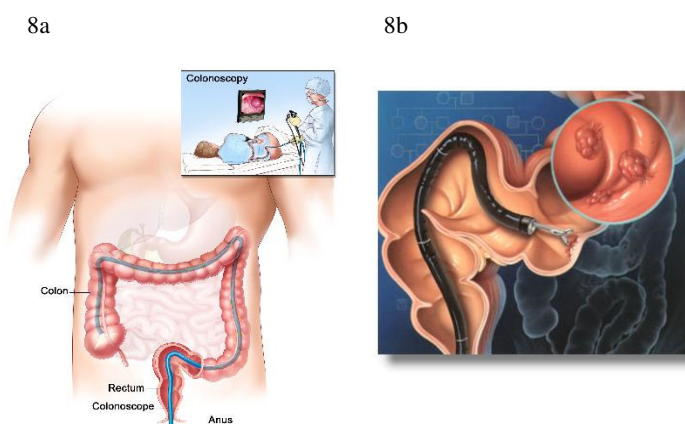
Znázornění organizačního schématu screeningového programu v České republice (Suchánek a kol. 2009)

Existují dvě metody průkazu okultního krvácení a to chemický průkaz hemoglobinu tzv. guajakový test a imunochemický průkaz globinové části hemoglobinu. U guajakového testu je nutné, aby pacient před vyšetřením vynechal všechny potraviny obsahující krev, protože pozitivně reaguje i s hemoglobinem nehumánního původu. Druhý citlivější imunochemický test je založen na detekci hemoglobinu reagujícího s monoklonální protilátkou namířenou proti lidskému hemoglobinu. Při využití tohoto testu není nutná dietní restrikce. Odběr vzorku a

následné vyhodnocení je snadnější a výsledek může dát kvalitativní i kvantitativní hodnoty. Nicméně pozitivní výsledek u obou dvou testů může způsobovat jakékoliv krvácení (např. z dásní, duodenálního vředu, hemoroidů nebo po předávkování antikoagulanty) (Racek a kol. 1999). Nebezpečím při využití TOKS může být i falešně negativní výsledek a to v případě, když nedochází ke krvácení do stolice. V těchto případech je možnost zachytit nádor pomocí endoskopických sond.

3.1.2 Kolonoskopie

Kolonoskopie je od roku 1970 využívána jako diagnostická a léčebná metoda umožňující lékaři prohlédnout tlusté střevo a rektum, popřípadě zároveň bezbolestně odebrat tkáň pro další možná vyšetření. Jedná se tedy o kompletní vyšetření tlustého střeva a konečníku prováděné pomocí ohebné sondy (endoskopu) (Obr. 8a). Sonda je široká 11-13mm a dosahuje délky až 15m. Snímání obrazu tlustého střeva je zajištěno světelným zdrojem na konci endoskopu, ve kterém vedou optická vlákna umožňující přenášet obraz z nitra střeva na obrazovku. Obraz může být také přenášen miniaturní kamerou umístěnou taktéž na konci sondy. Vyšetření trvá v průměru 30 minut, což se odvíjí od délky a tvaru tlustého střeva. Výhodou kolonoskopie je její kurativní využití, kdy se při vyšetření mohou rovnou odstranit nalezené polypy, malé nádory a nebo odebrat vzorek na další vyšetření (Obr. 8b). Momentálně se jedná o nejsenzitivnější metodu v detekci nádoru tlustého střeva a konečníku. Nevýhodou je velká náročnost provedení, vysoké náklady, náročná příprava pacienta a potřeba zkušeného a kvalifikovaného personálu.



Obr. 8

8a Zobrazení kolonoskopického vyšetření

(<http://www.bowelandkeyholeclinic.com/images/uploaded/Colonoscopy%20Image.jpg>)

8b Nález polypu a jeho okamžité odstranění (<http://www.fleetattorney.net/media/2009/06/colonoscopy.jpg>)

3.1.3 Tumorové markery

Třetí možností zjištění přítomnosti a monitorování nádorového onemocnění v tlustém střevě je stanovení karcinoembryonálního antigenu (CEA). Jedná se o glykoprotein, který je produkován buňkami střevní sliznice. Je to jeden z mála tumorových markerů, který disponuje určitou citlivostí, nicméně stále ne stoprocentní. Zvýšení jeho hladiny bývá detekováno jenom z 50% nemetastazujících a z 80% metastazujících nádorů tlustého střeva, mnohdy hladiny odpovídají i velikosti nádoru. Bohužel tento tumorový marker není ani dostatečně specifický. Jeho zvýšené hodnoty mohou být spjaty s jiným nádorovým onemocněním, prekancerózou, zánětlivým onemocněním, ale také u kuřáků. Hlavní nevýhodou je, že vyšší hodnoty nejsou detekované u všech nemocných, citlivost se zvyšuje až s pokročilostí onemocnění, což u CRC vede k fatálním následkům. Antigen může být použit jako prostředek pro monitorování úspěšnosti léčby nebo sledování recidivy již známého onemocnění. Například při stále přetrvávajících zvýšených hladinách po operaci nádoru lze usuzovat na neprokázanou metastázu či nekompletní odstranění nádoru (Racek a kol. 1999).

3.2 Nové možnosti detekce CRC

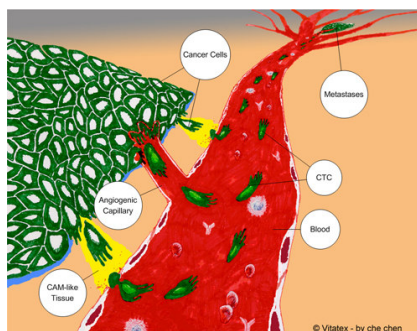
3.2.1 Cirkulující nádorové buňky

Jak se zdá, momentálně není k dispozici metoda, kterou by se dalo zjistit nádorové onemocnění tlustého střeva neinvazivně a zároveň s dostatečnou citlivostí a specifitou. Díky sledování rakoviny na podkladě změn DNA se výzkumy ubírají směrem ke stále citlivějším molekulárně biologickým metodám. Tato snaha se zaměřuje na vývoj metodiky, která by splňovala všechny výše zmíněné vlastnosti. Jednou z možností se jeví detekce cirkulujících nádorových buněk. Druhou metodou, na kterou je zaměřena tato bakalářská práce, je detekce volně cirkulující DNA v plazmě.

3.2.2 Detekce cirkulujících nádorových buněk

Cirkulující nádorové buňky (CTC = circulating tumor cells) jsou buňky uvolněné z nádoru, které se šíří krví a lymfatickou tkání do celého organismu (Obr. 9). Přítomnost CTC v periferní krvi u pacientů s CRC je známá (Molnar a kol. 2003) a možnost jejího využití v klinické praxi by mohla být relativně rozsáhlá. Díky své krátké

životnosti v periferní krvi (Lankiewicz a kol. 2008) by představovala nezávislý marker pro sledování přítomnosti a rozsahu onemocnění a měření její hladiny by se dalo využít v monitorování léčby a zároveň účinnosti aplikované terapie (Tabar a kol. 1999, Patel a kol. 2002, Guller a kol. 2002, Koch a kol. 2006, Lankiewicz a kol. 2008).



Obr. 9

Uvolňování nádorových buněk (zelené) do krevního řečiště (www.vitatex.com/images/metastasis-diagram-1.jpg)

Současné metody pro analýzu CTC většinou využívají pro izolaci nebo detekci a označení CTC protilátku proti epiteliálnímu povrchovému antigenu (EpCAM = epithelial cell adhesion molecule) a to v různých modifikacích. Způsobů detekce takto navázaných CTC je pak několik např. pomocí průtokové cytometrie, fluorescenční in situ hybridizace nebo RT-PCR (reverzní transkripce následovaná polymerázovou řetězovou reakcí) (Tab. 2).

Nicméně tyto metody jsou poměrně nákladné a náročné na rutinní využití, takže vhodněji se jevícím markerem pro detekci CRC se spíše nabízí analýza volně cirkulující nukleové kyseliny (dále jen cfDNA – cell free deoxyribonucleic acid).

Tab. 2

Shrnutí metod vyvinutých pro detekci CTC v krvi pacientů (Mata a Raponi, 2009)

Technologie	Značení CTC	Detekce: kritéria	Indikace
CellSearch™	EpCAM ferrofluid	Buněčný analyzátor: cytokeratin, DAPI, CD45	Schválené pro karcinom prsu, kolorekta a prostaty připravované formy pro jiné nádory epiteliálního původu zahrnující rakovinu plic a vaječníků
Genetics	Cytokeratin a EpCAM imunomagnetická purifikace	Ariol SL 50: stejné jako u CellSearch	připravované pro rakovina prsu
Ikonisys	Centrifugace a/nebo filtrace	Ikonoskopie: cytokeratin 7 a 8 nebo EpCAM	připravované pro karcinom prostaty, kolorekta a vaječníků
Adnagen	EpCAM Imunomagnetická separace	RT-PCR technologie: více jak pět markerů na test	detekční kit dostupný pro karcinom kolorekta a prsu
CTC-Chip	EpCAM potažené mikropartikule	Fluorescenční mikroskopie: cytokeratin ⁺ a fenotypové morfologické vlastnosti Cyt ⁺ , DAPI ⁺ , CD45 ⁻ hodnoceny v omezeném počtu pacientů	připravované pro rakovinu plic, prostaty, slinivky, prsa a střeva

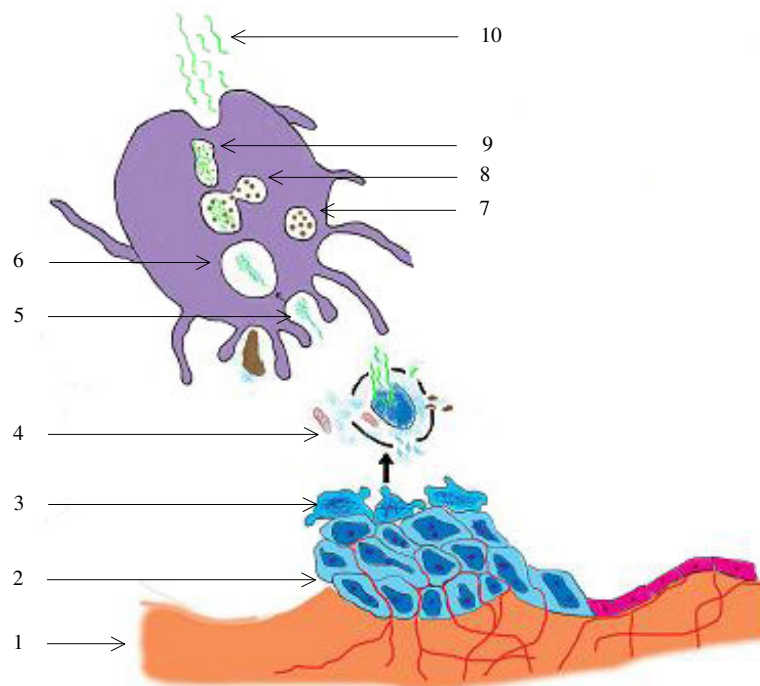
4 Volně cirkulující nukleová kyselina

4.1 Původ volně cirkulující nukleové kyseliny

První informace o existenci volně cirkulující nukleové kyseliny v plazmě a séru byly popsány již dříve (Mandel a Me'tais 1947; Koffler a kol. 1973). Pomocí nově nastupujících metod jako byla radioimunoanalýza se vysledovala přítomnost vyšší koncentrace cfDNA v séru pacientů s karcinomem než u zdravých osob a detekoval se její pokles po aplikaci chemoterapie (Leon a kol. 1977). Následovaly další publikace potvrzující původ cfDNA z karcinomů a její přítomnost u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním (Shapiro a kol. 1983, Stroun a kol. 1989). Nicméně v posledních dvou desetiletích s vývojem vysoce citlivých molekulárně biologických metod se zájem o detekci cfDNA značně rozšířil.

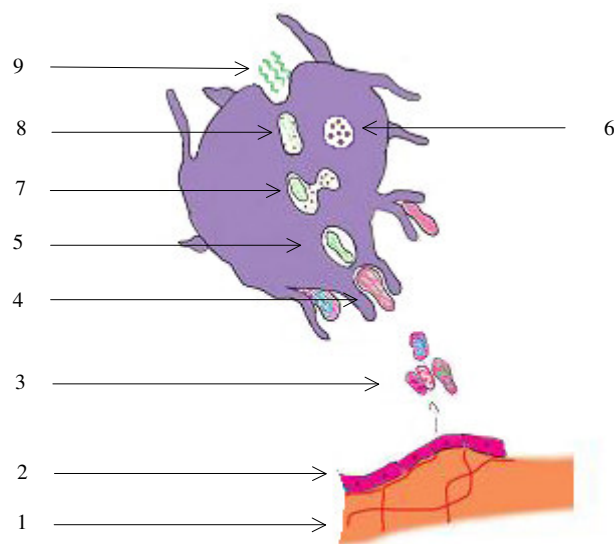
Jak se zdá, detekce cfDNA je v popředí zájmu vědecké společnosti, ale bohužel stále není zcela objasněn mechanismus jejího uvolňování do krevního řečiště. Diel a kol. (2005) uvažuje, že DNA fragmenty vyskytující se v cirkulaci pocházejí z nekrotických neoplastických buněk fagocytovaných makrofágy (Obr. 10a), které také pohlcují nenádorové (apoptotické) buňky (Obr. 10b), což je důvod, proč se určitá hladina nenádorové cfDNA vyskytuje i u zdravých jedinců (Brouckaert a kol. 2004). Nekrotické buňky vznikají u invazivních tumorů, kde dochází k nedokrvení tkáně s následnou hypoxií (Choi a kol. 2005). Nezhoubné nádory touto vlastností nedisponují a množství produkované fragmentované DNA je minimální (Thomlinson a Gray 1955, Leek a kol 1999). To znamená, že čím je tumor agresivnější tím stoupá i stupeň nekrózy a dochází k odpovídajícímu vzestupu cirkulující nádorové DNA. Nekróza ale ovlivňuje i okolní nenádorové buňky, což vede k vyplavení také nenádorové cfDNA do krevního oběhu a u pacientů s pokročilým karcinomem pak dochází ke zvýšení koncentrace nádorové i nenádorové cirkulující DNA v plazmě.

Skutečnost, že pacienti s rakovinou mají zvýšený obsah volné DNA ať už jakéhokoliv původu, lze využít pro sledování cfDNA v detekci nádorového onemocnění. I přesto, že už se touto problematikou zabývá mnoho výzkumných pracovišť, její praktické zavedení je stále ještě v zárodku. Další kapitoly v této práci budou věnovány různým možnostem izolace a následné detekce cfDNA.



Obr. 10a – Znázornění likvidace nekrotické nádorové buňky makrofágem a uvolnění jejích nestejně velkých DNA fragmentů do krevního řečiště.

Ve sliznici tlustého střeva (1) vyrůstá nádor (2), který má na svém povrchu vrstvu nekrotických buněk (3). Nekrotická nádorová buňka se uvolní (4) a její fragmenty zachytí makrofág svými panožkami (5). Z pohlceného fragmentu vzniká fagozom (6), se kterým splyne lysozom (7) za vzniku fagolysozomu (8). Poté jsou natrávené částice včetně různě dlouhých fragmentů nádorové DNA (9) uvolněny do svého okolí (10).



Obr. 10b – Znázornění likvidace apoptotické buňky makrofágem a uvolnění jejích stejně dlouhých DNA fragmentů do krevního řečiště.

Ve sliznici tlustého střeva (1) se nachází vrstva normálního epitelu (2), z níž se uvolňuje buňka jdoucí do apoptózy. Z té vznikají apoptotické částice (3), které zachytí makrofág svými panožkami (4). Z pohlcené částice vzniká fagozom (5), se kterým splyne lysozom (6) za vzniku fagolysozomu (7). Poté jsou natrávené částice apoptotických buněk včetně DNA o stejných velikostech (8) uvolněny do svého okolí (9).

4.2 Získávání cfDNA

4.2.1 Základní principy

Proto, aby došlo k úspěšné detekci přítomnosti nádorové cfDNA v plazmě či v séru, je nutné zvolit vhodnou metodiku. To se skládá z několika podstatných kroků. Prvním je zpracování odebrané krve tak, aby nedošlo k porušení membrán krevních buněk, tedy k hemolýze a následné kontaminaci plazmy DNA pocházející z jadra krevních buněk. Dalším krokem je izolace cfDNA, kdy je nutné zvolit co nejvhodnější metodu k získání dostatečného množství kvalitní DNA pro následné molekulárně-biologické aplikace. Tyto aplikace jsou důležité k detekci, kvantifikaci získané cfDNA a posouzení jejího charakteru. Základní metodou je polymerázová řetězová reakce (dále PCR – polymerase chain reaction) a k detekci amplifikovaných produktů se nabízí např. gelová, kapilární či čipová elektroforéza nebo další metodiky jako je PCR v reálném čase.

4.2.2 Zpracování odebrané krve

Krevní vzorek odebraný do protisrážlivého roztoku se musí zpracovat nejpozději do 2 hodin po odběru, aby nedošlo k poškození jaderných krevních buněk a vyplavení jejich DNA do plazmy (Umetani a kol. 2006a). V některých studiích byl proveden odběr do heparinizovaných zkumavek (Su a kol. 2008, Kuang a kol. 2009), v jiných do zkumavek obsahujících roztok EDTA (Diehl a kol. 2008). Další publikace informují o využití séra (Gahan a Swaminathan 2008). Tento materiál není moc vhodný, protože při vzniku krevního koagula se sérum kontaminuje DNA z leukocytů, což potvrdil Umetani a kol. (2006a). Dále je nutné oddělit plazmu od krevních buněk centrifugací v co nejkratší době po odběru. Nastavení otáček by nemělo způsobit lýzu buněk a tím znehodnotit plazmu. Po primární centrifugaci se plazma může recentrifugovat (Su a kol. 2008) nebo přefiltrovat přes membrány o velikosti pórů 0,45 μm (Diehl a kol. 2008). Takto ošetřená plazma se pak uchovává při -20°C , až do doby zpracování. Někde jsou doporučovány nižší teploty (Beránek a kol. 2006).

4.2.3 Izolace plazmy a její kvantifikace

Základem pro úspěšnou detekci cfDNA je zvolení izolační metody zaručující získání dostatečného množství kvalitní DNA. Může se užít klasická fenol-chloroformová

extrakce (Beránek a kol. 2006) nebo komerční kity na principu membránových kolonek. Výhodou fenol-chloroformové metody je neomezené množství vstupního materiálu, takže zvýšením objemu izolované plazmy lze zvýšit výtěžek, zatímco v komerčních kitech je množství vstupního materiálu omezen. Jejich použití je ale značně jednodušší a existují již speciální kity určené přímo na izolaci cfDNA.

Kuang a kol. (2009) srovnával 3 izolační kity: Qiamp DNA Micro Kit (Qiagen), NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel) a Wizard (Promega). V této studii použil metodu dle Umetani a kol. (2006b), která vychází z toho, že většina nádorové DNA v plazmě pocházející z nekrotických buněk se pohybuje v nestejně velkých fragmentech a to od 185 do 926bp, zatímco DNA z apoptotických, tedy nenádorových buněk se vyskytuje vždy v poměrně uniformních velikostech od 185bp do 200bp (Giacona a kol. 1998). Na základě těchto skutečností zjišťoval množství obou typů cfDNA pomocí PCR v reálném čase a to tak, že amplifikoval dva různě dlouhé fragmenty Alu sekvence o velikostech 115bp a 247bp. Alu 115 zachycovala koncentraci krátkých fragmentů DNA pocházejících z apoptotických tedy nenádorových buněk a zároveň i DNA fragmentů pocházejících z buněk nádorových, zatímco Alu 247 zachycovala koncentraci pouze nádorové DNA. Následným poměrem Alu247/Alu115 vypočítal koncentraci DNA pocházející pouze z nádorových buněk. Na základě toho zjistil, že zatímco kitem NucleoSpin Plasma získal největší koncentraci celkové cfDNA, pro získání fragmentů pocházejících z nádorových buněk je vhodnější využít kit QiampDNA Micro Kit. Výsledky shrnuje tabulka (Tab. 3).

Tab. 3
Výsledky porovnání izolačních kitů pro detekci cfDNA (Kuang a kol. 2009).

Izolační kit	celková koncentrace DNA	procento nádorové DNA poměr Alu247/Alu115
Qiamp DNA Micro Kit (Qiagen)	0,064 ng/μl	59,4
NucleoSpin Plasma XS (Macherey Nagel)	0,086 ng/μl	10,9 %
Wizard (Promega)	0,021 ng/μl	50,9 %

V jiné studii využívali k získání cfDNA kit QIAamp MinElute Virus Vacuum kit (Qiagen). Výhodou tohoto kitu byl větší vstupní objem izolované plazmy (Diehl a kol. 2008). V některých dalších studiích používali kolonkové kity na izolaci z krve (Gal a kol. 2004), jejichž nevýhodou je ztráta malých fragmentů cfDNA skrze póry membrány vedoucí ke snížené citlivosti detekce (Kirsch a kol. 2008).

4.3 Možnosti analýzy cfDNA

4.3.1 Základní přístupy

Existují dva základní přístupy analýzy cfDNA. Kvantitativní analýza a analýza DNA alterací. První z nich je založený na pouhé kvantifikaci celkové cfDNA (nádorové i nenádorové) v plazmě pacientů a zdravých jedinců, často i bez předchozí izolace (Boni a kol. 2007). Zvýšená hladina u pacientů ukazuje na přítomnost nádorové cfDNA. Množství cfDNA je zjišťováno např. pomocí kvantitativní PCR v reálném čase amplifikací Alu sekvencí nebo jiných markerů (β -globin, β -actin (van der Vaart a Pretorius 2010)). Tato metoda může mít vysokou senzitivitu, ale poměrně nízkou specifitu (amplifikovány jsou nádorové i nenádorové cfDNA). Tu lze zvýšit metodou dle Umetaniho a kol. (2006b), založenou na amplifikaci dvou rozdílně velkých fragmentů, z nichž jeden představuje nádorovou a nenádorovou cfDNA a druhý pouze nádorovou cfDNA (viz kap. 4.2.3).

Druhý přístup zahrnuje nejprve nalezení nádorového markeru v primárním tumoru a dále detekci stejného markeru v izolované cfDNA. Nejčastěji používanými markery jsou aberace typické pro tumorovou DNA - jednobodové mutace či krátké delece protoonkogenů a tumor-supresorových genů a rozsáhlé delece a DNA hypermetylace promotorů tumor-supresorových genů.

Detekce rozsáhlých delecí probíhá pomocí analýzy mikrosatelitních markerů metodou LOH (loss of heterozygosity). Tato metoda má značná omezení, především potřebu amplifikace většího množství mikrosatelitních markerů a obtížnou interpretaci výsledků (Müller a kol. 2006).

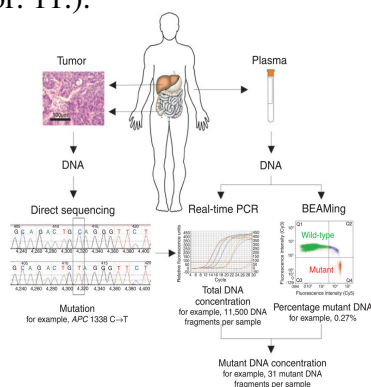
Analýza hypermetylace je možná několika způsoby jako je metylačně specifická PCR (Wong a kol. 1999.), kvantitativní nebo fluorescenční metylačně specifická PCR (Wong a kol. 2004, Frattini a kol. 2008), metylačně specifická restriční analýza (Deligezer a kol. 2003) a další. Přestože senzitivita této metodiky může být poměrně vysoká, specifita bývá nízká. Jedním důvodem je dynamičnost procesu metylace DNA, která může vést k rozdílnému metylačnímu stavu mezi dvěma DNA pocházejícími ze stejného nádoru např. primární tumor vs. metastáza (Wang a Dai 2007) nebo primární nádor vs. cirkulující cfDNA (Fujiwara a kol. 2005). Druhým

důvodem je možný výskyt stejné hypermetylace v primárním nádoru jako v některých zdravých buňkách nebo v buňkách jiného nádoru (Fleischhacker a Schmidt 2007).

Vyšetřování DNA variací typu jednobodových mutací nebo krátkých delecí, spočívá obvykle v úvodní PCR následované detekcí amplifikovaných produktů. To je možno několika způsoby a to od sekvenace s omezenou citlivostí, přes metody založené na konformačních změnách jako je SSCP (single strand conformation polymorfism) nebo TGGE (temperature gradient gel electrophoresis), konče vysokosenzitivními metodami jako je ME-PCR (mutant–enriched PCR), DCE (denaturant capillary electrophoresis) nebo BEAMing (zkratka pocházející ze základních komponentů: beads emulsion amplification and magnetic) – viz (kap.4.3.1.1). Všechny tyto metody se kromě vysoké citlivosti vyznačují při vhodně zvoleném markeru také vysokou specificitou. Ovšem hlavním omezením všech výše uvedených postupů založených na detekci DNA variací je potřeba nalezení nádorového markeru v primárním tumoru. Základem úspěšnosti je tedy široké portfolio sledovaných mutací s co nejvyšším výskytem v daném typu tumoru.

4.3.1.1 BEAMing

Zajímavou metodu pro detekci mutací v plazmě vyvinul Diehl a kol. (2005). PCR produkty vzniklé amplifikací úseku DNA obsahujícího danou mutaci smíchal s magnetickými kuličkami a směs rozptýlil do bilionů mikročástic v emulzi voda-olej. Pak provedl druhou PCR reakci pomocí primerů navázaných na magnetických kuličkách, následně hybridizaci vzniklých PCR produktů s dvěma typy specifických fluorescenčně značených sond (mutovaná a nemutovaná sekvence, z nichž každá byla značená jinou fluorescenční barvičkou) a nakonec kuličky analyzoval pomocí průtokové cytometrie. Výsledkem byl graf, který znázorňoval koncentraci mutovaných a nemutovaných fragmentů (Obr. 11.).



Obr. 11 Schématický přehled postupu detekce cfDNA metodou BEAMing (Diehl a kol. 2008)

Metodu pak aplikoval na sledování cfDNA u pacientů s CRC před operací a po operaci a výsledky korelovaly s úspěšností chirurgické léčby nebo případnou progresí onemocnění.

Tato metoda vykazuje zatím nevyšší senzitivitu ze všech publikovaných prací zabývajících se detekcí nádorové cfDNA. Prokazatelná frakce mutované cfDNA byla zachycena u všech pacientů s pokročilým CRC, u většiny pacientů s nemetastazujícím CRC a dokonce i u jednoho pacienta s nezhoubným onemocněním (adenom). Bohužel náklady na přístrojové vybavení a náročnost praktického provedení jsou tak vysoké, že zavedení do rutinní praxe je zatím nemožné.

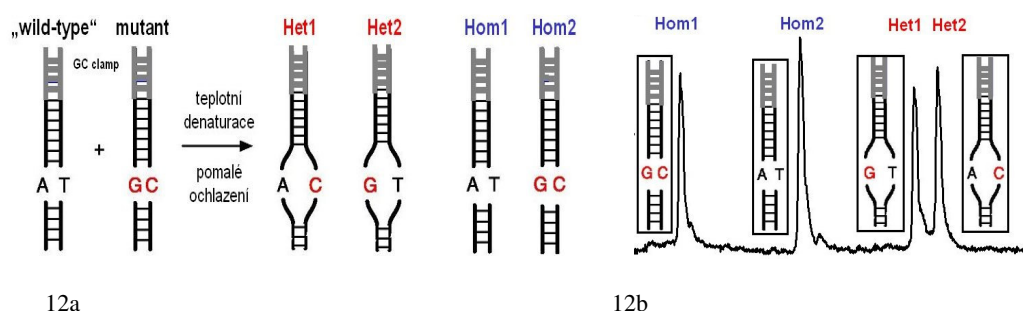
4.3.1.2 ME-PCR

Další speciální metodou pro vysoce citlivou analýzu nádorových frakcí cfDNA je ME-PCR (mutant enriched-PCR), postup založený na specifickém štěpení nemutované DNA restriční endonukleázou. Tato metoda má různé modifikace, ale obecně jde o PCR amplifikaci, která je po několika málo cyklech následovaná restričním štěpením cíleným na nemutovanou DNA, čímž dojde k obohacení směsi o mutovanou DNA. Dalším krokem bývá reamplifikace případně opět štěpení a nakonec detekce produktů například pomocí gelové elektroforézy (Asano a kol. 2006). Su a kol. (2004a, 2004b, 2008) testoval přítomnost nádorové cfDNA v plazmě, séru a moči u nemocných s CRC pomocí genu KRAS. Ke svému pokusu využil restriční enzym BstNI štěpící místo nemutované sekvence, který přidal do PCR směsi po prvním cyklu. Produkt poté reamplifikoval, znovu štěpil a nakonec detekoval na polyakrylamidovém gelu. Záměrem studie bylo porovnání ideálního množství vstupního objemu plazmy, séra nebo moči pro izolaci cfDNA. Lepší výsledky byly vyhodnoceny z většího objemu izolovaného materiálu. Nicméně pozitivní nálezy v plazmě pacientů nikterak neodpovídaly stadiu onemocnění pacientů a závěr byl zaměřen pouze na porovnání výtěžnosti DNA. Z praktické stránky by byla metodika velice nenáročná a potřebné přístrojové vybavení odpovídalo průměrné molekulárně-biologické laboratoři.

4.3.1.3 DCE

Poslední z výše uvedených metod patřících mezi vysoce citlivé techniky detekce DNA variací je denaturační analýza heteroduplexů za konstantní teploty pomocí kapilární elektroforézy. Princip této metody spočívá v separaci heteroduplexů neboli párů nekomplementárních bazí mezi dvěma řetězci DNA lišícími se v jednom

nukleotidu (mutace). Heteroduplexy vzniknou denaturací dvojřetězcových molekul DNA na jednořetězcové a jejich pomalou reasociací, při které vzniká jak původní dvojřetězcová DNA (obsahuje homoduplexy) tak i jejich kombinace (obsahují heteroduplexy) (Obr.12a). K separaci takto vzniklých DNA molekul pak dochází v důsledku rozdílů v jejich denaturačních teplotách. Při kapilární elektroforéze za teploty specifické pro analyzovanou mutaci se dvouřetězcové fragmenty rozevírají nejprve v místě heteroduplexu a následně v celém zbytku fragmentu a tato postupná denaturace způsobí jejich zbrzdění a následnou separaci v průběhu elektroforézy. U vzorku obsahujícího mutovanou DNA jsou pak výsledkem čtyři píky (Obr. 12b) (Minárik a kol. 2004).



Obr. 12

12a) Tvorba heteroduplexů pro DCE analýzu

12b) Separace heteroduplexů pomocí DCE analýzy (Benešová 2007)

Tato metoda v souvislosti s analýzou cfDNA zatím nebyla publikována, nicméně dosavadní výsledky z naší laboratoře ukazují, že záchyt cirkulující nádorové DNA je poměrně vysoký, a to zejména u pokročilých CRC (viz kap. 5.3). Navíc jednoduchý postup je složen pouze ze dvou kroků – PCR amplifikace a kapilární elektroforézy bez nutnosti speciálního přístrojového vybavení.

5 Vlastní zkušenosti s detekcí cfDNA

5.1 Popis projektu

Od roku 2008 se zabýváme projektem zaměřeným na využití molekulárně-biologických metod pro včasný záchyt progresu onemocnění CRC pomocí vyšetření cfDNA. Jedním z cílů projektu je vyvinout dostatečně citlivou metodu pro detekci cfDNA v plazmě pacientů s primárním karcinomem tlustého střeva a rekta. Součástí studie je optimalizace složitého logistického procesu obnášejícího sběr bioptického materiálu a plazmy.

Provádíme sběr vzorků od pacientů indikovaných k operaci a podstupujících kolonoskopické vyšetření. U operabilních pacientů probíhá shromažďování vzorků krve v následujících časových intervalech: 1 den před operací, během operace, 1. a 7. den po operaci a dále každé 3-6 měsíců co možná nejdéle. Vzorky bioptické tkáně jsou během operace odebrány z primárního tumoru, přilehlých uzlin a metastáz. U kolonoskopických vyšetření se odběry provádí v den kolonoskopie a následně každý 3.-6. měsíc, bioptická tkáň je odebrána z tkáně z klinicky vypadajícího tumoru pomocí kolonoskopu. Pokaždé se odebírá 40ml nesražené krve, která se nejpozději do dvou hodin centrifuguje, zamrazí na -20°C . Tento postup je prováděn na odděleních kde probíhají odběry, čímž vždy dochází k rychlému zpracování odebraného materiálu.

5.2 Optimalizace metodiky detekce cfDNA

Pro izolaci DNA z tkáňových vzorků využíváme komerční kit na principu membránových kolonek pro izolaci DNA z tkáně. Pro získání DNA z plazmy jsme zvolili kit určený přímo pro izolaci DNA z plazmy založený také na principu membránových kolonek, ale s výrazně menší plochou membrány pro možnost aplikace minimálního objemu elučního pufru a tím maximální zkoncentrování izolované cfDNA. Po optimalizačních postupech a porovnáním několika souprav jsme zvolili kit NucleoSpin Plasma XS (Macherey Nagel). Mutace v primárním nádoru určujeme pomocí kitů GenoScan vyvinutých v naší laboratoři, které jsou založeny na PCR s tvorbou heteroduplexů a následné detekci pomocí DCE (viz kapitola 4.2.3).

5.3 Výsledky

Doposud jsme do studie zahrnuli 103 pacientů od nichž jsme získali celkem 155 bioptických vzorků a 341 vzorků krevní plazmy. Pro detekci mutací jsme zvolili sadu sedmi markerů v genech KRAS, APC a TP53, kdy záchyt mutace v primárním tumoru byl 53,4%. Toto portfolio jsme následně rozšířili o další tři markery v genech BRAF a PIK3CA, čímž došlo k navýšení záchytu mutací na 63,1% (Tab.4). Nyní pracujeme na optimalizaci dalších deseti markerů v genech APC, CTNNB1 a PTEN a očekáváme, že dojde k navýšení záchytu na 80%.

Tab. 4

Tabulka znázorňující procentuální vzrůst záchytu mutací při obohacení porfolia mutací.

název genu	exon	kodony nebo mutace	procento zachycených pacientů	procento celkem zachycených pacientů
KRAS	1	12,13	53,40%	62,10%
APC	15	1265-1293		
	15	1434-1460		
TP53	5	126-186		
	6	187-224		
	7	225-261		
	8	262-307		
BRAF	16	V600E	8,7%	
PIK3CA	9	E542E		
	20	T1025A T1031I T1047R		

Pacienti, od nichž jsme doposud nasbírali vzorky, jsou rozděleni do 3 skupin. Skupinu A tvoří pacienti s nepokročilým CRC (stadium I, II) o celkovém počtu 28, do skupiny B spadá 24 pacientů s pokročilým karcinomem (stadium III) a 34 pacientů s metastatickým karcinomem (stadium IV) tvoří skupinu B. Dále máme 2 pacienty s adenomem (benigní polyp). U 15-ti pacientů prozatím nemáme informace o stádiu onemocnění.

Nejprve analyzujeme mutace v tkáňovém vzorku (bioptický vzorek, tumor, uzlina, metastáza). V případě, že dojde k záchytu mutace, analyzujeme všechny vzorky plazmy nemocného, což bylo doposud u 64 pacientů (62,1%), z nichž jsme plazmu vyšetřili u 54 (85,9%). Z těchto vyšetřených pacientů jsme nádorovou cfDNA prokázali u 22 (41%), 2 ze 17 zařazených do skupiny A (11,8%), 3 z 11 pacientů ze skupiny B

(27,3%) a 14 ze 16 pacientů patřících do skupiny C (87,5%). U nezařazených byl pozitivní nález u 3 z 9 nemocných (33,3%). Dosažené výsledky shrnuje (Tab. 5).

Se zvyšujícím se stupněm pokročilosti CRC tedy pozorujeme i častější se výskyt detekovatelné hladiny nádorové cfDNA a tak se zde nabízí možnost využití analýzy cfDNA pro zjištění stavu onemocnění.

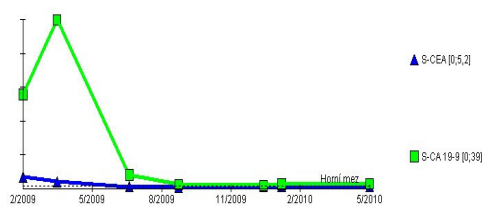
Tab. 5
Shrnutí dosažených výsledků

rozdělení do skupin	stadium	počet pacientů			
		počet pacientů	mutace v bioptickém vzorku	analýza cfDNA	detekce nádorové frakce
adenom	0	2	2	2	0
A	I, II	28	21	17	2
B	III	24	13	11	3
C	IV	34	18	16	14
?	?	15	10	9	3
celkem		103	64	55	22

Pokud jde o přítomnost nádorové cfDNA v krvi pacientů před a po operaci, byly výsledky následující. U 13 z 22 pacientů indikovaných k operaci a vyšetřených na cfDNA jsme detekovali mutantní (nádorovou) DNA v odběru před operací, z toho jsme u 9 pacientů, podstupujících kurativní výkon, mutaci po operaci již nedetekovali. U zbylých 4 pacientů, kteří podstoupili pouze paliativní výkon jsme mutaci prokázali i pooperačně.

Zajímavým případem byl pacient s metastatickým CRC, u kterého jsme detekovali mutaci v primárním nádoru a následně v plazmě před i během operace a 1. a 7. den po operaci, což korespondovalo s tím, že operace nebyla kurabilní. Podle operačních záznamů bylo totiž zjištěno, že nález je tak rozsáhlého charakteru, že je inoperabilní, proto byla provedena pouze derivační sigmoideostomie. Pacient pak byl indikován k chemoterapii monoklonální protilátkou proti růstovému faktoru, který produkují nádorové buňky (bevacizumabem). V odběru po 5-ti měsících léčby již v plazmě pacienta nebyla detekována nádorová frakce cfDNA, pacient byl v remisi dle našich hodnot i z pohledu klinika i laboratorních hodnot tumorových markerů. Po dalších 6-ti měsících byla u pacienta opětovně detekována nádorová frakce cfDNA. Podle klinických dat byl pacient v mírné progresi onemocnění, ale tumorové markery progresi neukazovaly (Obr. 13). Naše dosavadní výsledky tedy naznačují, že nádorová

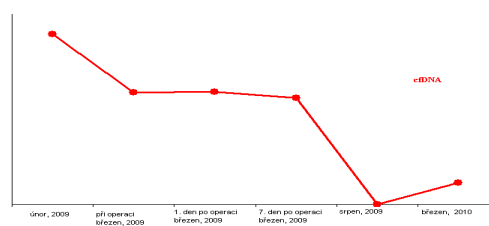
cfDNA by mohla být vhodným markerem pro monitorování stavu onemocnění a časnou detekci relapsu.



13a

Obr. 13

13a) Znázornění hladin CEA u pacienta



13b

13b) Zobrazení hladin cfDNA u pacienta

6 Závěr

Z uvedeného je zřejmé, že časný záchyt nádorových onemocnění je jediná možnost dávající pacientům naději na účinnou léčbu. U kolorektálního karcinomu je doposud nejcitlivější detekční metodou kolonoskopie, která je ale, vedle přístrojové a personální náročnosti, pro pacienty často odrazující a mnohdy to může být hlavní příčinou nezachycení nádoru včas s fatálními následky. Cílem této práce proto bylo představit možnost minimálně-invazivního vyšetření přítomnosti kolorektálního karcinomu z periferní krve. Dle nasbíraných poznatků se zatím zdá, že vyšetření volně cirkulující DNA je rozhodně vhodné pro záchyt progresu či relapsu onemocnění u pacientů podstupujících chirurgickou či onkologickou léčbu. Je patrné, že tato metoda vykazuje poměrně vysokou specifitu a i hladina citlivosti pro záchyt u již sledovaných pacientů se zdá být dostatečná. Výhodou vyvíjených metodických postupů je jejich přímá aplikovatelnost kromě CRC i na jiné solidní nádory. Doufejme, že na současné stádium vývoje a hledání nenákladných a časově nenáročných metodik bude již brzy navazovat přímé využití v klinické praxi tak, aby se tyto metodiky staly součástí screeningových programů.

7 Seznam použitých zkratk

APC	– Adenomatous polyposis coli
BRAF	– V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CEA	– Carcinoembryonální antigen
cfDNA	– Volná buněčná deoxyribonukleová kyselina (cell free deoxyribonucleic acid)
CRC	– Kolorektální karcinom
CTC	– Cirkulující tumorové buňky (circulating tumor cells)
CTNNB1	– Catenin (cadherin-associated protein), beta 1
DCC	– Deleted in colorectal carcinoma
DCE	– Denaturační kapilární elektroforéza (denaturant capillary electrophoresis)
DNA	– deoxyribonukleová kyselina
EGFR	– Epidermal grow factor receptor
EpCAM	– Epithelial cell adhesion molecule (epiteliální adhesní molekuly buňky)
FAP	– Familiární adenomatózní polypóza (Familial adenomatous polyposis)
FAS	– TNF receptor superfamily, member 6
FASL	– Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
FISH	– Fluorescenční in situ hybridizace
GTP	– Guanosin trifosfát
HNPCC	– Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer)
KRAS	– Kirsten rat sarcoma
LOH	– Ztráta heterozygosity (loss of heterozygosity).
MCR	– Mutační klastr (mutation cluster region)
ME-PCR	– Polymerázová řetězová reakce s obohacením o mutantní formy (mutant-enriched PCR)
MYH	– MutY homolog (E. coli)
PCR	– Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PIKC3CA	– Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PTEN	– Phosphatase and tensin homolog
RT-PCR	– Reversní transkripce – polymerázová řetězová reakce (reverse transcription polymerase chain reaction)

SSCP	– Jednořetězcový konformační polymorfismus (single strand conformation polymorfism)
TGGE	– Gelová elektroforéza v teplotním gradientu (temperature gradient gel electrophoresis)
TOKS	– Testy okultního krvácení do stolice
TP53	– Tumor protein p53

8 Seznam použité literatury

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998) Základy buněčné biologie, 2. vydání, Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, 630 stran, přeloženo z anglického originálu: Essential Cell Biology (1998).

Asano H., Toyooka S., Tokumo M., Ichimura K., Aoe K., Ito S., Tsukuda K., Ouchida M., Aoe M., Katayama H., Hiraki A., Sugi K., Kiura K., Date H., Shimizu N. (2006) Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. Clin Cancer Res. 12: 43-8.

Benešová Lucie (2007): Využití moderních molekulárně-genetických metod v prevenci, časně diagnóze, predikci léčby a prognóze nádorových onemocnění. Disertační práce. Katedra genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Str. 41, 42.

Beránek M., Vlčková J., Hypiusová V., Živný P., Palička V. (2006) Comparison of various methods used for extraction of cell-free genomic DNA from human plasma. Klin. Biochem. Metab. 14: 21-24

Beroud C., Soussi T. (1996) APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids. Res. 24: 121-4.

Boland C.R. (2002) Molecular Basis for Stool-Based DNA Tests for Colorectal Cancer: A primer for Clinicians. Reviews in Gastroenterological disorders 2: 12-19.

Boni L., Cassinotti E., Canziani M., Dionigi G., Rovera F., Dionigi R. (2007) Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer. Surg. Oncol. 19: 29-31.

Brouckaert G., Kalai M., Krysko D.V., Saelens X., Vercammen D., Ndlovu M., Haegeman M., D'Herde K., Vandenabeele P. (2004) Phagocytosis of Necrotic Cells by Macrophages Is Phosphatidylserine Dependent and Does Not Induce Inflammatory Cytokine Production. Molecular Biology of the Cell 15: 1089–1100.

Deligezer U., Yaman F., Erten N., Dalay N. (2003) Frequent copresence of methylated DNA and fragmented nucleosomal DNA in plasma of lymphoma patients. Clin. Chim. Acta. 335: 89–94.

Diehl F., Li M., Dressman D., He Y., Shen D., Szabo S., Diaz L.A., Goodman S.N., David K.A., Juhl H., Kinzler K.W., Vogelstein B. (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. PNAS 102: 16368-16373.

Diehl F., Schmidt K., Durkee K.H., Moore K.J., Goodman S.N., Shuber A.P., Kinzler K.W., Vogelstein B. (2008) Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* 135: 489-98.

Fearon E.R. a Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-67.

Fleischhacker M. a B. Schmidt (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim. Biophys. Acta. (BBA)-Reviews. on Cancer* 1775: 181–232.

Frattini M., Gallino G., Signoroni S. a kol. (2008) Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer. Lett.* 263: 170–181.

Frič P. a Zavoral M. (2010) Sekundární prevence kolorektálního karcinomu se zřetelem k vysoko rizikovým skupinám. Interní klinika 1. Lékařské fakulty UK a Ústřední vojenské nemocnice, subkatedra gastroenterologie IPVZ, Praha.

Fujiwara K., Fujimoto N., Tabata M. a kol. (2005) Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin. Cancer. Res.* 11: 1219–1225.

Gahan B.G. a Swaminathan R. (2008) Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1137: 1-6.

Gal S., Fidler C., Lo Y.M.D., Taylor M., Han C., Moore J., Harris A.L., Wainscoat J.S. (2004) Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *Br J Cancer.* 22: 1211–1215.

GeneCards. Poslední revize 05/2010 [cit. 2010-05-17]. Dostupné z: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=APC&rf=/home/genecards/current/website/carddisp.pl>>

Giacona M.B., Ruben G.C., Iczkowski K.A., Roos T.B., Porter D.M., Sorensen G.D. (1998) Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 17:89–97.

Guller U., Zajac P., Schnider A., Bosch B., Vorburger S., Zuber M., Spagnoli G.C., Oertli D., Maurer R., Metzger U. a kol. (2002) Disseminated single tumor cells as detected by real-time quantitative polymerase chain reaction represent a prognostic factor in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Ann. Surg.* 236: 768–775.

Hisamuddin I.M. a Yang V. W. (2004) Genetics of Colorectal Cancer. *MedGenMed* 13: 3-6.

Hoff G., Sauar J., Vatn M.H., Larsen S., Langmark F., Moen I.E., Foerster A., Thiis-Evensen E. (1996) Polypectomy of adenomas in the prevention of colorectal cancer: 10 years' follow-up of the Telemark Polyp Study I. A prospective, controlled population study. *Scand. J. Gastroenterol.* 31: 1006-10.

Choi J. J., Reich C. F., Pisetsky D. S. (2005) The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology* 115: 55–62.

Jass JR. (2002) Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am.* 82: 891-904.

Javle M., Hsueh Ch.T. (2009) Updates in Gastrointestinal Oncology – insights from the 2008 44th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology. *J Hematol. Oncol.* 2: 9.

Kapras J., Kohoutová M., Otová B. (1996) Kapitoly z lékařské biologie a genetiky I. 1. vydání. Karolinum. Praha

Kirsch C, Weickmann S, Schmidt B, Fleischhacker M.(2008) An improved method for the isolation of free-circulating plasma DNA and cell-free DNA from other body fluids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1137: 135-9.

Koffler D., Agnello V., Winchester R., Kunkel H.G. (1973) The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest.* 52: 198–204.

Koch M., Kienle P., Kastrati D., Antolovic D., Schmidt J., Herfarth C., Doeberitz M. v K., Weitz J. (2006) Prognostic impact of hematogenous tumor cell dissemination in patients with stage II colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 118: 3072–3077.

Kuang Y., Rogers A., Yeap B.Y., Wang L., Makrigiorgos M., Vetrant K., Thiede S., Distel R.J., Jänne P.A. (2009) Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 15: 2630-2636.

Lankiewicz S., Zimmermann S., Hollmann C., Hillemann T., Gretten T.F. (2008) Circulating tumour cells as a predictive factor for response to systemic chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Molekular Onkology* 2: 349-355.

Lea I.A., Jackson A.M., Dunnick J.K. (2009) Genetic pathways to colorectal cancer. *Mutation Research* 670: 96-98.

Leber M. F., Efferth T. (2009) Molecular principles of cancer invasion and metastasis. *International Journal of Oncology* 34: 881-895.

Leek R. D., Landers R. J., Harris A. L., Lewis C. E. (1999.) Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 79: 991-995.

Leon S.A. a kol. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effects of therapy. *Cancer Research* 37: 646-650.

Mandel P. a Me'tais P. (1948) Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *Acad. Sci. Paris* 142: 241-243 (převzato z Gal a kol. 2004).

Marra G., Boland C.R. (1995) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J. Natl. Cancer. Inst.* 87: 1114 – 1125.

Mata M. a Raponi M. (2009) Circulating tumor cells: utility for predicting response to anti-EGFR therapies? *Expert Review of Molecular Diagnostics* 9: 115-119.

Minárik M., Mináriková L., Hrabíková M., Mináriková P., Hrabal P., Zavoral M. (2004) Application of Cycling Gradient Capillary Electrophoresis (CGCE) to Clinical Screening of APC, K-ras and DCC Point Mutations in Patients with Sporadic Colorectal Tumors. *Electrophoresis* 25: 1016-21.

Moeller P., Koretz K., Leithaeuser F. a kol. (1994) Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int. J. Cancer.* 57: 371 – 377.

Molnar B., Sipos F., Galami O., Tulassay Z. (2003) Molecular detection of circulating cancer cells. *Digestive Diseases* 21: 320-325.

Müller A.D. a Sonnenberg A. (1995) Protection by endoscopy against death from colorectal cancer. A case-control study among veterans. *Arch. Intern. Med.* 155: 1741-8.

Müller I., Urban K., Pantel K., Schwarzenbach H. (2006) Comparison of genetic alterations detected in circulating microsatellite DNA in blood plasma samples of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1075: 222–229.

National Institute of Environmental Health Sciences. Poslední revize 2009 [cit. 2010-07-17]. Dostupné z: <<http://tools.niehs.nih.gov/gac/datamining/mutation/>>

Patel H., Le Marer N., Wharton R.Q., Khan Z.A., Araia R., Glover C., Henry M.M., Allen-Mersh T.G. (2002) Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. *Ann. Surg.* 235: 226-231.

Racek J a kol. (1999). *Klinická Biochemie*, 1. vydání, Galén a Karolinum, Praha, 317 stran.

Sanger Institute. Poslední revize 07/2010 [cit. 2010-07-17]. Dostupné z: <<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics>>

Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E.M., Leon S.A. (1983) Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*. 51: 2116–2120.

Smith D., Ballal M., Hodder R., Selvachandran S.N., Cade D. (2006) The adenoma carcinoma sequence: an indoctrinated model for tumorigenesis, but is it always a clinical reality. *Colorectal Disease* 8: 296-301.

Smith G., Carey F.A., Beattie J., Wilkie M.J., Lightfoot T.J., Coxhead J., Garner R.C., Steele R.J., Wolf C.R. (2002) Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 9: 9433-8.

Státní zdravotní ústav. Poslední revize 07/2010 [cit. 2010-05-17]. Dostupné z: <<http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni>>

Stroun M. a Anker P. (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46: 318-322.

Su Y.H., Wang M., Brenner D.E., Ng A., Melkonyan H., Umansky S., Syngal S., Block T.M. (2004a) Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 6:101–107.

Su Y.H., Wang M., Block T.M., Landt O., Botezatu I., Serdyuk O., Lichtenstein A., Melkonyan H., Tomei L.D., Umansky S. (2004b) Transrenal DNA as a diagnostic tool: important technical notes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1022:81-9

Su Y.H., Wang M., Brenner D.E., Norton P.A., Block T.M. (2008) Detection of mutated K-ras DNA in urine, plasma, and serum of patients with colorectal carcinoma or adenomatous polyps. *Ann N Y Acad Sci*. 1137: 197-206.

Suchánek Š., Májek O., Dušek L., Seifert B., Zavoral M. (2009) Screening kolorektálního karcinomu v České republice datový monitoring screeningových kolonoskopií. IV. kongres České gastroenterologické společnosti, Praha.

Tabar L., Vitak B., Chen H.H., Prevost T.C., Duffy S.W. (1999) Update of the Swedish Two-County Trial of breast cancer screening: histologic grade-specific and age-specific results. *Swiss. Surg.* 5: 199-204.

Thomlinson, R. H. a Gray L. H. (1955) The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. Br. J. Cancer 9: 539-549 (převzato z Díel a kol. 2005)

Umetani N., Hiramatsu S., Hoon D.S.B. (2006a) Higher Amount of Free Circulating DNA in Serum than in Plasma Is Not Mainly Caused by Contaminated Extraneous DNA during Separation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1075: 299-307.

Umetani N., Kim J., Hiramatsu S. a kol. (2006b) Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. Clin Chem. 52: 1062-9.

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Poslední revize 12/2009 [cit. 2010-05-17]. Dostupné z: <<http://www.uzis.cz>>

van der Vaart M., Pretorius P.J. (2010) Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? Clin. Biochem. 43:26-36.

Vyzula R. (2009) Kolorektální karcinom – vedoucí pozice v incidenci na světě, významný zdravotní problém České republiky. Farmakoterapie - Kolorektální karcinom: 5-10.

Waldmann V. a Rabes H.M. (1996) What's New in Ras Genes? Physiological Role of Ras Genes in Signal Transduction and Significance of Ras Gene Activation in Tumorigenesis. Path. Res. Pract. 192: 883-891.

Wang J.F. a Dai D.Q. (2007) Metastatic suppressor genes inactivated by aberrant methylation in gastric cancer. World J Gastroenterol. 13: 5692-8

Wong H., Lo Y.M., Zhang J. a kol. (1999) Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. Cancer. Res. 59: 71-3.

Wong T.S., Kwong D.L., Sham J.S., Wei W.I., Kwong Y.L., Yuen A.P. (2004) Quantitative plasma hypermethylated DNA markers of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. Clin. Cancer. Res. 10: 2401-2406.

Zavoral M., Mináriková P., Mináriková L., Hrabíková M., Hrabal P., Minárik M. (2003) Sledování hladin povrchového Fas receptoru v kombinaci s výskytem somatických mutací genů APC a K-ras v sekvenci adenom-karcinom u kolorektálních tumorů. Folia Gastroenterol. Hepatol. 1: 12 - 19.