

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

**DETEKCE SOMATICKÝCH BODOVÝCH MUTACÍ
A ALELICKÝCH DELECÍ VYBRANÝCH ONKOGENŮ A TUMOR-
SUPRESOROVÝCH GENŮ U KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU
A KARCINOMU PANKREATU**

Lucie Kašperová

Genomac International, s.r.o.

Praha, 2006

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Benešová

Garant diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Pikálek, CSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením RNDr. Lucie Benešové. Část výsledků analýz ztráty heterozygosity (LOH) u pacientů s karcinomem pankreatu (celkem 23 vzorků) uvádím se souhlasem laborantky Barbory Belšánové, Dis., která je provedla.

V Praze 28.8.2006

Lucie Kašperová

Zvláštní poděkování patří především mé vedoucí diplomové práce RNDr. Lucii Benešové a řediteli společnosti Genomac RNDr. Marku Minárikovi, Ph.D. za cenné rady a všechnen čas, který mi věnovali. Také bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům a externím spolupracovníkům laboratoře Genomac, kteří mi byli často nápomocni, ať už radou nebo příkladem. Celé své rodině a svým přátelům děkuji za podporu a pochopení, kterého se mi od nich dostalo.

Práce vznikla v laboratořích firmy Genomac v Praze za podpory grantů Ligy proti rakovině „Prognostický význam sledování vybraných molekulárně genetických markerů u pacientů s kolorektálním karcinomem“ a IGA MZ NR/8027–3 „Detekce a sledování genových variací ve vybraných onkogenech a tumor supresorových genech u pacientů s chronickou pankreatitidou a karcinomem pankreatu a jejich využití v časném diagnostickém a terapeutickém procesu“ v letech 2003 až 2006.

Obsah:

1	Úvod.....	12
2	Přehled literatury	14
2.1	Molekulární podstata vzniku nádorů.....	14
2.2	Kolorektální karcinom	16
2.2.1	Sporadický kolorektální karcinom	17
2.3	Karcinom pankreatu	18
2.4	Tumor-supresorové geny v karcinogenezi kolorekta a pankreatu	20
2.4.1	Gen APC	20
2.4.1.1	Struktura a funkce genu APC	20
2.4.1.2	Mutace genu APC v neoplastických tkáních.....	22
2.4.2	Gen TP53	23
2.4.2.1	Struktura a funkce genu TP53	23
2.4.2.2	Mutace genu TP53 v neoplastických tkáních	26
2.4.3	Gen DCC.....	27
2.4.3.1	Struktura a funkce genu DCC.....	27
2.4.3.2	Mutace genu DCC v neoplastických tkáních	28
2.4.4	Gen DPC4/SMAD4.....	29
2.4.4.1	Struktura a funkce genu DPC4	29
2.4.4.2	Mutace genu DPC4 v neoplastických tkáních.....	29
2.4.5	Gen P16.....	29

2.4.5.1	Struktura a funkce genu P16.....	29
2.4.5.2	Mutace genu P16 v neoplastických tkáních	30
2.5	Onkogeny v karcinogenezi kolorekta a pankreatu	31
2.5.1	Gen K-RAS	31
2.5.1.1	Struktura a funkce genu K-RAS.....	31
2.5.1.2	Mutace genu K-RAS v neoplastických tkáních.....	34
2.6	Experimentální metody vyšetřování somatických DNA poruch	34
2.6.1	Laserová mikrodisekce	35
2.6.2	Detekce genových mutací	35
2.6.3	Detekce ztráty heterozygosity (LOH).....	36
3	Materiál a metodika	37
3.1	Materiál	37
3.1.1	Biologický materiál.....	37
3.1.2	Chemikálie, kity a enzymy.....	38
3.1.2.1	Izolace DNA	38
3.1.2.2	Gelová elektroforéza.....	38
3.1.2.3	PCR a sekvenace	38
3.1.2.4	Kapilární elektroforéza	38
3.1.3	Primery.....	38
3.1.4	Počítačové programy.....	40
3.1.5	Přístroje	40

3.2	Metodika	41
3.2.1	Uchovávání vzorků	41
3.2.2	Izolace DNA	41
3.2.2.1	Izolace DNA z krve	41
3.2.2.2	Izolace DNA ze tkáně	42
3.2.2.3	Izolace DNA ze sklíček barvených Giemsou	42
3.2.2.4	Izolace DNA z parafinových řezů na sklíčku	42
3.2.3	Laserová mikrodisekce	43
3.2.4	Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu	43
3.2.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR) a tvorba heteroduplexů	44
3.2.6	Sekvenování Sangerovou metodou	45
3.2.6.1	Enzymatické přečištění PCR produktů	46
3.2.6.2	Sekvenační reakce	46
3.2.6.3	Odsolení sekvenačních produktů	47
3.2.7	Kapilární elektroforéza	47
3.2.7.1	Kapilární elektroforéza sekvenačních produktů	47
3.2.7.2	Kapilární elektroforéza v cyklujícím teplotním gradientu	47
3.2.7.3	Kapilární elektroforéza mikrosatelitů pro detekci LOH	49
4	Výsledky	52
4.1	Izolace genetického materiálu	52
4.2	Kolorektální karcinom	52

4.2.1	Přehled pacientů zahrnutých do studie kolorektálního karcinomu .	52
4.2.2	Výskyt mutací genů APC, K-RAS, TP53	52
4.2.3	Srovnání výskytu mutací genů se stupni displázie polypu	55
4.2.4	Heterogenita mutací v rámci jednoho polypu	57
4.3	Karcinom pankreatu	58
4.3.1	Přehled pacientů zahrnutých do studie karcinomu pankreatu.....	58
4.3.2	Výskyt somatických mutací genů K-RAS a TP53 a LOH 9p a18q	58
4.3.3	Srovnání výskytu somatických mutací genu TP53 podle exonů	59
4.3.4	Potvrzení vysoké citlivosti diagnostiky KP při kombinaci FNAB a molekulárně-genetického testu.....	60
5	Diskuze.....	61
5.1	Izolace genetického materiálu.....	61
5.2	Kolorektální karcinom	62
5.3	Karcinom pankreatu	65
6	Souhrn	69
7	Seznam citované literatury	71

Seznam zkratek:

APC – Adenomatous polyposis coli

CGCE™ – Cycling gradient capillary electrophoresis

DCC – Deleted in colorectal carcinoma

Demi H₂O – demineralizovaná voda

DNA – Deoxyribonucleic acid

DPC4 – Deleted in pancreatic cancer

K₂EDTA – Ethylén diamin tetra acetát draselný

Exo I – Exonuclease I

FAP – Familiární adenomatózní polypóza

FNAB – Fine needle aspiration biopsy

GAP – GTPase-activating protein

GDP – Guanosindifosfát

GEF – Guanine nucleotide exchange factor

GTP – Guanosintrifosfát

HNPCC – Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom

IPVZ – Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví

KP – Karcinom pankreatu

K-RAS – Kirsten rat sarcoma

KR-CA – Kolorektální karcinom

LOH – Loss of heterozygosity

MBCS – MegaBACE™ configuration selector

MBTG – MegaBACE™ cycling temperature gradient generator

MCR – Mutation cluster region

MMR – Mismatch repair

PanIN – Pankreatická intraepiteliální neoplázie

PCR – Polymerase chain reaction

RNA – Ribonucleic acid

SAP – Shrimp alkaline phosphatase

SNP – Single-nucleotide polymorphism

STR – Short tandem repeat

TGF-β – Transforming growth factor beta

UV – Ultra violet

ÚVN – Ústřední vojenská nemocnice

1 Úvod

Nádorová onemocnění trávicího traktu představují v důsledku rostoucí incidence a mortality závažný společenský problém. Mezi nejzávažnější patří karcinom kolorekta (tlustého střeva a konečníku) a karcinom pankreatu (slinivky břišní). Česká republika vykazuje neslavný primát v celosvětových statistikách incidence a mortality u obou těchto onemocnění. Kolorektální karcinom je u nás druhým nejčastějším zhoubným nádorem u obou pohlaví a jeho incidence se v posledních letech pohybuje na úrovni 70/100 000 obyvatel. V případě karcinomu pankreatu, který vykazuje 99% úmrtnost v průběhu 1 roku, je současná incidence u nás na úrovni 18/ 100 000 obyvatel.

Nejnovější výzkum a poznatky nasvědčují tomu, že v obou případech se jedná primárně o genetická onemocnění, neboli onemocnění vznikající na základě prvotních poruch genetické informace. K jejich dalšímu rozvoji pak dochází v důsledku několikanásobného procesu charakterizovaného postupnou akumulací následných změn v DNA u buněk původně zdravých tkání. Detailní výzkum jednotlivých kroků karcinogeneze a především mechanismů vedoucích k maligní transformaci v případech karcinomu kolorekta a pankreatu představuje hlavní směr a naději pro nalezení vhodných nástrojů pro zpomalení či úplnou léčbu těchto závažných onemocnění.

Cíle diplomové práce:

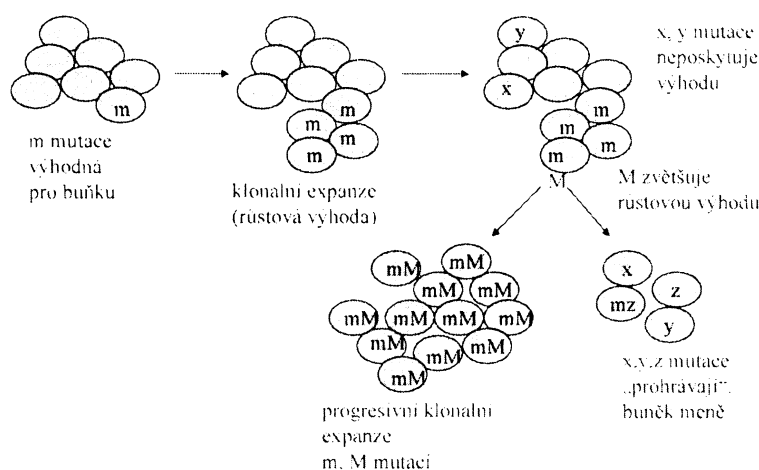
1. Optimalizace podmínek extrakce DNA z čerstvých i archivovaných klinických vzorků vhodných pro následnou mutační analýzu.
2. Vyšetření vybraných typů somatických poruch, zahrnující bodové genové mutace a alelické delece hlavních genů účastnících se karcinogeneze ze vzorků nádorových tkání.
3. Srovnání výskytu mutací u daných nádorů s jejich histopatologickým obrazem (stupněm dysplázie a diferenciací). Ověření všeobecně uváděných modelů progresu kolorektálního karcinomu (tzv. Vogelsteinova modelu) a progresu karcinomu pankreatu (tzv. PanIN modelu) vycházejících z poruch specifických onkogenů a tumor-supresorových genů.
4. Ověření možnosti zvýšení citlivosti diagnostiky karcinomu pankreatu při kombinaci cytologického a molekulárně-genetického testu.

Výsledky práce budou mít význam pro diagnostiku časných (pre-maligních) forem nádorů, pro odhad maligního potenciálu a prognózy vzniklých nádorů. Ve svém důsledku by měla přispět ke zkvalitnění diagnostiky a pozitivnímu ovlivnění délky přežití pacientů.

2 Přehled literatury

2.1 Molekulární podstata vzniku nádorů

Nádorová onemocnění jsou primárně genetického původu. Vyznačují se výskytem mutací DNA (tj. změn v nukleotidové sekvenci či prostorovém uspořádání). V nádorových buňkách se nacházejí různé typy mutací: genomové (postihují počet chromozómů v buňce), chromozómové (mění strukturu jednotlivých chromozómů) a genové (pozměňují jednotlivé geny), (NUSSBAUM *et al.* 2004). Ke vzniku zhoubného nádoru vede nahromadění mutací celé řady genů, udělujících selektivní růstovou výhodu postižené buňce (obr. 2.1).



Obr. 2.1 Mutace a klonální expanze v nádorových buňkách (BOLAND 2002)

Buňka nese náhodnou mutaci (m), která jí poskytuje růstovou výhodu nebo výhodu přežití (např. mutace způsobující trvalou aktivaci receptoru pro některý z růstových faktorů). Z takové buňky tedy vznikne expandující klon buněk nesoucích mutaci m. Případná další mutace (M) může ještě dále zesílit výhodu přežití postižené buňky. Klon, nesoucí mutace m a M, tedy bude proliferovat rychleji než buňky zdravé, případně buňky, které nesou mutace (x, y, z), neposkytující růstovou výhodu (např. mutace genů pro stavební proteiny). Tato mutacemi m, M podmíněná selektivní podpora buněčné proliferace nakonec umožní i jen jedině mutované buňce vyvinout se do nádorové tkáně. Naopak mutace x, y, z zmizí v momentě, kdy zanikne buňka, ve které proběhly. Tyto mutace způsobí ztrátu funkce či odumření jedné buňky, což z hlediska celého organismu nemá význam (BOLAND 2002).

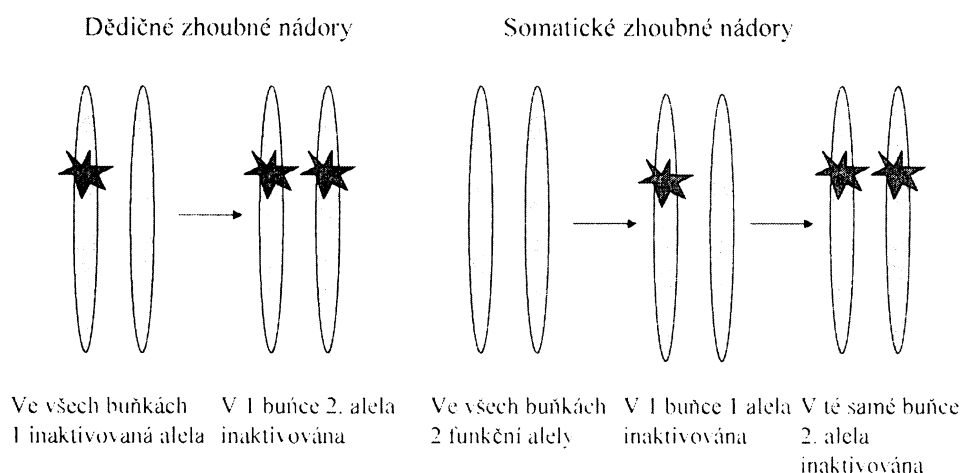
Za zhoubné bujení jsou zodpovědné mutace různých druhů genů, např. genů kódujících proteiny signalizačních drah, regulátory buněčného cyklu, složky cytoskeletu zajišťující kontaktní inhibici, proteiny účastníci se programované buněčné smrti (apoptózy), proteiny odpovědné za detekci a opravu mutací a další.

Geny související s nádorovým bujením obvykle dělíme do dvou skupin: na onkogeny a tumor-supresorové geny. Onkogeny jsou mutované („aktivované“) formy normálních genů (protoonkogenů). Tyto mutace vedou k permanentní aktivaci dané funkce, např. ke stimulaci buněčného dělení a růstu, zvýšenému krevnímu zásobení nádoru nebo inhibici apoptózy. Onkogeny mají dominantní efekt. To znamená, že pro ztrátu kontroly nad dělením vedoucí k maligní transformaci stačí již poškození jedné alely.

Tumor-supresorové geny buď přímo regulují buněčný růst („gatekeepers“), např. jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu nebo kontaktní inhibice růstu buněk nebo jsou odpovědné za opravu poškozené DNA a udržení integrity genomu („caretakers“). Narozdíl od onkogenů, tumor-supresorové geny přispívají ke vzniku nádoru prostřednictvím ztráty funkce příslušného genu. Dědičné i sporadické zhoubné nádory vznikají v důsledku inaktivace obou kopií tumor-supresorového genu v buňce. V případě dědičných zhoubných nádorů je daný jedinec heterozygotní pro zárodečnou mutaci (všechny jeho buňky mají jednu alelu inaktivovanou) a druhá alela je inaktivována během jeho života. U sporadických zhoubných nádorů jsou obě alely inaktivovány dvěma somatickými událostmi, k nimž došlo v téže buňce (obr. 2.2). Inaktivace může být způsobena genovou mutací, ztrátou alely nebo potlačením exprese v důsledku nadměrné metylace DNA. Přílišná metylace vede k uzavřené konfiguraci chromatinu a ztrátě dostupnosti DNA pro transkripční faktory. Změna genové funkce v důsledku metylace je stabilně přenášena během mitózy, chová se tedy jako mutace.

U mnoha typů nádorů včetně kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu je častým inaktivačním mechanismem tumor-supresorového genu tzv. alelická delece. Tato porucha je detekovatelná jako tzv. ztráta heterozygosity (loss of heterozygosity – LOH). Vyšetřování ztrát heterozygosity je jednou z metod monitorování vývoje nádorové proliferace (BUTZ *et al.* 2003). V souvislosti s inaktivací tumor-supresorových genů nese nejčastěji jedna alela příslušného genu mutaci a u druhé je zjištěna ztráta. Není-li LOH patrná, je druhou událostí vedoucí ke ztrátě funkce genu

obvykle druhá somatická mutace nebo transkripční inaktivace nemutované alely prostřednictvím metylace (NUSSBAUM *et al.* 2004).



Obr. 2.2 Ztráta funkce tumor supresoru (CALVERT a FRUCHT 2002)

2.2 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (KR-CA) je civilizační onemocnění. Z dosavadních studií jednoznačně vyplývá vyšší výskyt tohoto onemocnění ve vyspělých státech (American Cancer Society, 2003). V České republice je kolorektální karcinom druhým nejčastějším zhoubným nádorem u obou pohlaví a nejčastějším nádorem trávicího traktu. V roce 2002 bylo v ČR diagnostikováno 4863 případů KR-CA u mužů, což vedlo k tomu, že kolorektální karcinom předstihl ve výskytu bronchogenní karcinom, který do té doby tradičně zaujímal první místo. V témže roce bylo diagnostikováno 3258 případů u žen a KR-CA tím zůstal na druhém místě po karcinomu prsu. Poslední data z roku 2003 ukazují stabilizaci při celkovém počtu 4568 diagnostikovaných mužů a 3306 žen. Celková incidence 77/100 000 tím zůstává stále jednou z nejvyšších na světě (Národní Onkologický Registr, 2003). Jedná se o onemocnění středního a vyššího věku, až 90 % KR-CA je diagnostikováno po padesátém roce života (HEROLD 2000). Hlavní příčinou vysoké úmrtnosti je skutečnost, že téměř polovina nádorů je diagnostikována v pokročilém stadiu.

Obecně rozlišujeme dvě základní formy KR-CA, tzv. familiární formu, která

představuje cca 15–20 % případů a formu sporadickou, představující až 80 %. U familiární formy lze prokázat častý výskyt u postižených rodin postihující i několik po sobě jdoucích generací (CALVERT a FRUCHT 2002). U třetiny těchto případů lze následně přímo prokázat výskyt některé z dědičně přenášených genových mutací, jako jsou například vrozené mutace genu APC u osob postižených tzv. familiární adenomatózní polypózou (FAP) nebo vrozené mutace mutátorových genů (MMR genes, mismatch repair genes) zapříčiňující hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC). Nesprávná funkce těchto genů vede ke snadnému hromadění chyb v nově vznikajících kopiích DNA (MARRA a BOLAND 1995). Z hlediska celkového pohledu na kolorektální karcinom však hlavní roli hrají především sporadické formy.

2.2.1 Sporadický kolorektální karcinom

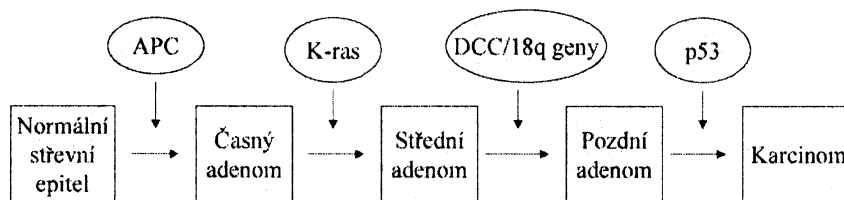
Sporadický KR-CA vzniká na základě nahromadění genetických poruch v původně zdravé tkáni a její následnou přeměnou v maligní tumor. Naprostá většina sporadických karcinomů vzniká z benigních adenomových polypů a jejich maligní transformace je relativně pomalý proces, který probíhá v rozmezí 8–10 let (obr. 2.3). Hypotézu přechodu nezhoubného adenomu (polyp) až po karcinom nejvýrazněji dokladují studie na bázi molekulárně-genetické.



Obr. 2.3 Různá stadia karcinogeneze: a – adenom (polyp), b – invazivní karcinom (Ústřední vojenská nemocnice, Praha)

FEARON a VOGELSTEIN (1990b) prezentovali důkazy o mnohastupňovém modelu formace sporadického karcinomu. Tento model vývoje KR-CA z adenomových polypů popisuje výskyt somatických mutací u několika onkogenů a tumor-supresorových genů. Tento model také předpokládá postupnou akumulaci, kdy k některým z mutací dochází časně a k jiným v pozdější fázi transformace.

Pravděpodobně nejprve dochází ke genovým mutacím nebo delecím genu APC, dále získá mutaci K-RAS, pak následuje delece případně genová mutace genu DCC a nakonec genu TP53. (obr. 2.4) (HEROLD 2000, BOLAND 2002).

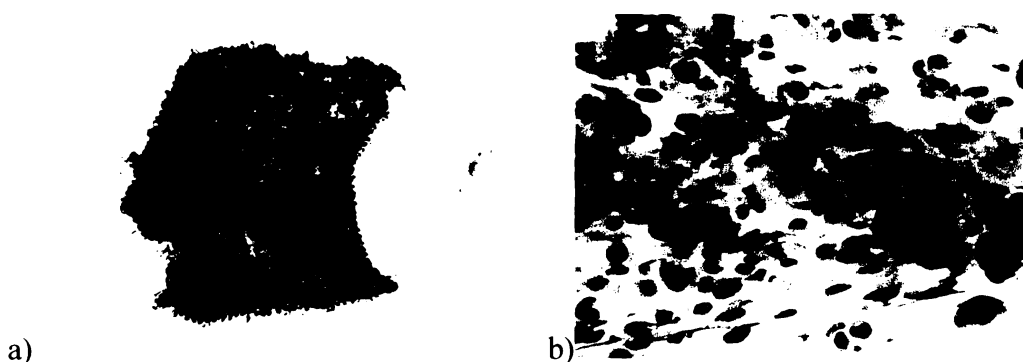


Obr. 2.4 Model vývoje sporadického kolorektálního karcinomu (BOLAND 2002)

2.3 Karcinom pankreatu

Karcinom pankreatu (KP), tj. karcinom slinivky, je po karcinomu tračníku a žaludku třetí nejčastější tumor gastrointestinálního traktu v ČR. Vyskytuje se častěji u mužů než u žen, vrchol výskytu je mezi padesátým a šedesátým rokem věku. Toto onemocnění vykazuje 99% mortalitu, průměrná doba přežití od stanovení diagnózy se udává 3–6 měsíců a pravděpodobnost pětiletého přežití je pouze 0,4–2,0 %. V České republice je dle posledních dostupných údajů incidence již na úrovni 18 případů na 100 000 obyvatel, čímž zaujímáme první místo ve světových statistikách. Pro KP je charakteristická obtížná diagnóza (příznaky jako při chronické pankreatitidě), obtížná terapie a velmi špatná prognóza v důsledku časných metastáz. Jen 10–20 % pacientů je operabilních, u kterých je 5-leté přežití typicky v rozmezí 2–5 % (HEROLD 2000).

Nejčastějším typem je adenokarcinom, v 70 % lokalizovaný v hlavě pankreatu. 90 % KP vzniká z epitelu malých pankreatických vývodů (duktální karcinom). Zatímco buňky normálního duktálního epitelu mají při pozorování v mikroskopu po obarvení roztokem Giemzy podobné tvary, tvoří typickou plástevnatou strukturu a jejich jádra jsou oválná a bez tvarových odchylek (obr. 2.5a), buňky nediferencovaného karcinomu mají různé tvary, ztrácejí kohezivitu, jejich jádra jsou zvětšená a tmavá (obsahují větší množství chromatinu) (obr. 2.5b).



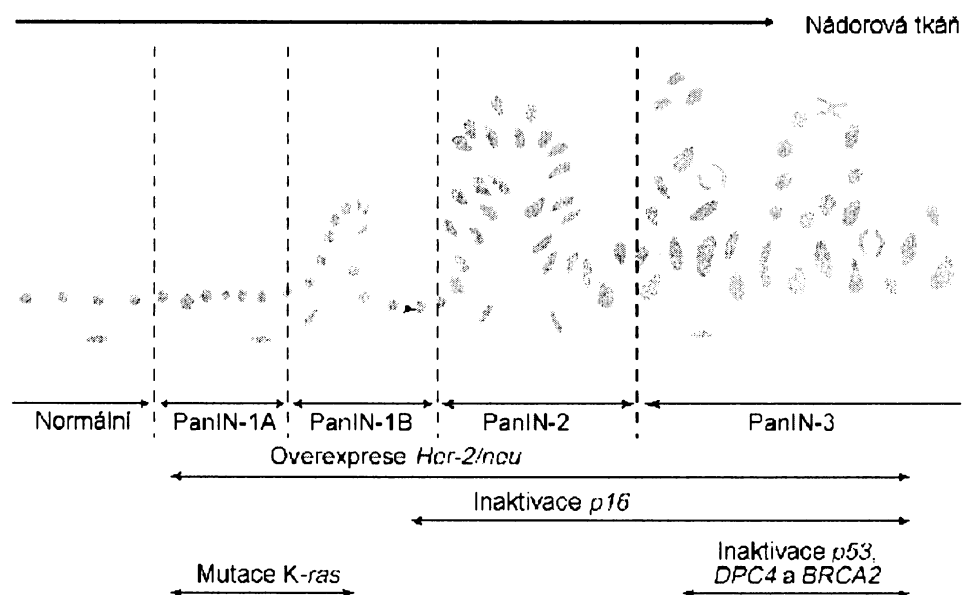
Obr. 2.5 a) normální duktální epitel, b) nediferencovaný karcinom (foto MUDr. Mgr. C. ŠÁLEK, ÚVN)

Prekurzorové léze KP byly označeny termínem pankreatická intraepiteliální neoplázie a zkratkou PanINs (pancreatic intraepithelial neoplasia) (HRUBAN *et al.* 2001a). Podle stupně cytologické a architektonické atypie jsou označovány PanIN-1A, PanIN-1B (léze s lehkou nebo žádnou atypií), PanIN-2 (léze s mírnou atypií) a PanIN-3 (léze s těžkou atypií).

Podobně jako u kolorektálního karcinomu je i naprostá většina karcinomů pankreatu sporadického charakteru důsledkem působení vnějších vlivů. Mezi rizikovými faktory se uvádí kouření, nadužívání alkoholu vedoucí k chronické pankreatitidě, která je považována za nejvýznamnější prekurzor (cytokiny zánětu mohou indukovat genetické změny vedoucí ke KP). Sledování pacientů s chronickou pankreatitidou je proto častým nástrojem včasné identifikace premaligních stavů (OUENEAU *et al.* 2001).

Studie publikované v literatuře se často odvolávají na model vývoje nádoru pankreatu s geneticky i morfologicky definovanými prekurzorovými stádii. Přechod z nenádorového stádia do stádia nádorového není způsoben pouze konkrétní modifikací jediného genu, ale vzniká na základě sekvenční akumulace genetických změn způsobujících ztrátu stability buněčné proliferace v pankreatické tkáni. KP vzniká na základě inaktivace tumor-supresorových genů, jako např. P16, DPC4 a TP53, spojené s aktivací onkogenů, např. K-RAS (HRUBAN *et al.* 2000, 2001b, KERN *et al.* 2001). Přechod od normálního duktálního epitelu k adenokarcinomu popsal HRUBAN *et al.* (2000) pomocí tzv. progresivního modelu, v němž stupně pankreatické intraepiteliální neoplázie odpovídají genetickým změnám určitých genů (obr. 2.6).

V časných fázích vývoje KP (PanIN1A, PanIN1B) dochází k bodovým mutacím genu K-RAS a zvýšené expresi onkogenu HER-2. V následujícím stádiu (PanIN-2) je inaktivován tumor-supresor P16. Inaktivace TP53, DPC4 a BRCA2 nastává v posledním stádiu neoplázie (PanIN-3).



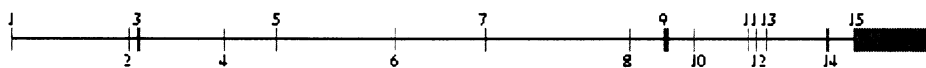
Obr. 2.6 Model vývoje karcinomu pankreatu (HRUBAN et al. 2000)

2.4 Tumor-supresorové geny v karcinogenezi kolorekta a pankreatu

2.4.1 Gen APC

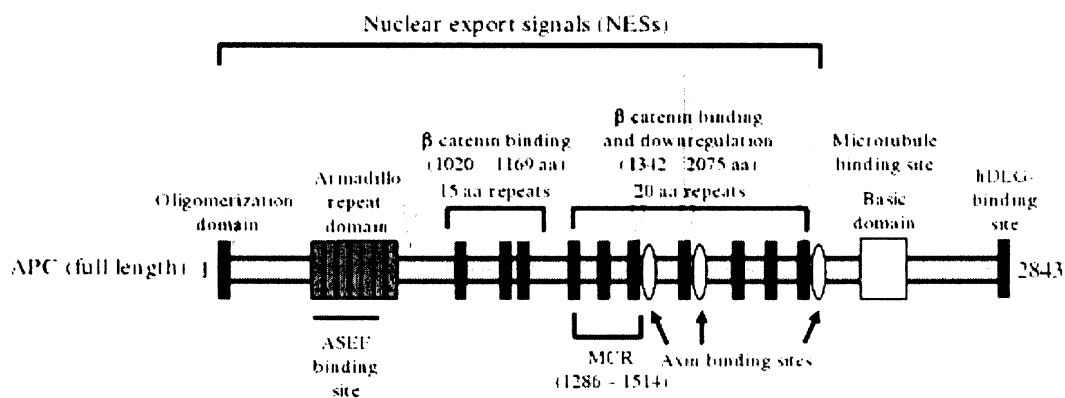
2.4.1.1 Struktura a funkce genu APC

Gen APC (adenomatous polyposis coli) je tumor-supresorový gen nacházející se na dlouhém rameni 5. chromozómu, přesně 5q21–q22. Je velký přibližně 91 kbp, mRNA asi 9 kb. Obsahuje patnáct exonů (obr. 2.7), přičemž prvních čtrnáct exonů je cca 100–300 bp dlouhých, patnáctý exon je ve srovnání s předchozími daleko větší, přibližně 8 kbp (www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html, www.infobiogen.fr).



Obr. 2.7 Struktura genu APC (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/)

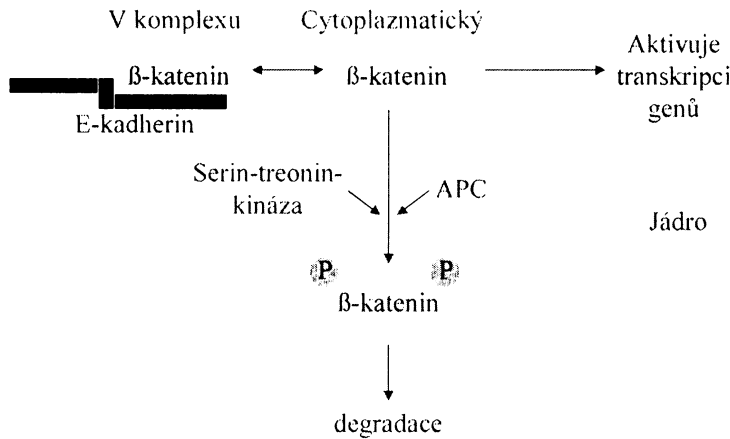
Protein Apc se skládá z 2843 aminokyselin a je velký 310 kDa (obr. 2.8). Na N-konci proteinu Apc se nachází oligomerizační doména. Ústřední místo proteinu zaujímají dvě vazebná místa pro β -katenin (kodóny 1020–1169 a 1342–2075). Druhé z nich má zároveň i regulační funkci vzhledem k β -kateninu a také zahrnuje tři vazebná místa pro axin. Následuje tzv. základní doména s vazebným místem pro mikrotubuly. C-konec proteinu obsahuje vazebné místo pro hDLG, což je tumor-supresorový protein. Protein Apc má pět jaderných exportních signálů rozmístěných po celém proteinu a dva jaderné lokalizační signály v oblasti druhého vazebného místa pro β -katenin (NEUFELD *et al.* 2000, ZHANG *et al.* 2000, HENDERSON a FAGOTTO 2002).



Obr. 2.8 Struktura proteinu Apc (NARAYAN a ROY 2003)

Protein Apc funguje jako shuttle protein mezi cytoplazmou a jádrem a jako β -kateninový chaperon (obr. 2.9) (NEUFELD a WHITE 1997, HENDERSON 2000, ROSIN-ARBESFELD *et al.* 2000). β -katenin funguje jako transkripční faktor genů buněčné proliferace a také slouží jako spojka mezi cytoskeletem a transmembránovými adhezivními molekulami (např. kadheriny). Za normálních okolností, když není potřebná žádná buněčná proliferace, je β -katenin v proteinovém komplexu s E-kadherinem, malé množství β -kateninu se vyskytuje i volně v cytoplazmě. Protein Apc

indukuje fosforylaci a následnou degradaci volného β -kateninu, čímž udržuje jeho nízkou hladinu v buňce a nepřímo tak brání buněčné proliferaci. Ztráta funkce proteinu Apc vede k akumulaci β -kateninu v cytoplazmě a jeho následnému transportu do jádra. V jádře β -katenin aktivuje transkripci genů buněčné proliferace, např. genu C-MYC a cyklinu D1, což má za následek nekontrolovatelnou buněčnou proliferaci (SU *et al.* 1993, KINZLER a VOGELSTEIN 1996, KINZLER a VOGELSTEIN 1998, ALBERTS 2002, FODDE 2002, NARAYAN a ROY 2003, NUSSBAUM *et al.* 2004).



Obr. 2.9 Funkce proteinu Apc (NUSSBAUM R. L. *et al.* 2004)

2.4.1.2 Mutace genu APC v neoplastických tkáních

Uvádí se, že gen APC nese mutaci nebo je deletovaný u přibližně 50 % sporadických adenomů a u 60–80 % sporadických KR-CA (MIYAKI *et al.* 1994, MIYOSHI *et al.* 1992, POWELL *et al.* 1992, BOLAND 2002, CALVERT a FRUCHT 2002, ROBBINS a ITZKOWITZ 2002, NARAYAN a ROY 2003).

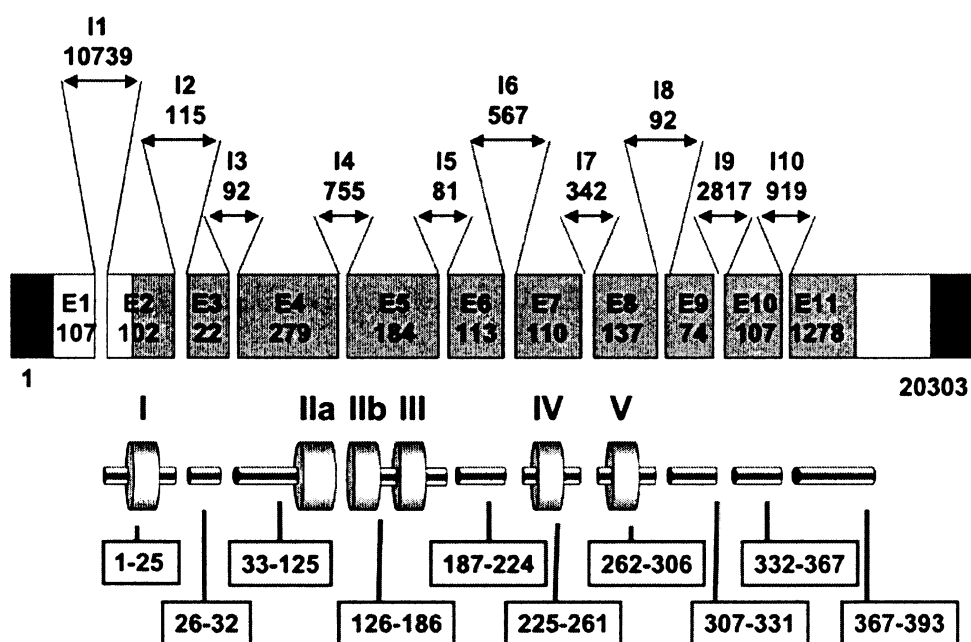
K somatickým mutacím dochází především v tzv. „mutation cluster region“ – MCR (obr. 2.8) (kodóny 1286–1514) v exonu 15, nejčastěji v kodónech 1309 a 1450 (BÉROUD a SOUSSI 1996). Mutacemi vznikají většinou nové stop kodóny, které

ukončují translaci. Stop kodóny vznikají buď přímo na základě bodové mutace v místě této mutace nebo vlivem delece případně inserce vedoucí k posunu čtecího rámce. Výsledkem je zkrácený nefunkční protein, který obsahuje vazebné místo pro β -katenin, ale ztrácí regulační aktivitu vůči β -kateninu (BÉROUD a SOUSSI 1996, BOLAND 2002, NARAYAN a ROY 2003).

2.4.2 Gen TP53

2.4.2.1 Struktura a funkce genu TP53

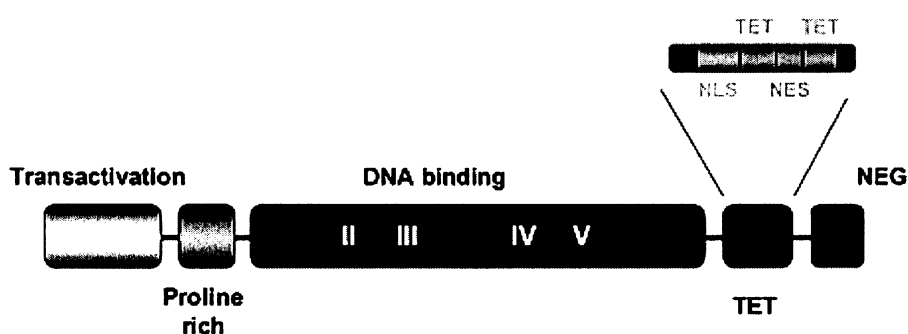
Gen TP53 je tumor-supresorový gen, jehož pozice na chromozómu je 17p13.1. Obsahuje jedenáct exonů (obr. 2.10), z nichž první je nekódující, následovaný velkým intronem (10 kbp), jehož funkce není dosud známá (<http://p53.free.fr>).



Obr. 2.10 Organizace genu TP53 (<http://p53.free.fr>)

Protein p53 se skládá z 393 aminokyselin. Můžeme ho rozdělit do čtyř hlavních funkčních domén (obr. 2.10, 2.11). Na N-konci proteinu p53 (kodóny 1–39, exony 2–4) se nachází doména aktivující transkripci cílových genů. Je zde i vazebné místo pro MDM2 protein. Ústřední místo proteinu zaujímá vazebná doména (kodóny 101–306, exony 4–8) zajišťující sekvenčně specifickou vazbu na cílové sekvence DNA. Třetí

je oligomerizační doména (kodóny 307–355, exony 9–10) nezbytná pro vznik aktivního tetrameru složeného ze dvou homodimerů. V této doméně se nachází také jaderný exportní signál. C-konec proteinu p53 (kodóny 356–393, exony 10–11) obsahuje 3 jaderné lokalizační signály a regulační doménu. Podle množství poškozené DNA, fáze buněčného cyklu či typu tkáně je regulační doména fosforylována nebo acetylována, což ovlivňuje funkční vlastnosti proteinu. Tyto úpravy proteinu p53 určují směr, jakým se bude buňka momentálně ubírat (HARRIS 1996, ULDRIAN *et al.* 2002, <http://p53.free.fr>).



Obr. 2.11 Struktura proteinu p53 (<http://p53.free.fr>, HARRIS 1996)

Protein p53 funguje jako jaderný transkripční faktor. Po jeho syntéze a konečných úpravách je transportován do jádra, kde aktivuje transkripci celé řady genů. Proteiny kódované těmito geny ovlivňují buněčný cyklus, opravu poškozené DNA, případně programovanou buněčnou smrt, tzv. apoptózu.

V normálních nepoškozených buňkách není sice potřeba opravovat DNA, ale je nutné regulovat vznik nových a zánik starých, nepotřebných či dokonce nežádoucích buněk. Je k tomu udržována poměrně nízká hladina proteinu p53 (KO a PRIVES 1996). Protein p53 aktivuje transkripci genu MDM2, jehož produkt inhibuje protein p53 (obr. 2.12). Vzniká tak zpětnovazebná regulační smyčka, která omezuje působení proteinu p53 v buňce na dobu nutnou pro zahájení transkripce cílových genů. Vazba proteinu MDM2 na p53 blokuje transkripční aktivitu p53 (PRIVES 1998). Tento komplex p53-MDM2 je dále transportován z jádra buňky do cytoplazmy. Protein MDM2 je ubikvitin-

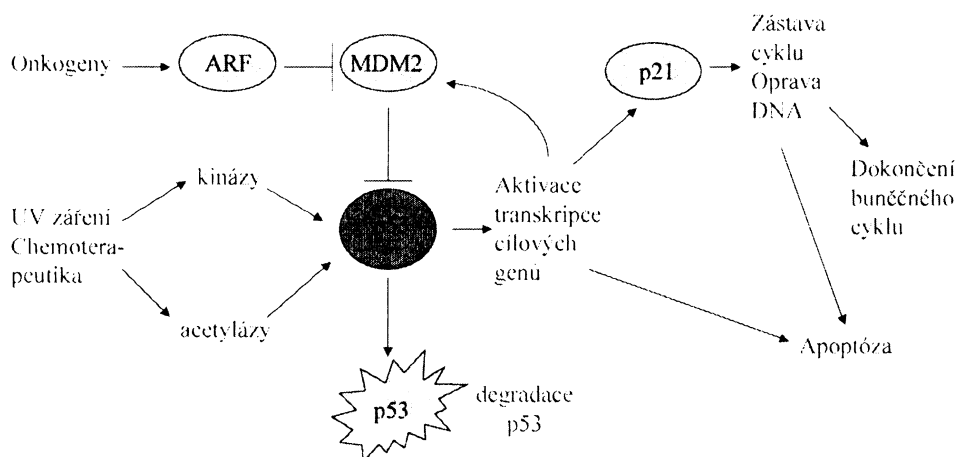
ligáza, to znamená, že k proteinu p53 připojuje malý protein ubikvitin. Tato ubikvitinace je signál pro degradaci proteinu p53 v proteazómu. Hladina proteinu p53 je tedy v normálních buňkách velmi nízká, protože nově syntetizovaný protein je velmi rychle degradován. Kromě MDM2 bylo nalezeno množství proteinů, které se vážou v různých oblastech p53 a regulují tak aktivitu p53.

Pokud jsou buňky vystaveny stresu, jako například UV záření, nedostatku kyslíku nebo některým virům, a je poškozena dědičná informace uložená v DNA, dojde v oblasti vazebného místa pro MDM2 (na N-konci proteinu p53) k fosforylaci a následné změně konformace proteinu. Tím je znemožněna vazba proteinu MDM2 na p53. Následkem toho dojde ke zvýšení hladiny p53 v buňce a odblokování transkripční aktivity (obr. 2.12).

Samotná stabilizace proteinu p53 ještě nezaručuje odpovídající reakci buňky na buněčný stres. K aktivaci proteinu p53 je nutná forma tetrameru a teprve změnou konformace je aktivován k vazbě na cílové sekvence DNA. Tohoto řízení aktivity p53 se účastní jeho C-koncová regulační doména, která bývá posttranslačně fosforylována nebo acetylována (obr. 2.11).

Aktivovaný protein p53 se specificky váže na sekvence p53RE, tj. oblasti v promotorech nebo intronech cílových genů. Tím spustí jejich transkripci. Proteiny kódované těmito geny vyvolají zástavu buněčného cyklu v G1 nebo G2 fázi a opravu poškozené DNA. V případě rozsáhlého poškození, které nelze opravit, indukuje protein p53 apoptózu, a tak zabrání přenosu poškozené genetické informace do dceřiných buněk. Přesný mechanismus vedoucí k výběru mezi těmito dvěma možnostmi zatím není znám. Typ odpovědi je závislý na buněčném typu, povaze a rozsahu poškození DNA a množství proteinu p53 (HARRIS 1996, VOUSDEN 2000, ROBBINS a ITZKOWITZ 2002, ULDRIAN *et al.* 2002, <http://p53.free.fr>).

Kromě uvedených stresových faktorů může být p53 aktivován také onkogeny (např. K-RAS), které aktivují protein p14^{ARF} a ten inhibuje MDM2. Opět je tak zabráněno degradaci proteinu p53 (obr. 2.12) (ULDRIAN *et al.* 2002).



Obr. 2.12 Funkce proteinu p53 v normální a ve stresované buňce (ULDRIJAN et al. 2002)

2.4.2.2 Mutace genu TP53 v neoplastických tkáních

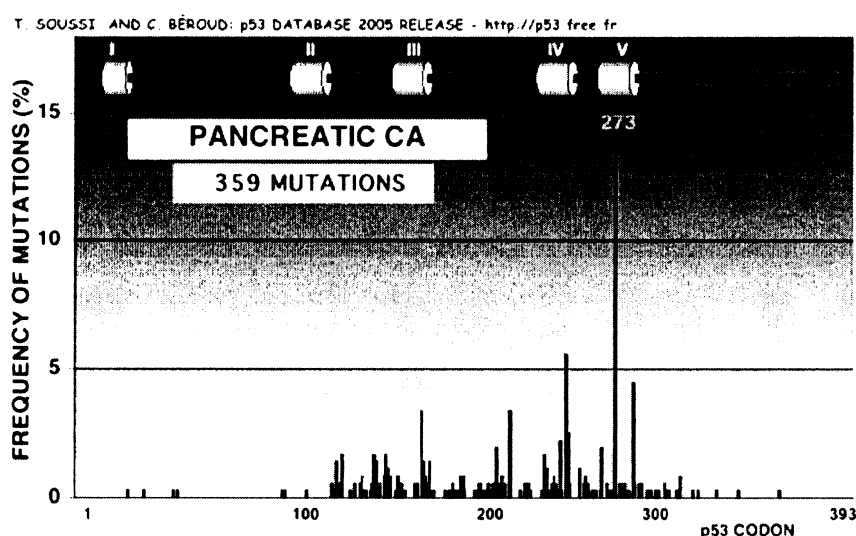
Mutace genu TP53 se objevují u 50 % polypů s vysokým stupněm displázie, nefunkční gen TP53 se vyskytuje u 75 % sporadických KR-CA. Ztráta funkce je typická pro přechod od pozdního adenomu k časnému karcinomu (obr. 2.4). Delece 17. chromozómu je nejčastější ztráta alely u KR-CA. Většina změn genu TP53 jsou bodové mutace nebo inserce a delece několika nukleotidů (BOLAND 1997, KIRSCH a KASTAN 1998, KRESSNER *et al.* 1999, CALVERT a FRUCHT 2002).

U KP je gen TP53 inaktivován v 50–75 %. Téměř ve všech případech je příčinou ztráta jedné alely spojená s intragenovou mutací na druhé alele (BARTON *et al.* 1991, BEROZPE *et al.* 1994, PELEGATA *et al.* 1994, ROZENBLUM *et al.* 1997, NAKAMORI *et al.* 1998, HRUBAN *et al.* 2001b, SEEMANN *et al.* 2004).

Změny genu TP53 vedou k syntéze mutantního proteinu (90 %), nebo protein není vůbec syntetizován (10 %). Neschopnost některých mutantních forem proteinu p53 aktivovat syntézu MDM2 vede k jejich akumulaci v nádorových buňkách ve velkém množství. Toto hromadění proteinu p53 může být také způsobeno mutantním proteinem MDM2, například v případě mutace v sekvenci pro export z jádra (ULDRIJAN *et al.* 2002).

Mutace TP53 v buňkách nejčastěji postihují centrální oblast proteinu v exonech 5–8, které všechny kódují vazebnou doménu (graf 2.1). Tato oblast je terčem přibližně 90 % všech mutací TP53 nalezených u rakoviny člověka. Mutovaný TP53 se nemůže vázat na DNA a ztrácí tak schopnost bránit šíření mutací. Zbývajících 10 % mutací je lokalizováno především v exonech 4, 9 a 10.

V mnoha případech jedna alela genu TP53 nese mutaci a u druhé je zjištěna ztráta (loss of heterozygosity – LOH), což je důvod, proč je gen TP53 řazen mezi klasické tumor-supresorové geny. Na druhé straně řada studií ukazuje, že ztráta funkčnosti jedné alely je postačující k abnormálnímu buněčnému fenotypu. Je tedy docela dobře možné, že inaktivace zbývajících zdravé alely není nezbytná ke vzniku tumoru (<http://p53.free.fr>).



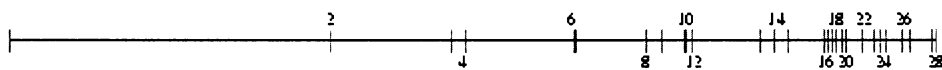
Graf 2.1 Frekvence mutací (%) genu TP53 u karcinomu pankreatu (<http://p53.free.fr>)

2.4.3 Gen DCC

2.4.3.1 Struktura a funkce genu DCC

Gen DCC (deleted in colorectal carcinoma) je tumor-supresorový gen, nacházející se na 18. chromozómu, konkrétně 18q21.1–q21.3. DCC je hodně velký, přibližně 1,2 Mbp, mRNA asi 4,6 kbp. Obsahuje 29 exonů (obr. 2.13), přičemž většina exonů se nachází na konci genu (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/). Na chromozómu 18 se v blízkosti DCC nacházejí další tumor-supresorové geny, např. DPC4 (FEARON

et al. 1990a, VOGELSTEIN *et al.* 1988, ROBBINS a ITZKOWITZ 2002).



Obr. 2.13 Struktura genu DCC (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/)

Protein Dcc se skládá z 1447 aminokyselin a je velký 158,5 kDa. Je to transmembránový protein se čtyřmi extracelulárními doménami podobnými charakteristickým imunoglobulinovým doménám (jde tedy o adhezivní protein imunoglobulinové skupiny), šesti extracelulárními doménami vázícími složku mezibuněčné hmoty fibronektin, jednoduchou překlenovací oblastí v cytoplazmatické membráně a cytoplazmatickou částí (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/).

Protein Dcc slouží jako adhezivní molekula zajišťující kontakt mezi sousedními buňkami a vazbu na složku mezibuněčné hmoty – fibronektin. Svou roli hraje také v indukci apoptózy.

Pokud není na Dcc receptor navázán jeho ligand NTN1 (netrin-1), indukuje Dcc apoptózu přes dráhu zahrnující kaspázu 9 mechanismem nezávislým na mitochondriální apoptotické dráze. Dcc interaguje s kaspázami 3 a 9. Protein Dcc je aktivován rozštěpením kaspázami. V případě navázání ligandu NTN1 je apoptóza inhibována a zároveň je aktivována MAP-kinázová dráha (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/, ROBBINS a ITZKOWITZ 2002).

2.4.3.2 Mutace genu DCC v neoplastických tkáních

U genu DCC dochází především k delecím (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/). Je inaktivován u 13 % malých polypů a v 70 % KR-CA, jeho ztráta se projevuje v přechodu od středního k pozdnímu adenomu (obr. 2.4), (FEARON *et al.* 1990a, ROBBINS a ITZKOWITZ 2002).

Gen DCC kóduje receptor buněčné adheze, mutovaný tedy zřejmě hraje roli v invazivitě nádorových buněk a ve vzniku metastáz (SUN *et al.* 1999, CALVERT a FRUCHT 2002, ROBBINS a ITZKOWITZ 2002).

2.4.4 Gen DPC4/SMAD4

2.4.4.1 *Struktura a funkce genu DPC4*

Gen DPC4 (deleted in pancreatic cancer) je tumor-supresorový gen, nacházející se na 18. chromozómu v blízkosti genu DCC, jeho pozice je 18q21.1 (CALVERT a FRUCHT 2002). Je velký přibližně 50 kbp, mRNA asi 3,2 kbp. Obsahuje 13 exonů (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/).

Protein Dpc4 se skládá z 552 aminokyselin a je velký 60,4 kDa. Nachází se v cytoplazmě i v jádře. U Dpc4 lze rozlišit několik funkčních domén a motivů – DNA vazebnou doménu, jaderný lokalizační faktor, heterodimerizační oblast a transaktivační doménu. Protein Dpc4 se vyskytuje jako trimer nebo v komplexu s různými proteiny, např. serin-treonin kinázou 11 (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/).

Protein Dpc4 je sekvenčně specifický transkripční faktor. Jde o důležitý přenašeč signálu dráhy iniciované transformujícím růstovým faktorem TGF- β (transforming growth factor β). Jedna z hlavních funkcí TGF- β je inhibice mitózy (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/, HOŘEJŠÍ a BARTUŇKOVÁ 2002).

2.4.4.2 *Mutace genu DPC4 v neoplastických tkáních*

Gen DPC4 je inaktivován v přibližně 55 % karcinomů pankreatu. Ve 35 % se tak děje prostřednictvím homozygotní delece, ve zbývajících 20 % je jedna alela ztracena a u druhé došlo ke genové mutaci (HAHN S. A. *et al.* 1996). Inhibice buněčného růstu zajišťovaná faktorem TGF- β je při inaktivaci DPC4 snížena, čímž dochází k nádorovému bujení (HRUBAN *et al.* 2000). Inaktivace genu DPC4 se projevuje ve stádiu PanIN-3 (SCHUTTE *et al.* 1996, HRUBAN *et al.* 2001b). Někteří autoři uvažují o souvislosti genu DPC4 s KR-CA (CALVERT a FRUCHT 2002).

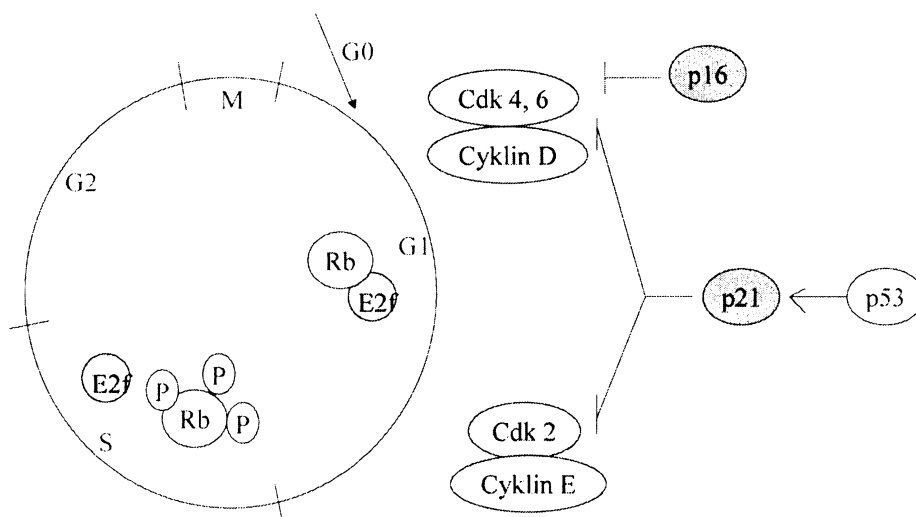
2.4.5 Gen P16

2.4.5.1 *Struktura a funkce genu P16*

Gen P16 je tumor-supresorový gen, jehož pozice je 9p21.3. Gen je velký 27 kbp. Existují čtyři typy různě dlouhých mRNA, podle nichž pak vzniknou proteiny s různým počtem aminokyselin: P16INK4a-varianta 1 (1218 bp, 16,5 kDa, 156 aa), P16INK4a-

varianta 2 (897 bp, 11 kDa, 105 aa), P16INK4-varianta 3 (1515 bp, 12 kDa, 116 aa) a P14ARF-varianta 4 (1275 bp, 18 kDa, 173 aa). P14ARF má alternativní čtecí rámec. Gen P16 obsahuje čtyři exony, P14ARF tři exony. První exon se vyskytuje ve dvou alternativách. P16INK4 je specificky exprimován v pankreatu (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/).

Protein p16 se vyskytuje jako heterodimer. Nachází se v komplexu s Cdk4 nebo Cdk6 (cyklin-dependentní kinázy), čímž znemožňuje, aby tyto kinázy fosforylovaly Rb protein. Rb protein funguje jako inhibitor genů a proteinů, např. E2f faktoru, které zajišťují přechod buňky z G1 do S fáze buněčného cyklu (obr. 2.14), (RUSSO *et al.* 1998). V nepřítomnosti proteinu p16 je Rb protein fosforylován a dochází tak ke ztrátě jeho inhibiční funkce (SELLERS *et al.* 1995, HRUBAN *et al.* 2001b).



Obr. 2.14 Funkce proteinů p16 a p53

2.4.5.2 Mutace genu P16 v neoplastických tkáních

Tumor-supresorový gen P16 je jeden z nejdůležitějších genů, u kterých dochází ke změnám během vývoje karcinomu pankreatu. Inaktivace genu P16 je typická pro stádium PanIN-2, u adenokarcinomů pankreatu je inaktivován v přibližně 95 % (BARTSCH *et al.* 1995, HU *et al.* 1997). Tyto inaktivace jsou ve 40 % způsobeny homozygotními delecemi, dalších 40 % je zapříčiněno ztrátou jedné alely spojenou

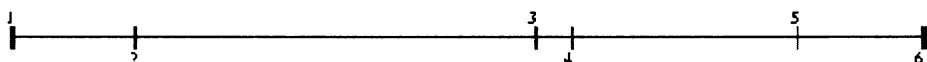
s genovou mutací na druhé alele a 15 % adenokarcinomů pankreatu vzniká v důsledku hypermetylace promotoru genu P16 (CALDAS *et al.* 1994, ROZENBLUM *et al.* 1997, SCHUTTE *et al.* 1997). Inaktivace genu P16 dereguluje důležitý kontrolní bod buněčného cyklu, což vede k nekontrolovatelnému buněčnému dělení a růstu (HRUBAN *et al.* 2001b).

2.5 Onkogeny v karcinogenezi kolorekta a pankreatu

2.5.1 Gen K-RAS

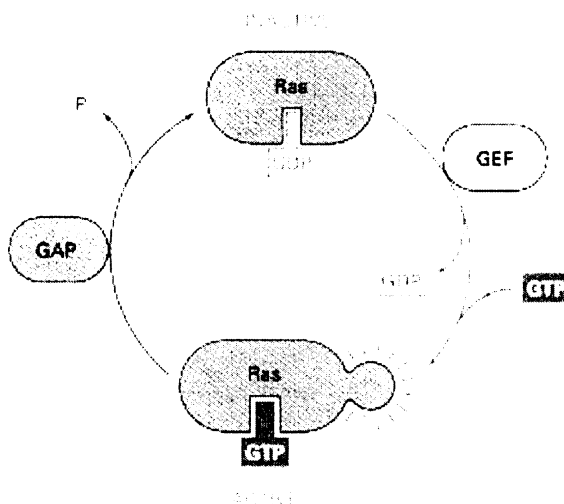
2.5.1.1 Struktura a funkce genu K-RAS

Gen K-RAS (Kirsten rat sarcoma) je protoonkogen, nacházející se na 12. chromozómu, přesněji 12p12.1. Je velký přibližně 42 kbp, mRNA 1486 bp. Obsahuje šest exonů (obr. 2.15) (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/).



Obr. 2.15 Struktura genu K-RAS (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/)

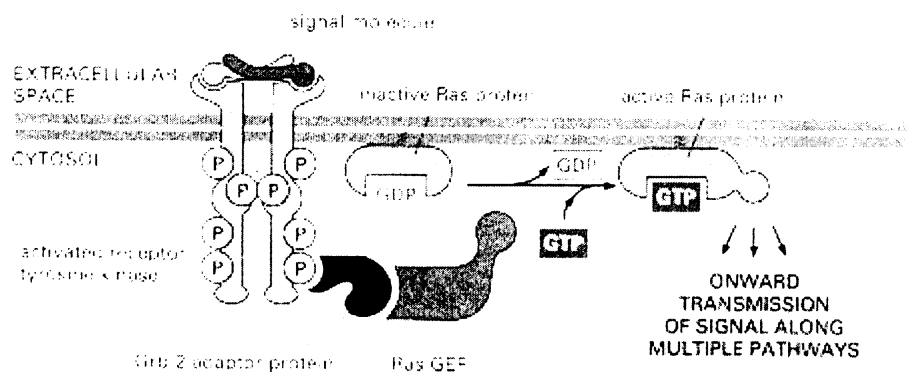
Gen K-RAS kóduje malý G-protein, což znamená, že má vazebné místo pro GTP/GDP. Protein má malou molekulovou hmotnost – 21 kDa a bývá označován p21^{ras}. Skládá se ze 189 aminokyselin. Patří do Ras rodiny monomerních GTPáz. Protein p21^{ras} funguje jako přepínač mezi dvěmi různými konformačními stavy – aktivní v případě, že je navázán GTP a inaktivní, když je navázán GDP (obr. 2.16). Aktivita proteinu p21^{ras} je regulována dvěma druhy proteinů. Proteiny GAP (GTPase-activating proteins) podporují hydrolýzu GTP navázaného na p21^{ras}, což směřuje k inaktivaci proteinu p21^{ras}. V nestimulovaných buňkách udržují proteiny GAP většinu proteinu p21^{ras} (asi 95 %) v inaktivním stavu. Proteiny GEF (guanine nucleotide exchange factors) aktivují p21^{ras} prostřednictvím stimulace disociace navázaného GDP. Koncentrace GTP v cytoplazmě je přibližně 10x vyšší než koncentrace GDP, takže jakmile se GDP z proteinu p21^{ras} uvolní, je navázán GTP a p21^{ras} je aktivován.



Obr. 2.16 Regulace proteinu p21ras (ALBERTS 2002)

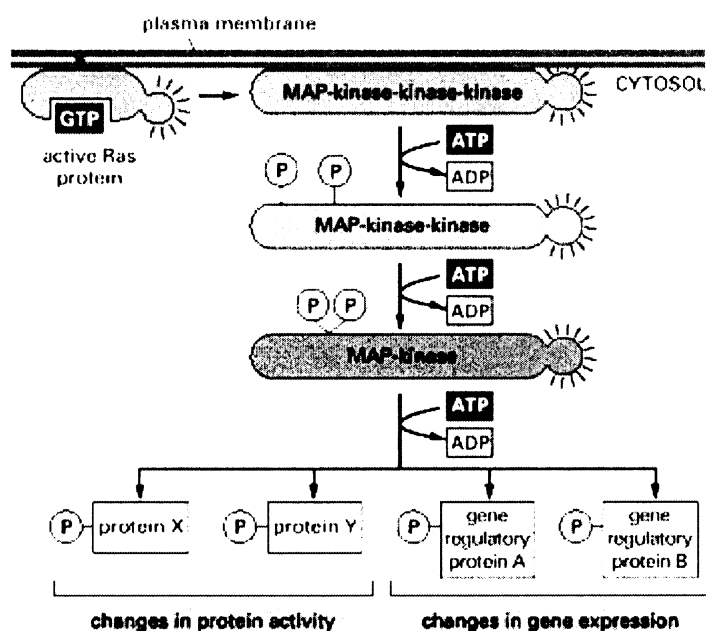
Protein p21^{ras} obsahuje kovalentně vázanou lipidovou skupinu, pomocí níž je zakotven v cytoplazmatické membráně – v tomto případě z cytoplazmatické strany, kde protein funguje (obr. 2.17). Je součástí dráhy sloužící k přenosu signálů z buněčného povrchu do ostatních částí buňky (WALDMANN a RABES 1996, ALBERTS 2002).

Navázání ligandu (růstového faktoru) na receptor (cytoplazmatická doména receptoru má aktivitu protein tyrozin-kinázy, tj. jde o receptorovou kinázu) způsobí jeho dimerizaci a tím vzájemné přiblížení cytoplazmatických kinázových domén (obr. 2.17). Ty se začnou navzájem fosforylovat na několika tyrozinových zbytcích. Autofosforylace receptoru odhalí vazebné místo pro SH2 doménu tak zvaného adaptorového proteinu (např. Grb-2), který zároveň váže skrze svou SH3 doménu protein GEF (zvaný Sos). Komplex receptor-Grb-2-Sos umožňuje proteinu Sos dostat se do pozice, kdy může aktivovat sousední molekulu proteinu p21^{ras} prostřednictvím výměny navázaného GDP za GTP.



Obr. 2.17 Aktivace proteinu p21ras (ALBERTS 2002)

Aktivovaný protein p21^{ras} zahajuje tzv. kinázovou kaskádu (obr. 2.18), která vede přes aktivaci serin/treonin-kinázy Raf, přes další protein-kinázu Mek, ta fosforylačně aktivuje další protein-kinázu MAP-K (též zvanou Erk). Tato aktivovaná kináza stimuluje další kinázy, které regulují některé metabolické děje, nebo aktivuje transkripční faktory genů kódujících např. G1 cykliny, jenž jsou potřebné pro buněčné dělení (WALDMANN a RABES 1996, HOŘEJŠÍ a BARTUŇKOVÁ 2002, ALBERTS 2002).



Obr. 2.18 Kinázová kaskáda zahájená aktivovaným proteinem p21ras (ALBERTS 2002)

2.5.1.2 Mutace genu K-RAS v neoplastických tkáních

Aktivace genu K-RAS prostřednictvím bodových mutací byla zaznamenána u různých druhů tumorů. Například v 75–90 % se vyskytuje u adenokarcinomů pankreatu, přibližně u 10 % polypů menších než 1 cm a ve 40–50 % u sporadického kolorektálního karcinomu (VOGELSTEIN *et al.* 1988, BERROZPE *et al.* 1994, PELLEGATA *et al.* 1994, WALDMANN a RABES 1996, TORTOLA *et al.* 1999, ROBBINS a ITZKOWITZ 2002). Někteří autoři se domnívají, že aktivace onkogenu K-RAS způsobuje přechod od časného adenomu ke střednímu (obr. 2.4), (FORGACS 1988, ROBBINS a ITZKOWITZ 2002).

Bodové mutace v kodónech 12, 13 a 61 genu K-RAS vyúsťují v permanentní aktivaci proteinu p21^{ras}. Ta je způsobena nedostatečnou GTPázovou aktivitou mutantní formy proteinu. Takový stav může znamenat stálý přenos růstových signálů do buňky a následné nekontrolované dělení vedoucí ke vzniku tumoru (BOS J. L. 1989, WALDMANN a RABES 1996). Typ a počet mutací může ovlivnit biologické chování tumoru, jak se ukázalo u kolorektálního karcinomu. Zatímco G-A tranzice u kodónu 12 převládá u stadia Dukes B, G-T nebo G-C transverze byly nalezeny ve stadiu Dukes C spojené s větším výskytem metastáz (MOERKERK *et al.* 1994). Dále se například ukázalo, že u většiny mutací genu K-RAS jde o tranzice především ve druhých bazích kodónů 12 a 13 – u kodónu 13 G-A tranzice, u kodónu 12 G-A tranzice a G-T i G-C transverze (SMITH *et al.* 2002). Podle některých autorů jde u mutací genu K-RAS především o tranzici v kodónu 12 (CHUNXIA *et al.* 2003).

2.6 Experimentální metody vyšetřování somatických DNA poruch

V posledním desetiletí došlo k výraznému rozvoji genetických a molekulárně biologických poznatků o genetických abnormalitách nádorových tkání. Zatímco například v roce 1988 byla jedinou signifikantní genetickou alterací identifikovanou u karcinomu pankreatu mutace v genu K-RAS, představuje posledních 10 let explozi poznatků o dalších genech účastnících se karcinogeneze. Vyšetřování genových poruch nastávajících v postižené tkáni se tak stává nepostradatelným nástrojem pro časnou diagnostiku, sledování průběhu a agresivity nádoru, případně pro odhad jeho chování a možností účinné volby terapie. Zatímco vrozené mutace lze vyšetřit analýzou DNA

z periferní krve, při studiu somatických mutací je třeba vyšetřovat vždy přímo tkáň daného nádoru získanou například z biopsie či resekátu. U časných stádií vznikajících karcinomů bývá DNA mutována pouze u části buněk ze získaného preparátu, a proto je jedním z nejdůležitějších parametrů reprezentativní odběr a citlivost zvolené detekční metody.

2.6.1 Laserová mikrodisekce

Velmi častým problémem vzorkování nádorových tkání je fakt, že nádorové buňky mohou být při následném vyšetření "kontaminovány" přítomností buněk normálních. Taková situace je velmi častá například u bioptických preparátů časných lézí, kde bývá malé množství mutovaných buněk (<5%) zastíněno přítomností nadbytku buněk normálního epitelu, lymfocytů atd. Tento problém je nejvíce znatelný v případě kvantitativních stanovení, jakými jsou například vyšetření alelických ztrát zjišťováním ztrát heterozygosity nebo měření rozdílů hladin genové a proteinové exprese. Pro takové aplikace je získání homogenní buněčné populace zcela zásadní.

Řešením popsaného problému je metoda, která s použitím laserového řezání umožňuje selektivní extrakci velmi malých oblastí vzorků jdoucích až na úroveň jednotlivých buněk. Obecně se takový postup skládá ze dvou kroků. V prvním kroku je vzorek obarven a laserem je příslušné místo odděleno od ostatní tkáně. Ve druhém kroku je oddělené místo ze vzorku vyňato a přeneseno pro další zpracování. Laserová mikrodisekce je často aplikována u archivovaných preparátů, jako jsou sklíčka s buněčnými nátěry nebo histologické parafinové řezy.

2.6.2 Detekce genových mutací

V současné době existuje celá řada metod pro detekci somatických mutací. Největší oblibu má klasické DNA sekvenování, které je považováno za "zlatý standard", avšak v případech, kdy je frakce mutovaných molekul nízká, sekvenování mutací neodhalí (PROSSER 1993). Z tohoto důvodu bývá často využita řada nepřímých metod, kde je přítomnost mutace detekována na základě specifické PCR amplifikace, specifického štěpení DNA nebo pomocí elektroforetické nebo chromatografické separace normální a mutantní DNA. Jednou z účinných metod je separace heteroduplexů v cyklujícím teplotním gradientu. Princip této metody spočívá v různé rychlé elektroforetické migraci normálních a mutantních DNA fragmentů v důsledku

rozdílu v jejich sekundární struktuře. Mutantní fragment je více denaturován a tím i více zadržován při migraci v gelu ve srovnání s méně denaturovaným nemutovaným fragmentem.

2.6.3 Detekce ztráty heterozygosity (LOH)

Inaktivace genů v důsledku jejich delece je jedním z klasických molekulárních mechanismů probíhajících v nádorové tkáni. Tyto ztráty lze sledovat pomocí analýzy přítomnosti mikrosatelitních markerů. Mikrosatelity jsou krátké opakující se úseky DNA (short tandem repeats, STR), např. $[CATG]_n$, kde n je počet opakování. Tyto nekódující sekvence vykazují vysoký stupeň variability opakování n pro každou z alel, a proto při použití současné analýzy více mikrosatelitních markerů lze téměř vždy nalézt heterozygotní stav, při kterém se na alelách vyskytují sekvence s různým počtem opakování produkující PCR amplifikáty s různou délkou. Tento heterozygotní stav je nejprve vysledován při vyšetření leukocytů z periferní krve pacienta, u kterých se absence alely nepředpokládá. Následně je heterozygotní marker u stejného pacienta vyšetřen v nádorové tkáni a získané elektroforetické profily jsou porovnány. Přítomnost alelické delece je indikována snížením intenzity, případně kompletním vymizením některého z charakteristických PCR produktů. Nacházel-li se použitý marker v dostatečné blízkosti k tumor-supresorovému genu, je velmi pravděpodobné, že společně s příslušným mikrosatelitním úsekem byl deletován i úsek nesoucí příslušný gen.

3 Materiál a metodika

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Odběry vzorků tumorů kolorekta a slinivky pomocí endoskopie byly prováděny na pracovišti Subkatedry gastroenterologie IPVZ, na II. interním oddělení Ústřední vojenské nemocnice (ÚVN) v Praze Střešovicích. Operace pacientů s karcinomem pankreatu nebo chronickou pankreatitidou probíhaly na Chirurgickém oddělení ÚVN.

U 26 pacientů s nálezem polypu v tlustém střevě a konečníku byla během kolonoskopie provedena endoskopická polypektomie a současně odebrány biopsie ze vzdálenosti 1 cm od polypu. Dalších 29 pacientů s normálním nálezem během kolonoskopie tvoří kontrolní skupinu, u které byly odebrány kontrolní biopsie zdravých tkání. Od každé osoby byla zároveň odebrána krev do zkumavky s protisrážlivým roztokem (K_2EDTA). U vzorků odebíraných polypů a biopsií bylo provedeno histologické vyšetření. Ihned po odběru byly vzorky uchovávány při teplotě $-20^{\circ}C$.

Do studie karcinomu pankreatu bylo zahrnuto celkem 111 pacientů, z toho u 92 pacientů byla následně potvrzena konečná diagnóza karcinomu a u 19 pacientů byl potvrzen benigní zánět. Během endosonografického vyšetření byly získány vzorky biopsií pomocí tenké jehly. Ze vzorků byla připravena cytologická sklíčka natřením na mikroskopická skla a následným barvením Giemsou. Pokud byla u pacienta provedena operace, byl také odebrán vzorek z resekátu pankreatické tkáně a následně zamražen. Všem pacientům byla odebrána krev do zkumavky s protisrážlivým roztokem (K_2EDTA).

3.1.2 Chemikálie, kity a enzymy

3.1.2.1 *Izolace DNA*

GMC blood DNA isolation kit (Genomac, ČR)

GMC tissue DNA isolation kit (Genomac, ČR)

Ethylalkohol pro UV spektroskopii C₂H₆O (Lach-Ner, s.r.o., ČR)

3.1.2.2 *Gelová elektroforéza*

10x koncentrovaný TBE pufr long run (Fluka, ČR)

10mg/ml PCR ethidium bromid^{TB} (Top-Bio, ČR)

PCR agaróza^{TB} (Top-Bio, ČR)

PCR vkladací pufr^{TB} (Top-Bio, ČR)

1kbp DNA ladderGeneRulerTM, ready-to-use (Fermentas, Kanada)

3.1.2.3 *PCR a sekvenace*

PPP Master Mix + Mg²⁺ (Top-Bio, s.r.o., ČR)

PCR H₂O (Top-Bio, s.r.o., ČR)

Sekvenační premix (Amersham, USA)

Exonuclease I – ExoI (Genomac, ČR)

Shrimp Alkaline Phosphatase – Sap (Genomac, ČR)

Sample desalting 96-well filter plates (Genomac, ČR)

3.1.2.4 *Kapilární elektroforéza*

Denaturing matrix for sequencing and genotyping (Genomac, ČR)

CE buffer (Genomac, ČR)

GMC GeneTrace 500 fluorescent DNA (Genomac, ČR)

3.1.3 Primery

Přehled použitých primerů (VBC-GENOMICS, Rakousko) je uveden v tab. 3.1.

Marker	Délka PCR produktu (bp)	Levý primer	Pravý primer
APC1	142	GTTCAATTATCATCTTTGTGCATCAGC	CGGGCGGGGGCGGGACGGGGCGGGGGCGG CGGGGGCGGTTTATCTTCTGTCTATTGCAAGGT A
APC2	141	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCC CCCGCCCGCCATCCCAAGCAGAAAGTA	TCTCTTTTCAGCAGTAGTGCTT
TP53_exon5	293	CTCTGTCTCCTTCCTCTTCC	CGGGCGGGGGCGGGACGGGGCGGGGGCGG CGGGGGCGCAACCAAGCCCTGTCGTCCTC
TP53_exon6	213	GGCCTCTGATTCCCTCACTGA	CGGGCGGGGGCGGGACGGGGCGGGGGCGG CGGGGGCGCCAGAGACCCCAAGTTGCAAAC
TP53_exon7	204	TTGGGCCCTGTGTTATCTCCT	CGGGCGGGGGCGGGACGGGGCGGGGGCGG CGGGGGCGGTGTGCAGGGTGGCAAGT
TP53_exon8	239	CCTCTTGCTTCTCTTTTC	CGGGCGGGGGCGGGACGGGGCGGGGGCGG CGGGGGCGCCACCGCTTCTTGTCCTG
K-RAS	154	ATGACTGAATATAAACTTGTG	CGCCCGCGCGCCCGCGCCCGTCCCCGCCGCC CCCGCCCGCCTCTATTCTTGGATCATATTC
D9S157	133–149	AGCAAGCAAGCCACATTTC	TGGGATGCCCAGATAACTATATC
D9S171	158–177	AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT	ACCCTAGCACTGATGTATAGTCT
D9S1748	cca 130	CACCTCAGAAAGTCAGTGAGT	GTGCTTGAAATACACCTTTCC
D18S363	177–247	TTGGGAACTGCTCTACATTTC	GCTTCATTCTCTCACTGGAT
D18S474	cca 124	TGGGGTGTTTACCAGCATC	TGGCTTTCAATGTCAGAAAGGG

Tab. 3.1 Primery

3.1.4 Počítačové programy

MegaBACE™ configuration selector – MBCS™ (Genomac, ČR)

MegaBACE™ Cycling Temperature Gradient Generator – MBTG™ (Genomac)

Genetic Profiler™ (GE Biosciences, USA)

Sequence Analyzer™ (GE Biosciences, USA)

Sequencher™ (Gene Codes Corporation, USA)

3.1.5 Přístroje

Zařízení na přípravu demineralizované vody Ultrapur 10 Super (Watrex, ČR)

Biohazardní box s UV světlem (PBI International, Itálie)

Vertikální laminární PCR box s UV světlem (ESCO, USA)

Centrifuga MIKRO 20 (Hettich, Velká Británie)

Centrifuga Universal 32 s rotorem pro 2x PCR destičku (Hettich, Velká Británie)

Minicentrifuga (Eppendorf, Velká Británie)

Inkubátor Delta Chrom™ Temperature Control Unit (Watrex, ČR)

Inkubátor Dry Bath incubator (Bio-Tech, Itálie)

Aparatura pro gelovou elektroforézu Mini Gel Unit (Scie-Plas, Velká Británie)

Transiluminátor UVT-14M, 312 nm (Herolab, Německo)

Zdroj stejnosměrného el. napětí ELITE 300 PLUS (WEALTEC, USA)

Vortex VELP_R (SCIENTIFICA, Velká Británie)

Jednokanálové pipety Research 2,5; 10; 100 a 1000 ul (Eppendorf, Německo)

Osmikanálová pipeta 10 ul (Eppendorf, Německo)

Elektronická osmikanálová pipeta Finnpipette 300 ul (Labsystems, Velká Británie)

Gradientový termocykler PTC-200 (MJ Research, USA)

DNA analyzátor MegaBACE™ 1000 (GE Biosciences, USA)

Mikrodisektor (P.A.L.M. Microlaser, Německo) s inverzním mikroskopem Zeiss AX25 (okulár 10x, objektivy: 10x/0,5 a 40x/0,6)

3.2 Metodika

3.2.1 Uchovávání vzorků

Krevní a tkáňové vzorky jsem dlouhodobě uchovávala v umělohmotných zkumavkách se závitkem při teplotě -20°C . Sklíčka s buněčnými nátěry a parafinovými řezy jsem skladovala v krabičkách při laboratorní teplotě.

3.2.2 Izolace DNA

V první fázi izolace jsem uvolnila genomovou DNA buněk a oddělila od všech přítomných proteinů. Ve druhé fázi jsem pak DNA přečistila přes kolonky a eluovala pufrům nebo vodou.

3.2.2.1 Izolace DNA z krve

Izolační kit: GMC blood DNA isolation kit

Do 1,5 ml zkumavky jsem napipetovala 200 μl T2 roztoku, přidala 100 μl nesražené krve a pečlivě jsem vše promíchala. Pak jsem přidala 25 μl proteinázy K (20 mg/ml), opět jsem směs promíchala a nechala inkubovat 10 minut při 70°C . Poté jsem vše během 1 minuty ochladila v mrazáku. Dále jsem přidala 200 μl ledového 96% ethanolu, rychle a důkladně promíchala. Po promíchání jsem směs opatrně přenesla na kolonku a centrifugovala 1 minutu při 10 000 x g. Po centrifugaci jsem zkumavku pod kolonkou vyprázdnila, na kolonku napipetovala 500 μl TX a centrifugovala 1 minutu při 10 000 x g. Opět jsem vyprázdnila zkumavku pod kolonkou, na kolonku jsem napipetovala 500 μl T3 roztoku a centrifugovala 1 minutu při 10 000 x g. Opět jsem vyprázdnila zkumavku pod kolonkou a centrifugovala 2 minuty při 12 000 x g. Po centrifugaci jsem zkumavku pod kolonkou vyhodila a kolonku vložila do sterilní 1,5 ml zkumavky. Na střed kolonky jsem napipetovala 100 μl eluátu (demi H_2O nebo eluční pufr 10 mM Tris-HCl, pH 9,0 ohřáté na 70°C) a nechala inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě. Následně jsem zkumavky centrifugovala 2 minuty při 10 000 x g. Množství vyizolované DNA jsem analyzovala pomocí horizontální gelové elektroforézy (kapitola 3.2.4 Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu).

3.2.2.2 *Izolace DNA ze tkáně*

Izolační kit: GMC tissue DNA isolation kit

Do 1,5 ml zkumavky jsem napipetovala 200 μ l T1 roztoku. Sterilní žiletkou jsem odřízla vzorek tkáně o velikosti asi 3 mm³ a přidala do zkumavky. K němu jsem připipetovala 25 μ l proteinázy K (20 mg/ml), pečlivě promíchala a nechala inkubovat přes noc při 56°C. Dobu inkubace jsem mohla zkrátit až na 2 hodiny, po inkubaci však musel být roztok homogenní. Přidala jsem 200 μ l T2 roztoku, pečlivě promíchala a nechala inkubovat 10 minut při 70°C. Poté jsem směs během 1 minuty ochladila v mrazáku. Další postup je totožný s postupem izolace DNA z krve, DNA jsem eluovala 200 μ l demi H₂O nebo elučního pufru 10 mM Tris-HCl (pH 9,0).

3.2.2.3 *Izolace DNA ze sklíček barvených Giemsou*

Izolační kit: GMC tissue DNA isolation kit

Do 1,5 ml zkumavky jsem napipetovala 200 μ l T1 roztoku, z toho jsem asi 50 μ l nanesla pipetou na sklíčko, nátěr nechala rozpustit a promíchala špičkou. Směs jsem přepipetovala do eppendorky s T1 roztokem, přidala 25 μ l proteinázy K, zvortexovala a nechala inkubovat 1 hodinu při 56°C. Po inkubaci jsem přidala 200 μ l T2 roztoku, pečlivě promíchala a nechala inkubovat 10 minut při 70°C. Poté jsem směs během 1 minuty ochladila v mrazáku. Další postup je totožný s postupem izolace DNA z krve, DNA jsem eluovala 50 μ l demi H₂O nebo elučního pufru 10 mM Tris-HCl (pH 9,0). Vzhledem k velmi nízkému výtěžku vyizolované DNA z tohoto typu vzorků jsem neprováděla kontrolní gelovou elektroforézu.

3.2.2.4 *Izolace DNA z parafinových řezů na sklíčku*

Izolační kit: GMC tissue DNA isolation kit

Skalpelem jsem seškrábala parafinový řez do 1,5 ml zkumavky s 200 μ l roztoku T1. Další postup je totožný s postupem izolace DNA ze tkáně, DNA jsem eluovala 40 μ l demi H₂O nebo elučního pufru 10 mM Tris-HCl (pH 9,0). Vzhledem k velmi nízkému výtěžku vyizolované DNA z tohoto typu vzorků jsem neprováděla kontrolní gelovou elektroforézu.

3.2.3 Laserová mikrodisekce

Skličko barvené Giemsou jsem při nastaveném zvětšení objektivu 10x důkladně prohlédla pod mikroskopem, který je součástí mikrodisektoru a zaměřila na nádorové buňky. Při zvětšení objektivu 40x jsem označila jednotlivé nádorové buňky. Do víčka 0,2 ml PCR zkumavky jsem napipetovala 40 ul PPP Master Mix + Mg^{2+} a zkumavku opatrně ukotvila víčkem dolů do kovového držáku na mikrodisektoru. Zkumavku jsem umístila víčkem těsně nad skličko a pomocí laserového pulsu do něj postupně vystřílela všechny označené nádorové buňky. Poté jsem zkumavku oddálila od sklička, opatrně vyndala z držáku a zavřela. Zvortexovala jsem ji víčkem směrem dolů a centrifugovala 2 minuty při 12 000 x g. Doplnila jsem demi H_2O do 40 ul a nechala inkubovat 10 minut při 95°C. Do nové 0,2 ml PCR zkumavky jsem odpipetovala 10 ul, a provedla PCR (kapitola 3.2.5 PCR a tvorba heteroduplexů).

3.2.4 Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu

TBE pufr jsem 20x naředila demi H_2O . Do Erlenmayerovy baňky jsem odměřila 25 ml naředěného TBE pufru a přidala 1 odměrku agarózy (250 mg). Suspenzi jsem přivedla k varu na elektrickém vařiči a poté nechala ochladit při laboratorní teplotě na 50–60°C. Do krajních zářezů v elektroforetické vaně jsem vložila boční plastové stěny a do vzniklého prostoru nalila rozpuštěnou agarózu. Do agarózy jsem napipetovala 5 ul ethidium bromidu a pomocí špičky důkladně rozmíchala do celého objemu. Do vnitřních zářezů v elektroforetické vaně jsem vložila hřebeny a nechala agarózu ztuhnout asi 15 minut. Poté jsem do vany nalila naředěný TBE pufr asi 0,3 cm pod horní okraj vany a vyjmula hřebeny a plastové stěny. Vždy k 1 ul vkladacího pufru jsem přidala 3 ul vzorku, promíchala a napipetovala do vzniklých jamek po hřebenu. Do jedné jamky jsem napipetovala 1 ul DNA velikostního standardu. Připojila jsem oba vodiče ke zdroji elektrického napětí a zdroj zapnula. Rychlost pohybu vzorků v elektrickém poli jsem kontrolovala sledováním modrého barviva bromfenolové modři obsaženého ve vkladacím pufru. Po skončení elektroforézy jsem vypnula zdroj elektrického napětí a odpojila vodiče.

Koncentraci PCR produktu jsem stanovovala porovnáním intenzity proužku PCR produktu a proužku jednoho z fragmentů velikostního standardu, který měl velikost přibližně stejnou jako analyzovaný PCR produkt. Vizualizace bylo dosaženo

přítomností interkalačního činidla ethidium bromidu v gelu, který v UV světle svítí oranžově. Podobně jsem určovala i koncentraci vyizolované DNA porovnáním s DNA o známé koncentraci.

Dále jsem používala tuto metodu k určení velikosti PCR produktu porovnáním rychlosti jeho pohybu v elektrickém poli s fragmenty DNA velikostního standardu o známých délkách.

3.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a tvorba heteroduplexů

Do PCR směsi o výsledném objemu 10 ul jsem napipetovala PPP Master Mix + Mg^{2+} , PCR H_2O , příslušný levý primer a pravý primer a 100 ng DNA (1, 2 nebo 3 ul DNA naředěné na koncentraci 100, 50 nebo 33 ng/ul) (tab 3.2). V případě DNA izolované ze sklíček nebo parafinových řezů jsem dávala do reakce 3 ul neředěné DNA a pokud byl výsledný PCR produkt nedetekovatelný pomocí gelové elektroforézy, PCR reakci jsem zopakovala se 3 ul PCR produktu jako templátem. Směs jsem zvortexovala, krátce zcentrifugovala a umístila do termocykleru, kde jsem spustila vybraný PCR program (tab. 3.3).

PCR produkty jsem pak nanesla na elektroforetický gel, abych zkontrolovala, zda PCR produkt skutečně vznikl, zda je správné délky, zda neobsahuje vedlejší produkty a zda v negativních kontrolách bez DNA žádný produkt nevznikl – tj. že nedošlo ke kontaminaci nebo jiné chybě.

Složka	Objem
PPP Master Mix + Mg^{2+}	5 ul
Primer left	1ul (5 uM)
Primer right	1ul (5 uM)
Demi H_2O	0-2 ul
DNA templát	1-3 ul
Celkem	10 ul

Tab. 3.2 Složení PCR směsi

Teplota	Čas	Počet cyklů
95°C	5 min	1x
94°C	30 s	35x
54°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1x
15°C	16 hod	1x

Tab. 3.3 Teplotní program HET54

Program **HET54** jsem používala u PCR pro markery K-ras, APC1, APC2, TP53_exon7, TP53_exon8, D9S157, D9S171, D9S1748.

PCR program **HET60** se liší od programu HET54 pouze annealing teplotou, která je u programu HET60 60°C. Používala jsem ho u PCR pro markery D18S474, D18S363.

PCR program **HET61** se liší od programu HET54 pouze annealing teplotou, která je u programu HET61 61°C. Používala jsem ho u PCR pro markery TP53_exon5, TP53_exon6.

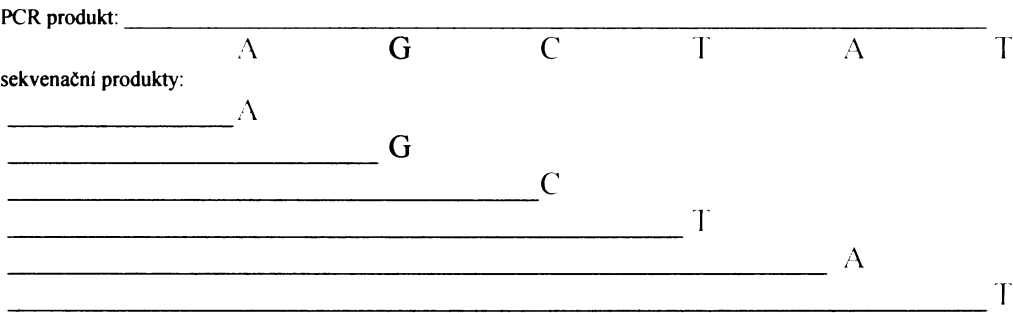
U PCR produktů určených k heteroduplexní analýze v teplotním gradientu následoval program pro tvorbu heteroduplexů (tab. 3.4).

Teplota	Čas	Počet cyklů
95°C	8 min	1x
65°C	60 min	1x
15°C	16 hod	1x
R = 0,1 ⁰ C/s		

Tab. 3.4 Heteroduplexní program HT8min

3.2.6 Sekvenování Sangerovou metodou

Metoda slouží ke zjištění pořadí jednotlivých nukleotidů určitého úseku DNA. Je založena na PCR namnožení vybraného úseku genu s následnou sekvenační reakcí, při níž vzniká směs různě dlouhých fragmentů lišících se navzájem o jeden nukleotid (obr. 3.2). Tyto fragmenty, charakterizující jednotlivé nukleotidy v sekvenci, jsou detekovatelné při elektroforetické separaci, například za pomoci kapilární gelové elektroforézy. Z pořadí, v jakém jsou při průchodu kapilárou detekovány laserem, se dá určit pořadí nukleotidů v sekvenci.



Obr. 3.2 Typy produktů vznikajících při sekvenační reakci

PCR produkt jsem nejprve enzymaticky přečistila, poté provedla sekvenační reakci a produkt odsolila. V konečné fázi jsem použila kapilární gelovou elektroforézu a výsledky vyhodnotila pomocí počítačových programů Sequence Analyzer a Sequencher.

3.2.6.1 Enzymatické přečištění PCR produktů

Připravila jsem směs exonukleázy I (Exo) a alkalické fosfatázy (Sap) smícháním obou enzymů v poměru 1:1. Do 0.2 ul PCR zkumavky s 10 ul PCR produktu o koncentraci 20 ng/ul jsem napipetovala 0.75 ul Exo/Sap směsi. Obsah zkumavky jsem důkladně promíchala pomocí špičky a krátce zcentrifugovala. Zkumavku jsem umístila do termocykleru a spustila program EXOSAP (tab 3.5). Po skončení programu jsem zkumavky se směsí uchovávala při -20°C.

Teplota	Čas	Počet cyklů
37°C	30min	1x
85°C	15min	1x

Tab. 3.5 Program EXOSAP

3.2.6.2 Sekvenační reakce

Do 0.2 ul zkumavky jsem namíchala směs SEQ premixu a příslušného neznačeného primeru, přidala přečištěný PCR produkt (tab. 3.6), zvortexovala a krátce zcentrifugovala. Poté jsem zkumavku umístila do termocykleru, kde jsem spustila program SEQUEMBRI (tab. 3.7).

Složka	Objem
SEQ premix	4 ul
Neznačený primer	1ul (5 uM)
PCR produkt	5 ul
celkem	10 ul

Tab. 3.6 Sekvenační reakce

Teplota	Čas	Počet cyklů
96°C	15 s	1x
96°C	15 s	35x
50°C	15 s	
60°C	4 min	
15°C	16 hod	1x

Tab. 3.7 Program SEQUEMBRI

3.2.6.3 Odsolení sekvenačních produktů

Sekvenační produkty je třeba zbavit iontů a volných nukleotidů, které jsou nežádoucí při dávkování na kapilární elektroforézu. Odsolení sekvenačních produktů jsem prováděla pomocí gelové filtrace na sephadexu.

Z destičky pro odsolování DNA (Sample desalting 96–well filter plate) jsem odstranila izolační lepicí pásku a destičku 10 minut inkubovala při laboratorní teplotě. Pod destičku jsem izolační páskou přilepila odpadní destičku, vyvážila a zcentrifugovala 5 minut při 910 x g. Tím se odstranila přebytečná voda ze sephadexových sloupečků v jednotlivých jamkách. K 10 ul sekvenační směsi jsem přidala 10 ul deionizované vody, zamíchala a celý objem nanasla do jamky na sephadexový sloupeček. Destičku jsem umístila na sterilní 96–jamkovou destičku, připevnila lepicí páskou a vyvážila. Destičky jsem centrifugovala 5 minut při 910 x g. K přečištěnému sekvenačnímu produktu, který protekl do 96–jamkové destičky, jsem pak před dávkováním na kapilární elektroforézu přidala 2 ul demi H₂O.

3.2.7 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza se používá k separaci DNA fragmentů. Metoda je založena na pohybu nabitých molekul gelovou maticí v elektrickém poli. Gel slouží jako molekulové síto, takže větší molekuly jsou pomalejší. Značené fragmenty DNA jsou během pohybu v kapiláře detekovány pomocí laseru a data dále zpracována.

3.2.7.1 Kapilární elektroforéza sekvenačních produktů

Odsolené a naředěné sekvenační produkty jsem rozpipetovala po 10 ul do 96–jamkové destičky. Na DNA analyzátoru jsem nastavila metodu pro sekvenační analýzu. Destičku se vzorky jsem 2 minuty inkubovala při 95°C, následně rychle zchladila, vložila do přístroje a spustila analýzu. Po skončení analýzy jsem data otevřela v programu Sequence Analyzer a "hrubá" data převedla do formátu abi. Tato data jsem následně vyhodnotila v programu Sequencher.

3.2.7.2 Kapilární elektroforéza v cyklujícím teplotním gradientu

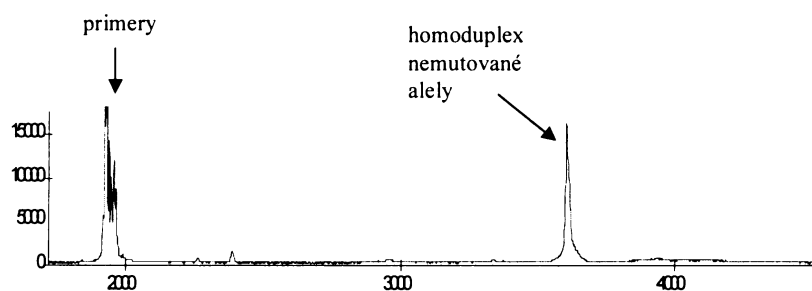
Princip kapilární elektroforézy v cyklujícím teplotním gradientu (CGCE) je analogický klasické elektroforéze v gelu obsahující denaturační gradient. K separaci

fragmentů dochází v důsledku jejich částečné denaturace vyvolané zvyšující se teplotou během jejich migrace v gelu. U fragmentů s nižší denaturační teplotou (heteroduplexy) dochází k většímu zadržování v gelu v důsledku částečného rozplétání jejich jednořetězců. Naopak fragmenty s vyšší denaturační teplotou (homoduplexy) zůstávají v konformaci dvojšroubovice, která gelem hladce prochází. Při použití vícekapilárního systému se ukazuje jako ideální použít teplotní program, během kterého se teplota periodicky zvyšuje a snižuje s frekvencí cca 1–3 x za minutu (MINÁRIK *et al.* 2003).

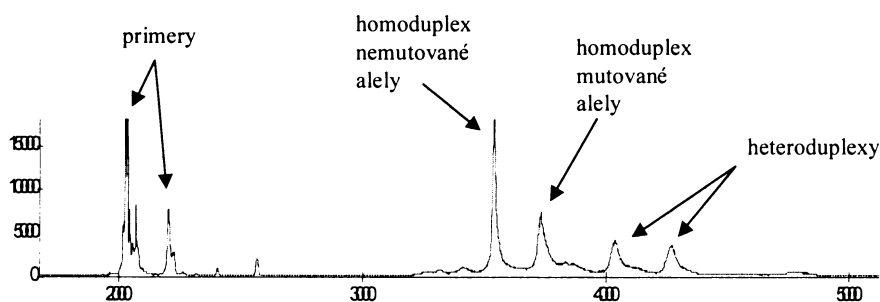
PCR produkty jsem po heteroduplexním programu naředila vodou 100x a rozpipetovala po 10 ul do 96–jamkové destičky. Na DNA analyzátoru jsem nastavila metodu pro analýzu heteroduplexů s cyklováním teploty v kapilárách v intervalu 1 minuty v rozmezí 2°C. Přehled teplot pro jednotlivé markery jsou uvedeny v tabulce 3.8. Destičku s PCR produkty jsem vložila do přístroje a spustila analýzu. Po skončení analýzy jsem data otevřela v programu Genetic Profiler a vyhodnotila. Vzorky, u kterých byl detekován pouze jeden pík (představující homoduplex nemutované DNA) jsem vyhodnotila jako bez mutace (obr. 3.3), vzorek obsahující čtyři píky (představující homoduplex nemutované DNA, homoduplex mutované DNA a dva heteroduplexy nemutované/mutované DNA) jsem vyhodnotila jako vzorek obsahující mutaci (obr. 3.4).

Marker	Teploty (°C)
APC1	50–48–50
APC2	50–48–50
TP53_exon5	52–50–52
TP53_exon6	52–50–52
TP53_exon7	54–52–54
TP53_exon8	54–52–54
K-RAS	50–48–50

Tab. 3.8 Přehled teplot pro jednotlivé markery při CGCE



Obr. 3.3 Vzorek bez mutace



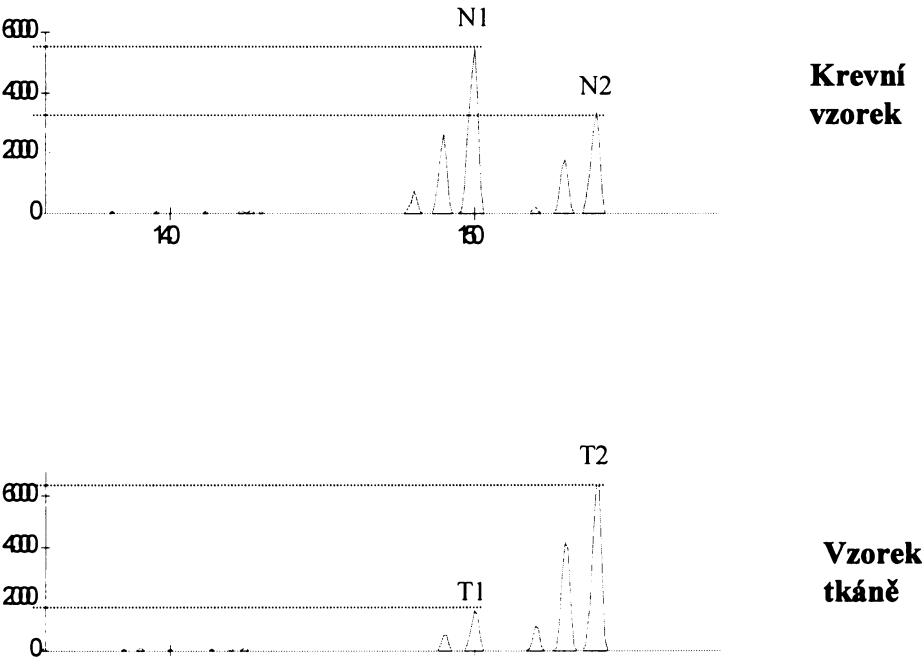
Obr. 3.4 Vzorek obsahující mutaci

3.2.7.3 Kapilární elektroforéza mikrosatelitů pro detekci LOH

Mikrosatelitní úseky jsou části periodicky se opakujících krátkých sekvencí, označované také jako tzv. short tandem repeats (STR). Po PCR amplifikaci je možné tyto úseky elektroforeticky rozdělit podle velikosti. Protože počet opakování se v jednotlivých alelách může lišit (heterozygotní stav), lze po separaci rozlišit mikrosatelitní úseky z jedné a druhé alely a sledovat i jejich relativní intenzity. Při vyšetřování alelických delecí testem na ztrátu heterozygosity jsou porovnávány vzájemné poměry alel pomocí srovnání intenzit separovaných mikrosatelitních fragmentů.

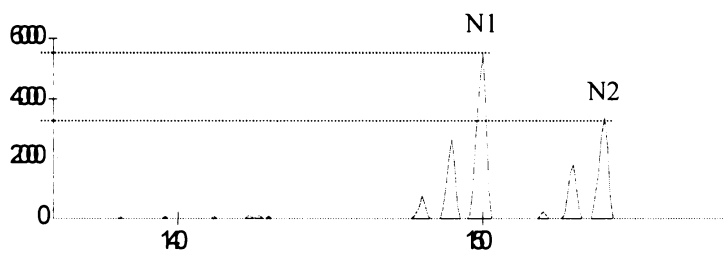
PCR produkty připravené pro detekci LOH jsem naředila vodou 100x

a rozpipetovala po 10 ul do 96–jamkové destičky. Do jamek jsem pak připipetovala 1 ul velikostního standardu GMC GeneTrace 500 fluorescent DNA. Na DNA analyzátoru jsem nastavila metodu pro fragmentační analýzu. Destičku se vzorky jsem 2 minuty inkubovala při 95°C, následně rychle zchladila, vložila do přístroje a spustila analýzu. Po skončení analýzy jsem data otevřela v programu Genetic Profiler a na základě přítomnosti píků velikostního standardu jsem výsledné píky zarovнала. Dále jsem odečetla velikosti píků obou alel a to ve vzorku tkáně (alely jsem označila T1 a T2) a v krevním vzorku téhož pacienta (alely jsem označila N1 a N2). Poté jsem spočetla poměr výšky píků alel pro krevní a zkoumaný vzorek podle vzorce $(T1:T2) / (N1:N2)$, kde T1 a N1 jsou výšky kratších alel, T2 a N2 jsou výšky delších alel (obr. 3.5, 3.6). Jestliže se vypočtený poměr nacházel mimo interval $\langle 0,6;1,67 \rangle$, výsledek jsem stanovila jako LOH (CANZIAN *et al.* 1996, LASSUS *et al.* 2001).

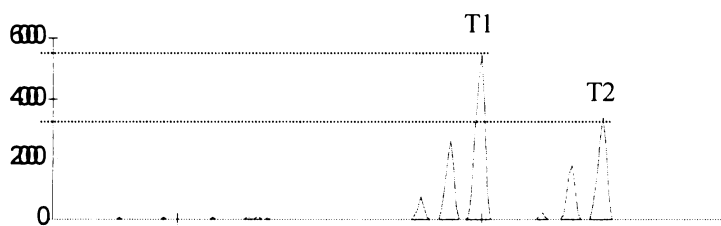


Obr. 3.5 Vzorek s LOH





**Krevní
vzorek**



**Vzorek
tkáně**

Obr. 3.6 Vzorek bez LOH

4 Výsledky

4.1 Izolace genetického materiálu

Přehled jednotlivých typů vzorků, u kterých jsem prováděla extrakci genetického materiálu, je uveden v tabulce 4.1. Celkem se jednalo o 101 krevních vzorků a 149 tkáňových vzorků, zahrnujících biopsie získané během kolonoskopického vyšetření tlustého střeva a resekáty získané během operativního zákroku na slinivce. Kromě toho jsem prováděla izolaci DNA ze 115 archivovaných preparátů ve formě cytologických sklíček. Tyto byly v 76 případech zpracovány metodou laserové mikrodisekce za účelem maximalizace zachytu případných mutací a především LOH.

Typ vzorku	Kolorektál	Slinivka	Celkem
Krev	25	76	101
Biopsie	103	0	103
Resekát	0	46	46
Cytologické sklíčko	0	115	115
Celkem	128	237	365

Tab. 4.1 Přehled jednotlivých typů vzorků, u nichž byla provedena izolace DNA

4.2 Kolorektální karcinom

4.2.1 Přehled pacientů zahrnutých do studie kolorektálního karcinomu

V tomto projektu jsem analyzovala vzorky pacientů podstupujících kolonoskopické vyšetření. Celkem zde bylo zahrnuto 28 pacientů s polypem, v kontrolní skupině bez polypu bylo 30 osob. Vzorky 5 pacientů jsem neanalyzovala z důvodu chybějící dokumentace, neúplnosti sady vzorků nebo znehodnocení vzorku.

4.2.2 Výskyt mutací genů APC, K-RAS, TP53

Přehled výsledků vyšetření somatických změn v polypu a jeho nejbližším okolí u pacientů s polypem a dále u pacientů zahrnutých do kontrolní skupiny je uveden v tabulce 4.2. Oranžově je označena senzitivita testu, modře jeho specifická.

Typ vzorku	Výsledek	APC	% APC	K-RAS	% K-RAS	TP53	% TP53
Polyp	Pozitivní	3	12%	8	31%	1	4%
	Negativní	23	88%	18	69%	25	96%
	Nevyhodnotitelné	2		2		2	
Okolí polypu	Pozitivní	0	0%	0	0%	0	0%
	Negativní	27	100%	27	100%	27	100%
	Nevyhodnotitelné	1		1		1	
Kontrolní skupina	Pozitivní	0	0%	0	0%	0	0%
	Negativní	28	100%	28	100%	28	100%
	Nevyhodnotitelné	2		2		2	

Tab. 4.2 Přehled výsledků vyšetření somatických změn u pacientů s polypem a pacientů v kontrolní skupině

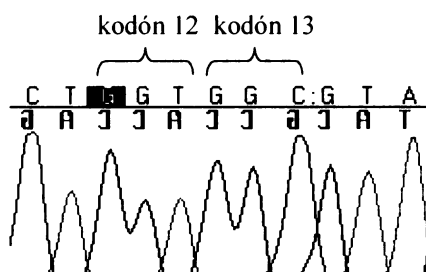
U 3 pacientů jsem našla v polypu somatickou mutaci genu APC, což představuje 12 % ze všech pacientů s polypem. U 2 pacientů s polypem byly výsledky nevyhodnotitelné. V okolí polypu u těchto pacientů i u pacientů v kontrolní skupině jsem žádnou somatickou mutaci nedetekovala. V okolí polypu se nedaly vyhodnotit výsledky u 1 pacienta, v kontrolní skupině u 2 pacientů.

U genu K-RAS byl genetický test pozitivní u 8 pacientů, tj. u 31 % ze všech pacientů s polypem. V okolí polypu u těchto pacientů i u pacientů v kontrolní skupině jsem žádnou somatickou mutaci nedetekovala. Počty nevyhodnotitelných vzorků jsou stejné jako u genu APC.

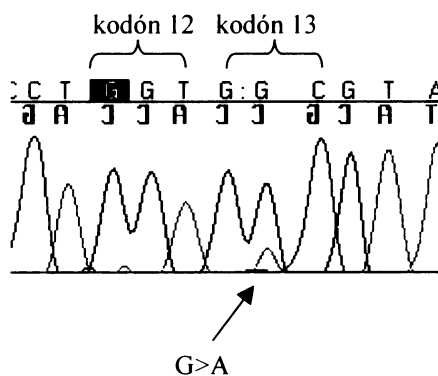
Mutaci genu TP53 jsem prokázala u 1 pacienta v exonu 6, což představuje 4 % ze všech pacientů s polypem. V okolí polypu u těchto pacientů i u pacientů v kontrolní skupině byl výsledek negativní. Počty nevyhodnotitelných vzorků jsou stejné jako u genu APC. U 9 pacientů jsem našla v polypu somatickou mutaci alespoň jednoho z genů APC, K-RAS a TP53, což představuje 35% ze všech pacientů s polypem. V okolí polypu u těchto pacientů i u pacientů v kontrolní skupině jsem žádnou somatickou mutaci nedetekovala. Počty nevyhodnotitelných vzorků jsou stejné jako u samotného genu APC.

V úvodu projektu jsem ověřovala možnost identifikace nalezených mutací DNA sekvenováním. Celkem jsem provedla 15 takových sekvenací zahrnujících: 1 K-RAS

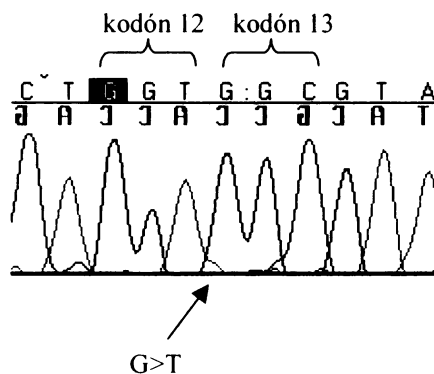
pozitivní kontrolu, 1 K-RAS negativní kontrolu, 6 K-RAS vzorků se zachycenou mutací a dále 1 APC pozitivní kontrolu, 1 APC negativní kontrolu a 1 vzorek z polypu se zachycenou APC mutací. Z důvodu nízké citlivosti sekvenování (obr. 4.1–4.4), (WILKENING *et al.* 2005) jsem další vzorky takto neanalyzovala (viz 5 Diskuze).



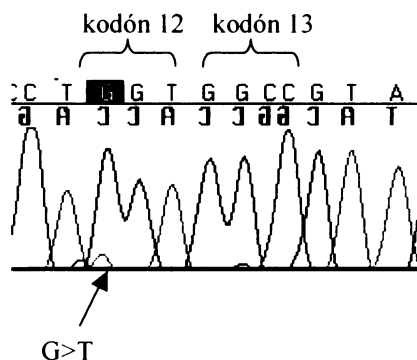
Obr. 4.1 Sekvenční analýza genu K-RAS: kodóny 12, 13 (GGT GGC) jsou bez mutace



Obr. 4.2 Sekvenční analýza genu K-RAS: v kodónu 13 je přítomna mutace (GGC > GAC)



Obr. 4.3 Sekvenční analýza genu K-RAS: v kodónu 13 je přítomna mutace (GGC > TGC)



Obr. 4.4 Sekvenční analýza genu K-RAS: v kodónu 12 je přítomna mutace (GGT > TGT)

4.2.3 Srovnání výskytu mutací genů se stupni displázie polypu

V tabulkách 4.3–4.5 jsou pro jednotlivé stupně displázie polypu uvedeny četnosti a relativní četnosti výskytu somatických mutací genu APC, K-RAS a TP53, tabulka 4.6 dává přehled výskytu somatických mutací alespoň jednoho z výše uvedených genů pro jednotlivé stupně displázie polypu.

Stupeň displázie	Pozitivní	% pozitivní	Negativní	% negativní
Žádná	0	0%	6	100%
Mírná	0	0%	5	100%
Mírná až střední	2	25%	6	75%
Střední	1	33%	2	67%
Střední až těžká	0	0%	3	100%
Těžká až karcinom	0	0%	1	100%
Celkem	3	12%	23	88%

Tab. 4.3 Srovnání výskytu mutací genu APC se stupni displázie polypu

Stupeň displázie	Pozitivní	% pozitivní	Negativní	% negativní
Žádná	1	17%	5	83%
Mírná	1	20%	4	80%
Mírná až střední	3	38%	5	63%
Střední	2	67%	1	33%
Střední až těžká	1	33%	2	67%
Těžká až karcinom	0	0%	1	100%
Celkem	8	31%	18	69%

Tab. 4.4 Srovnání výskytu mutací genu K-RAS se stupni displázie polypu

Stupeň displázie	Pozitivní	% pozitivní	Negativní	% negativní
Žádná	0	0%	6	100%
Mírná	0	0%	5	100%
Mírná až střední	0	0%	8	100%
Střední	0	0%	3	100%
Střední až těžká	1	33%	2	67%
Těžká až karcinom	0	0%	1	100%
Celkem	1	4%	25	96%

Tab. 4.5 Srovnání výskytu mutací genu TP53 se stupni displázie polypu

Stupeň displázie	Pozitivní	% pozitivní	Negativní	% negativní
Žádná	1	17%	5	83%
Mírná	1	20%	4	80%
Mírná až střední	4	50%	4	50%
Střední	2	67%	1	33%
Střední až těžká	1	33%	2	67%
Těžká až karcinom	0	0%	1	100%
Celkem	9	35%	17	65%

Tab. 4.6 Srovnání výskytu mutací alespoň jednoho z genů APC, K-RAS a TP53 se stupni displázie polypu

Pro zjištění souvislosti mezi stupněm displázie polypu a výskytem somatických mutací jsem žádný statistický test nepoužila, protože počty pacientů v jednotlivých skupinách rozdělených podle stupně displázie jsou příliš nízké.

4.2.4 Heterogenita mutací v rámci jednoho polypu

U 11 pacientů s polypem jsem měla k dispozici dvě nebo tři části téhož polypu. U 27 % pacientů byly molekulárně-biologické nálezy v různých částech stejného polypu různé, tj. polypy byly heterogenní (tab. 4.7). Zbýlých 73 % vzorků vykazovalo v různých částech téhož polypu stejné nálezy, tj. polypy byly homogenní.

Polyp	Část polypu	Mutace
Polyp 1	část 1	K-RAS
	část 2	žádná
Polyp 2	část 1	K-RAS, TP53_exon7
	část 2	TP53_exon5
Polyp 3	část 1	APC
	část 2	K-RAS

Tab. 4.7 Přehled nalezených mutací v různých částech heterogenních polypů

4.3 Karcinom pankreatu

4.3.1 Přehled pacientů zahrnutých do studie karcinomu pankreatu

Do studie karcinomu pankreatu bylo zahrnuto celkem 110 pacientů, z toho 92 pacientů s konečnou diagnózou karcinom pankreatu a 18 pacientů s chronickou pankreatitidou (zánět) tvořilo kontrolní skupinu.

4.3.2 Výskyt somatických mutací genů K-RAS a TP53 a LOH 9p a18q

Přehled výsledků vyšetření somatických změn u pacientů s karcinomem pankreatu a zánětem slinivky je uveden v tabulce 4.8. Oranžově je označena senzitivita testu, modře jeho specifická.

	Výsledek	K-RAS	K-RAS (%)	TP53	TP53 (%)	LOH 9p	LOH 9p (%)	LOH 18q	LOH 18q (%)
Karcinom	Pozitivní	59	64%	21	23%	43	83%	40	80%
	Negativní	33	36%	69	77%	9	17%	10	20%
	Nevyhodn.	0		2		40		42	
Zánět	Pozitivní	0	0%	0	0%	4	33%	4	44%
	Negativní	18	100%	18	100%	8	67%	5	56%
	Nevyhodn.	0		0		6		9	

Tab. 4.8 Přehled výsledků vyšetření somatických změn u pacientů s karcinomem pankreatu a zánětem slinivky

Z 92 pacientů s konečnou diagnózou karcinom pankreatu jsem u 59 pacientů (64 %) detekovala somatickou mutaci genu K-RAS. U zbývajících 33 pacientů s karcinomem pankreatu (36 %) byl nález negativní, tj. nebyla nalezena somatická mutace. Všech 18 pacientů se zánětem slinivky (kontrolní skupina) mělo výsledky molekulárně-biologického testu pro gen K-RAS negativní.

21 pacientů s karcinomem pankreatu mělo pozitivní výsledek vyšetření mutace genu TP53 (23 %), u 69 pacientů (77 %) jsem somatickou mutaci tohoto genu nedetekovala. Vzorky dvou pacientů nebyly vyhodnotitelné. V kontrolní skupině pacientů se zánětem slinivky byl výsledek u všech 18 pacientů negativní (100 %).

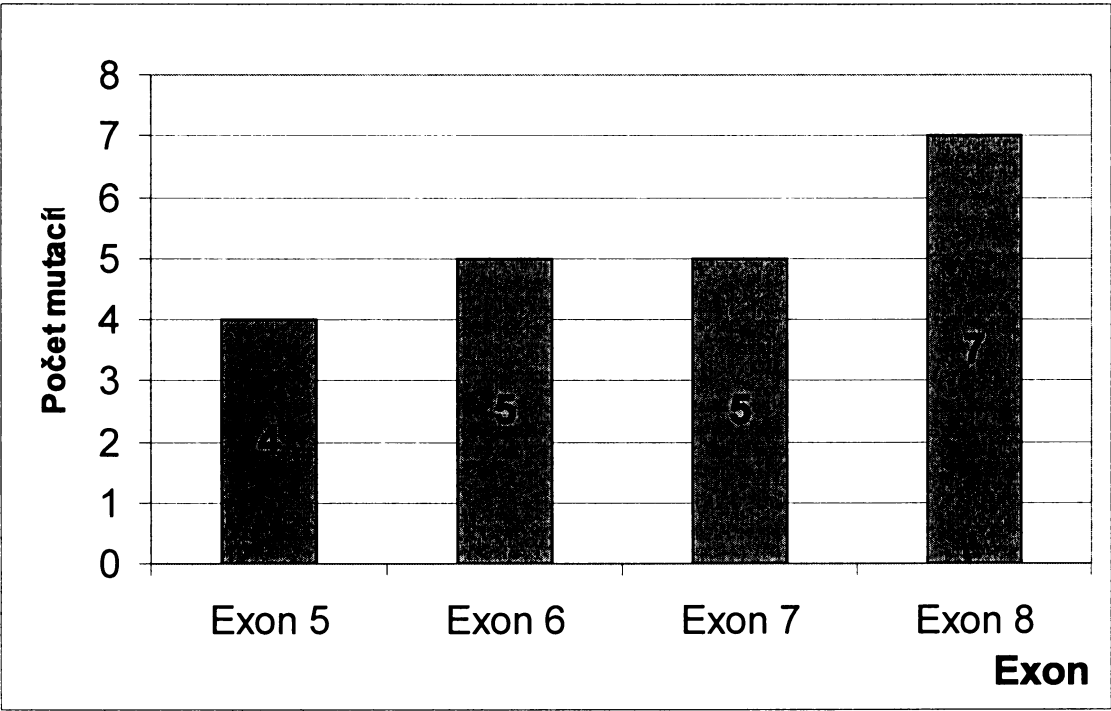
Deleci 9p jsem našla ve 43 případech (83 %) pacientů s karcinomem slinivky,

v 9 případech (17 %) byl nález negativní. Pro 40 pacientů s karcinomem pankreatu jsem výsledky nemohla vyhodnotit. Nejčastějším důvodem byl homozygotní stav u sledovaných STR markerů, v menší míře pak nejednotný výsledek při porovnávání signálů alel u různých markerů téhož chromosomu. U 4 pacientů se zánětem slinivky jsem detekovala ztrátu 9p ve 4 případech (33 %) a u 8 pacientů byl výsledek testu LOH negativní (67 %). U 6 pacientů byly výsledky testu nevyhodnotitelné.

V 18q jsem zjistila LOH u 40 pacientů s karcinomem slinivky (80 %), u 10 pacientů (20 %) ztráta heterozygosity detekována nebyla. Pro 42 pacientů nemohly být výsledky testu LOH vyhodnoceny. V kontrolní skupině měli 4 pacienti (44 %) test pozitivní a 5 negativní (56 %). U 9 pacientů byly výsledky nevyhodnotitelné.

4.3.3 Srovnání výskytu somatických mutací genu TP53 podle exonů

V rámci vyšetření somatických mutací genu TP53 jsem analyzovala rozsah exonů 5–8, výsledky jsou v grafu 4.1. Somatickou mutaci genu TP53 jsem detekovala u 21 pacientů s karcinomem pankreatu, z toho u 4 pacientů v exonu 5 (19 %), u 5 pacientů v exonu 6 (24 %), v 5 případech se mutace nacházela v exonu 7 (24 %) a v 7 případech byla mutace v exonu 8 (33 %).



Graf 4.1 Srovnání výskytu somatických mutací genu TP53 podle exonů

4.3.4 Potvrzení vysoké citlivosti diagnostiky karcinomu pankreatu při kombinaci cytologického vyšetření (FNAB) a molekulárně-genetického testu

U skupiny pacientů (77) s konečnou diagnózou karcinom pankreatu, která byla potvrzena dalším sledováním vývoje onemocnění, byl výsledek cytologického vyšetření v 66 případech pozitivní a u 15 pacientů byly vzorky nevyhodnotitelné. U této podskupiny 15 pacientů bez diagnózy stanovené cytologickým vyšetřením byl karcinom potvrzen genetickým testem, kde jako pozitivní byl označen vzorek, který vykazoval kteroukoli z mutací (K-RAS, LOH 9p, LOH18q nebo TP53). Po tomto vyhodnocení již nebylo možné vyhodnotit pouze 2 pacienty, kteří vykazovali homozygotní stav u sledovaných LOH markerů.

U skupiny 6 pacientů s konečnou diagnózou zánět slinivky, byla tato diagnóza v 5 případech stanovena pomocí cytologického vyšetření a v 1 případě, kde cytologii nešlo vyhodnotit, byla doplněna molekulárně-genetickým testem.

5 Diskuze

5.1 Izolace genetického materiálu

Izolaci genetického materiálu z tkáňových vzorků zahrnujících biopsie tlustého střeva a resekáty slinivky jsem prováděla standardní metodou s přečištěním přes kolonky (kapitola 3.2.2 Izolace DNA). Výsledná celková dosažená úspěšnost odpovídá srovnatelným pracím publikovaným v literatuře. Ve srovnání s klasickým fenol-chloroformovým srážením je metoda přečištění přes kolonky dražší, avšak současně je velmi robustní a méně pracná, a proto u rozsáhlejších projektů zahrnujících stovky vzorků poskytuje nesporné výhody.

Dále jsem prováděla izolaci DNA z archivovaných preparátů ve formě cytologických sklíček. V buněčných nátěrech se často vyskytovalo jen malé množství buněk, navíc jsem se snažila o zachycení co největšího podílu nádorových buněk stíráním oblastí označených patologem, takže výtěžky byly v některých případech nízké. Přesto se tato metoda ukázala jako vhodná při kombinaci tohoto způsobu získání vzorků a následné analýzy DNA mutací.

Na rozdíl od detekce mutací, které je kvalitativním stanovením, je sledování alelických ztrát testem kvantitativním, kde jsou množství alel ve vzorku postižené tkáně porovnávána s množstvím odpovídajících alel z periferních leukocytů, kde se očekávají obě alely ve stejném množství. Obecným pravidlem pro pozitivní nález LOH je úroveň signálů alel v poměru minimálně 3:5, kde menší intenzita odpovídá ztracené alele (CANZIAN *et al.* 1996, LASSUS *et al.* 2001). Výsledek tak může být ovlivněn přítomností zdravých nenádorových buněk, které zakryjí snížení signálu deletované alely v buňkách nádorových. Pro dosažení přesných odečtů byl proto v průběhu řešení projektu použit laserový mikrodisektor. Ukázalo se, že pomocí mikrodisektoru je možné vybrat skutečně jen nádorové buňky a po následné genetické analýze obdržet prokazatelné výsledky přítomnosti či nepřítomnosti LOH. Tato jednoznačnost výsledků byla ovšem dosažena na úkor sníženého množství biologického materiálu, ze kterého bylo možné izolovat DNA.

Pro účely detekce LOH jsem také izolovala DNA z periferní krve. Zajímavé zjištění bylo, že při běžné eluci izolované DNA do stabilizačního pufru dochází k nereprodukovatelné variabilitě poměru alel, a proto je tento postup pro LOH vyšetření

nevhodný. Po sérii experimentů jsem zjistila, že optimální způsob eluce DNA je do H₂O, kde v několika paralelně zpracovávaných vzorcích zůstal poměr alel reprodukovatelně nezměněn. Při eluci izolované DNA do vody je však třeba mít na paměti možnost její degradace, a proto veškeré následné kroky (PCR atd.) provádět v přímé návaznosti na izolaci.

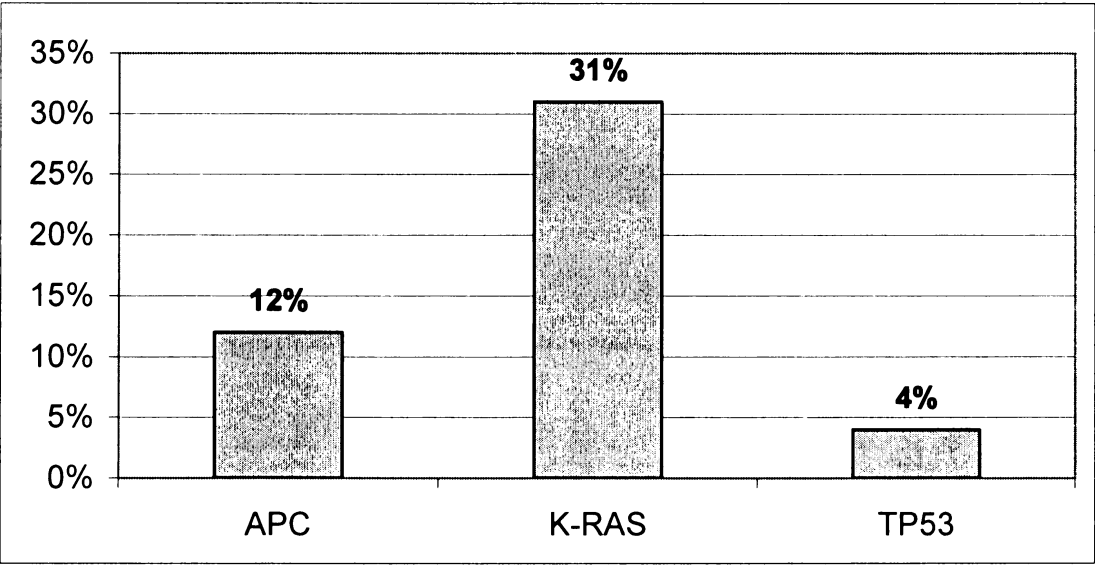
5.2 Kolorektální karcinom

U pacientů podstupujících kolonoskopické vyšetření jsem prováděla detekci somatických mutací genů APC, K-RAS a TP53. Podle očekávání jsem v biopsiích z kontrolní skupiny zdravých osob ani ve tkáni z nejbližšího okolí polypů u pacientů žádnou somatickou mutaci nenalezla.

Ve vlastních vzorcích polypů jsem detekovala somatické mutace všech tří sledovaných genů. Úvodní pokusy identifikovat nalezené mutace sekvenováním nepřinesly očekávané výsledky, neboť ve většině případů se mi nepodařilo sekvenováním danou mutaci vůbec zachytit. Jak bylo v literatuře několikrát popsáno (MINÁRIK *et al.* 2004, WILKENING *et al.* 2005), sekvenováním je možno zachytit mutaci pouze v případě, že celkové množství mutovaných kopií je minimálně 30 %. Z tohoto důvodu jsem dále identifikaci mutací neprováděla. Z hlediska klinického dopadu byl dostačující výsledek ve smyslu prosté pozitivity či negativity hledané mutace.

Vzhledem k nejvyššímu procentuálnímu zastoupení somatických mutací genu K-RAS by se mohlo na první pohled zdát, že v časných stádiích kolorektálního karcinomu bývá v první fázi mutován právě tento gen (graf 5.1). Ovšem je třeba si uvědomit, že zatímco u genu K-RAS jsou mutace lokalizovány v jediném místě (hotspots zahrnující kodóny 12 a 13) (BOS J. L. 1989, WALDMANN a RABES 1996), u genu APC je rozsah mutované oblasti (mutation cluster region) znatelně širší, a proto je možné, že některé mutace APC zůstaly neodhaleny. Pro nalezení somatických mutací genu APC jsem vyšetřovala dva úseky exonu 15, kde dochází ke genetickým změnám nejčastěji (BÉROUD a SOUSSI 1996). Pokud si uvědomíme, že délka genu, kde by mohlo dojít k somatické mutaci, několikanásobně převyšuje délku analyzovaného úseku, pak můžeme předpokládat i výrazně větší skutečný podíl somatických mutací tohoto genu. Získaný výsledek tedy zcela nevylučuje možnost, že dochází nejprve

ke genetickým změnám genu APC a poté k somatickým mutacím genu K-RAS, jak se předpokládá i v tzv. Vogelsteinově modelu (HEROLD 2000, BOLAND 2002). U genu TP53 mutace u kolorektálních karcinomů v 90 % postihují exony 5–8 (<http://p53.free.fr>), které jsem vyšetřovala. Nízké procento nalezených somatických mutací genu TP53 mohou spojovat s pozdějším nástupem vzniku mutací tohoto genu ve vývoji kolorektálního karcinomu, což opět odpovídá výše uvedenému modelu, neboť vyšetřovány byly adenomy, tedy prekursor, nikoli rozvinutá stadia karcinomů.

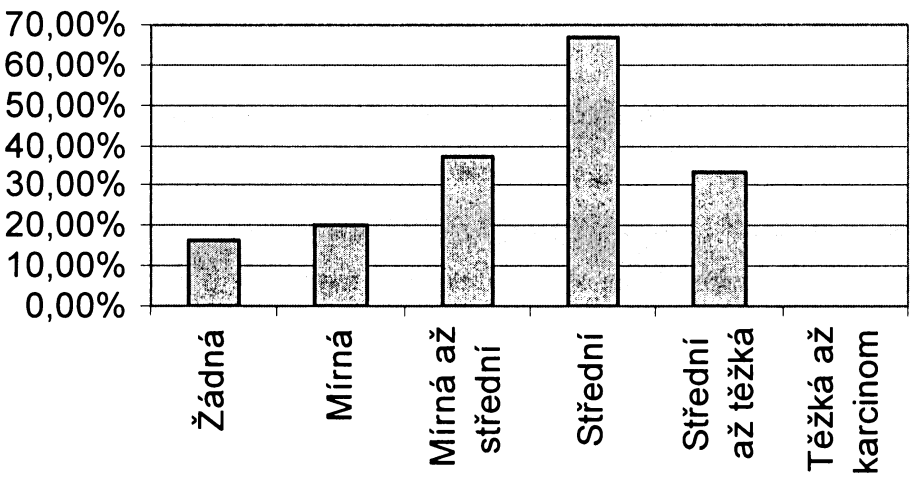


Graf 5.1 Procentuální podíl somatických mutací v polypech

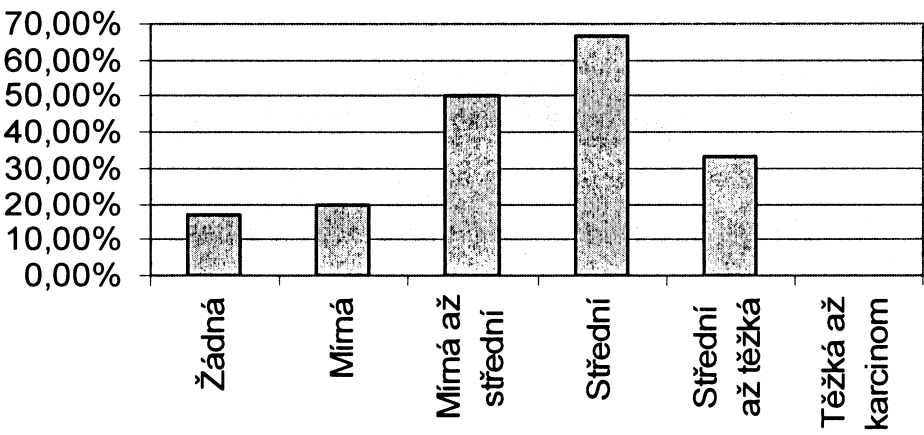
Při srovnání výskytu somatických mutací genů se stupni displázie polypu nelze přímo testovat korelaci, protože získané počty pacientů v jednotlivých skupinách rozdělených podle stupně displázie jsou příliš nízké. Z grafu 5.2 procentuálního zastoupení somatických mutací genu K-RAS u jednotlivých stupňů displázie polypu je však patrná vzrůstající tendence podílu polypů s mutací K-RAS. Zvyšující se frekvence je také patrná při celkovém sledování procentuálního zastoupení nalezených mutací alespoň u jednoho z genů APC, K-RAS a TP53 (graf 5.3). Vezmu-li v úvahu všeobecně uznávanou teorii o rozvoji nádorového onemocnění v důsledku postupné akumulace genetických změn DNA (BOLAND 2002), měl by tento graf vykazovat v závislosti na pokročilejším stupni displázie rostoucí četnosti detekovaných somatických mutací genů. Nižší četnosti mutací v kategoriích pacientů se střední až těžkou displázií a těžkou

displázií až karcinomem jsou zřejmě způsobeny již zmiňovanými nízkými počty pacientů v jednotlivých skupinách. Stejně lze jistě zdůvodnit podobný stav u genu K-RAS.

Somatickou mutaci genu TP53 jsem detekovala jedinou, a to v polypu se střední až těžkou displázií, což odpovídá publikovaným údajům, že ztráta funkce genu je typická pro přechod od pozdního adenomu k časnému karcinomu (CALVERT a FRUCHT 2002).



Graf 5.2 Procentuální zastoupení mutací genu K-RAS u jednotlivých stupňů dysplázie polypu



Graf 5.3 Procentuální zastoupení mutací alespoň jednoho z genů APC, K-RAS a TP53 u jednotlivých stupňů dysplázie polypu

Dalším z nepřímých parametrů pokročilosti nádorových procesů je i samotná velikost polypu. U větších polypů jsem prováděla dělení a izolaci z jednotlivých částí. Při té příležitosti jsem po srovnání výsledků vyšetření všech částí téhož polypu došla k zajímavému závěru, že v každé části polypu je možné identifikovat mutace odlišných genů a nebo různé mutace téhož genu, neboli že je polyp z hlediska somatických mutací heterogenní. Toto zjištění odpovídá všeobecně uznávané teorii o postupné akumulaci genetických změn v původně zdravé tkáni vedoucí ke vzniku nádorového onemocnění (BOLAND 2002).

V souvislosti s těmito výsledky by jistě bylo přínosné zabývat se podrobněji možnostmi paralelních vyšetření více částí téhož polypu z důvodu zjištění prostorového rozmístění somatických mutací v polypu. Toto by mohlo přispět k důkladnějšímu pochopení jeho růstu a diferenciace a uplatnilo by se při technice odstraňování polypů během kolonoskopického vyšetření. Jeden ze způsobů, jak studovat topologii polypu, jsem již vyzkoušela na několika vzorcích – jde o analýzu řezů z archivovaných parafinových bloků. Přestože byla DNA vyizolovaná z parafinu značně degradovaná a výtěžky byly nízké, tato metoda se ukázala jako vhodná při kombinaci tohoto způsobu získání vzorků a následné analýzy genetických změn pomocí vysoce citlivé metody separace heteroduplexů v teplotním gradientu (MINÁRIK *et al.* 2004).

5.3 Karcinom pankreatu

U bioptických vzorků a resekátů jsem prováděla analýzu somatických bodových mutací genů K-RAS a TP53 a alelických delecí chromozómů 9 a 18, kde se nacházejí geny P16 a DPC4. U všech sledovaných pacientů bylo možno na konci projektu stanovit konečnou diagnózu (většinou na základě popitevního patologického vyšetření) a tím i ověřit citlivost a specifitu testů prováděných v jeho průběhu.

Procento nalezených somatických bodových mutací genu K-RAS u karcinomů pankreatu (64 %) v podstatě odpovídá údajům uváděným v literatuře (75–90 %) (WALDMANN a RABES 1996, ROBBINS a ITZKOWITZ 2002). Dosažená specifita testu je 100 %, což sice zcela neodpovídá klasickému modelu, avšak koresponduje například s nedávnou prací japonských autorů (TAKAHASHI *et al.* 2005). Tato vysoká specifita nabízí využití tohoto markeru například pro plošné screeningové programy.

U genu TP53 jsem prováděla analýzu exonů 5–8, které představují, stejně jako u kacinomu kolorekta, přibližně 90% všech mutací tohoto genu. (<http://p53.free.fr>) V literatuře se uvádí, že u KP je gen TP53 inaktivován v 50–75 % (BARTON *et al.* 1991, BEROZPE *et al.* 1994, PELEGATA *et al.* 1994, ROZENBLUM *et al.* 1997, NAKAMORI *et al.* 1998, HRUBAN *et al.* 2001b, SEEMANN *et al.* 2004). To znamená, že by 90 % z 50–75 %, tj. přibližně 45–68 % karcinomů pankreatu mělo obsahovat mutaci genu TP53. Podle mých výsledků má 23 % pacientů s karcinomem somatickou bodovou mutaci genu TP53. Ovšem je třeba si uvědomit, že u dalších pacientů mohlo dojít k TP53 deleci, kterou jsem nevyšetřovala. Výskyt mutací v jednotlivých exonech genu TP53 vykazuje poměrně rovnoměrné rozložení, což také odpovídá údajům v literatuře (<http://p53.free.fr>). Specifita testu představuje opět 100 %, neboli žádný z benigních kontrol mutaci genu TP53 nevykazoval. Toto zjištění není vzhledem k závažnosti poruch genu TP53 nijak překvapující.

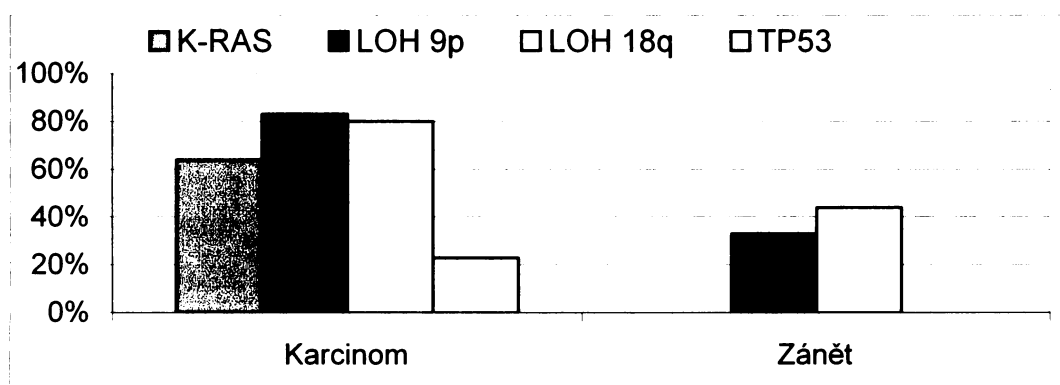
Výsledky vyšetření delecí krátkého ramene chromozómu 9, kde se nachází gen P16, vykazují poměrně vysokou senzitivitu 83 %. Výskyt LOH u benigních zánětů je však na úrovni 33 %, čímž je snížena jeho specifita. V literatuře se uvádí, že u adenokarcinomů pankreatu je gen P16 inaktivován přibližně v 95 % (BARTSCH *et al.* 1995, HU *et al.* 1997). Tyto inaktivace jsou ve 40 % způsobeny homozygotními delecemi, dalších 40 % je zapříčiněno ztrátou jedné alely spojenou s genovou mutací na druhé alele (CALDAS *et al.* 1994, ROZENBLUM *et al.* 1997, SCHUTTE *et al.* 1997). To znamená, že pokud by mé výsledky odpovídaly údajům v odborné literatuře, měla bych při použití zvolených metod získat přibližně 40–80 % pozitivních výsledků v závislosti na tom, zda při izolaci DNA či mikrodisekci byly zachyceny buňky, kde byla deletována jen jedna alela. Pokud by získaný genetický materiál pocházel pouze z buněk s chybějícími oběma alelami (nebo s příměsí DNA zdravé tkáně), LOH bych nezjistila.

Při vyšetření alelických delecí 18. chromozómu, kde se nachází gen DPC4, jsem získala 80 % pozitivit u pacientů s karcinomem pankreatu a 44 % u benigních zánětů. Hodnoty senzitivity i specifity jsou tedy obdobné jako u 9p. Podle odborné literatury je gen DPC4 inaktivován v přibližně 55 % karcinomů pankreatu. Ve 35 % se tak děje prostřednictvím homozygotní delece, ve zbývajících 20 % je jedna alela ztracena a u druhé došlo ke genové mutaci (HAHN S. A. *et al.* 1996). Při použití zvolené metody

bych tedy měla detekovat 20–55 % LOH.

Vyšetřování alelických ztrát nepochybně představuje výrazně složitější metodický problém ve srovnání s detekcí bodových mutací. Kromě již zmíněných kvantitativních aspektů je dalším problémem i fakt, že podmínkou pro odečítání je heterozygotní stav daného markeru. Z tohoto důvodu je vždy třeba vyšetřovat sadu několika markerů najednou. V této práci jsem vyšetřovala celkem 3 markery chromozómu 9p a 2 markery chromozómu 18q. Jako hodnotitelný výsledek jsem označovala pouze vzorky, kde dva z vyšetřovaných markerů dávaly shodnou odpověď. Z těchto důvodů byla následně téměř polovina vzorků nevyhodnotitelná. Pokud by na tento pilotní projekt navazoval další zaměřený na plošný skríníng, bylo by zřejmě nutno počet vyšetřovaných markerů dále rozšířit. Z klinického hlediska je zajímavý relativně vysoký výskyt alelických ztrát obou lokací u benigních pankreatických zánětů, který naznačuje středně pokročilý stupeň v rozmezí stupňů modelu pankreatické neoplázie označených jako PanIN-2 až PanIN-3. Vzhledem k absenci definovaných pozitivních kontrol je však také třeba vzít v úvahu možnost výskytu falešných pozitivit v důsledku použitých metodologických postupů. Především se jedná o vlastní izolaci genetického materiálu, následnou amplifikaci a dávkování při kapilární elektroforéze.

Jako hlavní klinický výstup lze použít vyhodnocení positivity vzorků při současném posouzení více markerů najednou a jejich porovnání u maligních karcinomů a benigních zánětů prezentovaných v grafu 5.4. Z tohoto vyhodnocení je zcela zřetelný nižší podíl výskytu sledovaných somatických abnormalit u chronických zánětů pankreatu ve srovnání s pankreatickými karcinomy.



Graf 5.4 Podíl somatických změn u karcinomů a zánětů slinivky

U 11 pacientů byl k dispozici vzorek biopsie získaný během diagnostického vyšetření i vzorek resekátu získaného během následné operace. U těchto pacientů jsem zjišťovala, do jaké míry si odpovídá výsledek molekulárně-biologického testu v obou typech vzorků. U genu K-RAS byl molekulárně-biologický nálezný shodný v 85 %, u genu DPC4 byl shodný v 62 %, u genu P16 byl shodný v 38 % a u genu TP53 byl shodný ve 100 %. Rozdíly ve výsledcích příslušných ke vzorkům jednoho pacienta mohly být způsobeny především falešnou negativitou u resekátů, kde často mutace nebyla zachycena. Nejpravděpodobnějším důvodem byl fakt, že u biopsií bylo vyšetření zaměřeno na disektované nádorové buňky, zatímco u resekátů mikrodisekce prováděna nebyla.

Na závěr jsem ověřovala možnost zvýšení citlivosti diagnostiky karcinomu pankreatu při kombinaci klasicky používaného cytologického vyšetření vzorků biopsií nabíraných tenkou jehlou (fine needle aspiration biopsy, FNAB) a molekulárně-genetického testu založeného na sledování přítomnosti vybraných somatických mutací. Cytologická metoda obecně vykazuje vysokou míru citlivosti i senzitivity, avšak 15–25 % vzorků zůstává nevyhodnotitelných (Prim. MUDr. Petr Hrabal, Histopatologické oddělení ÚVN Praha, osobní sdělení). Na základě zde získaných výsledků se ukazuje, že právě u skupiny vzorků nevyhodnotitelných cytologickým vyšetřením je možné pro stanovení diagnózy s úspěchem použít molekulárně-genetické vyšetření při použití kombinace K-RAS, LOH 9p, LOH 18q a TP53 markerů. U této skupiny nedošlo ani v jednom případě k nezachycení karcinomu a pouze vzorky dvou pacientů zůstaly i po molekulárně-genetickém vyšetření jako nevyhodnotitelné vlivem negativního nálezu K-RAS a nevyhodnotitelného výsledku LOH testů (např. v důsledku homozygoty pro vyšetřované markery). Na základě tohoto výsledku se dvoustupňová kombinace cytologického a molekulárně-genetického vyšetření ukazuje jako nadějná metoda pro efektivní diagnostickou praxi.

6 Souhrn

Podmínky extrakce DNA z čerstvých i archivovaných klinických vzorků jsem optimalizovala pro následnou mutační analýzu pomocí vysoce citlivé multikapilární elektroforézy. Zjistila jsem, že pro účely detekce LOH je optimální způsob eluce DNA získané z periferní krve do H₂O, kdy poměrné kvantitativní zastoupení obou alel zůstává reprodukovatelně nezměněno. Laserová mikrodisekce aplikovaná u archivovaných preparátů, jako jsou cytologická sklíčka nebo histologické parafrínové řezy, je velmi vhodnou metodou pro získání mutovaných buněk z preparátů časných lézí, kde je velmi malý podíl nádorové tkáně.

Ze vzorků nádorových tkání jsem vyšetřila vybrané typy somatických poruch, zahrnující bodové genové mutace a alelické delecce hlavních genů účastnících se karcinogeneze. Celkem jsem během těchto molekulárně-genetických vyšetření provedla 2483 amplifikací s následnou analýzou PCR produktů.

Získané frekvence mutací u pacientů podstupujících polypektomii odpovídají očekávaným hodnotám, avšak přímou korelaci četnosti nalezených mutací a řazení vzorků podle stupně dysplázie potvrdit nelze z důvodu malých počtů pacientů v jednotlivých skupinách. Neověřila jsem tedy ani všeobecně uváděný Vogelsteinův model progresu kolorektálního karcinomu. Významným výsledkem je zjištění heterogenity rozložení mutací v adenomatózní tkáni. V souvislosti s těmito výsledky by jistě bylo přínosné zabývat se podrobněji molekulárně-genetickou topologií polypu. Znalost prostorového rozmístění somatických mutací v polypu by přispěla k důkladnějšímu pochopení jeho růstu a diferenciace a uplatnila by se při odstraňování polypů během kolonoskopického vyšetření.

Frekvence nalezených somatických mutací vybraných genů účastnících se karcinogeneze u pacientů s karcinomem pankreatu přibližně odpovídají údajům v odborné literatuře. Oproti původnímu záměru nebyla patologem stanovena stádia pankratické intraepiteliální neoplázie (PanIN), a proto nebylo možné porovnat výskyt somatických mutací s jejich histopatologickým obrazem ani ověřit model progresu karcinomu pankreatu (tzv. PanIN model). Velmi zajímavá je však dosažená specifická testu na detekci somatických mutací genů K-RAS a TP53, která je na rozdíl od většiny publikovaných údajů 100 %. Tento výsledek však může být do jisté míry ovlivněn

relativně malým počtem pacientů v kontrolní skupině benigních zánětů.

Potvrdila jsem vysokou citlivost diagnostiky karcinomu pankreatu při kombinaci cytologického vyšetření (fine needle aspiration biopsy – FNAB) a molekulárně-genetického testu na přítomnost vybraných somatických mutací (bodových mutací a alelických delecí). Na základě tohoto výsledku se dvoustupňová kombinace cytologického a molekulárně-genetického vyšetření ukazuje jako nadějná metoda pro efektivní diagnostickou praxi. Ve svém důsledku by prostřednictvím zkvalitnění diagnostiky měla přispět k pozitivnímu ovlivnění délky přežití pacientů a snížení nákladů na léčbu.

Předkládaná práce představuje ucelený přehled možností molekulárně-genetických vyšetření v klinické praxi zaměřených především na detekci somatických mutací. Získané výsledky odpovídají současným poznatkům publikovaným v odborné literatuře. Část výsledků byla prezentována 18. 3. 2006 na přednášce ESCI v Praze: Š. Suchánek, M. Zavoral, L. Benešová, L. Kašperová, P. Hrabal, M. Minárik: High-sensitive detection of early somatic mutations in and around adenomatous polyps. Část výsledků bude prezentována 8. 9. 2006 na VI. brněnském pankreatologickém dni v Brně: C. Šálek, L. Benešová, L. Fantová, L. Kašperová, B. Belšánová, V. Nosek, P. Hrabal, E. Traboulsi, M. Minárik, M. Zavoral: Genové variace v časném karcinomu pankreatu – výsledky prospektivní studie 120 pacientů. V současné době je dokončována publikace: Šálek C., Benešová L., Zavoral M., Nosek V., Kašperová L., Ryska M., Traboulsi E., Minárik M.: Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer.

7 Seznam citované literatury

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): Molecular Biology of the Cell, 4. vydání, Garland Publishing, New York.

American Cancer Society (2003): Cancer Facts and Figures.

Barton C. M., Stadion S. L., Hughes C. M. (1991): Abnormalities of the p53 tumour suppressor gene in human pancreatic cancer. Br J Cancer. Vol. 64: 1076–1082.

Bartsch D., Shevlin D. W., Tung W. S. (1995): Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinomas. Genes Chrom Cancer. Vol. 14: 189–195.

Bérout Ch., Soussi T. (1996): APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids Research, Vol. 24, No. 1: 121–124.

Berrozpe G., Schaeffer J., Peinado M. A. (1994): Komparative analysis of mutations in the p53 K-ras genes in pancreatic cancer. Int J Cancer . Vol. 58: 185–191.

Boland C. R. (1997): Genetic pathways to colorectal cancer. Hosp Pract. Vol. 32: 79.

Boland C. R. (2002): Molecular Basis for Stool-Based DNA Tests for Colorectal Cancer: A Primer for Clinicians. Reviews in Gastroenterological disorders, Vol. 2, Suppl. 1: 12–19.

Bos J. L. (1989). Citováno podle Smith G., Carey F. A., Beattie J., Wilkie M. J. V., Lightfoot T. J., Coxhead J., Garner R. C., Steele R. J. C., Wolf C. R. (2002): Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53 – alternative genetic pathways to colorectal cancer. Medical Sciences, Vol. 99, No. 14: 9433–9438.

Butz J., Wickstrom E., Edwards J. (2003): Characterization of mutations and loss of heterozygosity of p53 and K-ras2 in pancreatic cancer cell lines by immobilized polymerase chain reaction. BMC Biotechnology, Vol. 23, No 3: 11–16.

Caldas C., Hahn S. A. da Costa L. T. (1994): Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. Nature Genet. Vol. 8: 27–32.

Calvert P. M., Frucht H. (2002): The Genetics of Colorectal Cancer. Annals of Internal

Medicine, Vol. 137, No. 7: 603–613.

Canzian F., Salovaara R., Hemminki A, Kristo P., Chadwick R. B., Aaltonen L.A. (1996): Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Research*, Vol. 56: 3331–3337.

Fearon E. R., Cho K. R., Nigro J. M., Kern S. E., Simons J. W., Ruppert J. M. (1990a): Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*. Vol. 247: 49–56.

Fearon E. R., Vogelstein B. (1990b): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, Vol. 61: 759–767.

Fodde R. (2002): The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 38: 867–871.

Forgacs I. (1988): Oncogenes and gastrointestinal cancer. *Gut*. Vol. 29: 417–421.

Hahn S. A., Schulte M., Hoque A. T. M. S. (1996): DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18 q21.1. *Science*. Vol. 271: 350–353.

Harris C. C. (1996): Structure and Function of the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues for Rational Cancer Therapeutic Strategies. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 88, No. 20, October 16: 1442–1455.

Henderson B. R. (2000): Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates β -catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2: 653–660. Citováno podle Narayan S., Roy D. (2003): Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer* 2003, 2–41.

Henderson B. R., Fagotto F. (2002): The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep* 3: 834 – 839 Citováno podle Narayan S., Roy D. (2003): Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer* 2003, 2–41.

Herold G. (2000): Vnitřní lékařství, 1. vydání, vydal Petr Dlouhý, Milady Horákové 30, Praha 7, 17000, přeloženo z německého originálu: Gerd Herold (2000): *Innere Medicine*, Koln.

Hořejší V., Bartůňková J. (2002): Základy imunologie, 2. vydání, TRITON, Praha.

Hruban R. H., Goggins M., Parsons J., Kern S. E. (2000): Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, Vol. 6: 2969–2972.

Hruban R. H., Iacobuzio-Donahue Ch., Wilentz R. E., Goggins M., Kern S. E. (2001b): Molecular Pathology of Pancreatic Cancer. *The Cancer Journal*, Vol. 7, No. 4 July/August: 251–256.

Hruban R.H., Adsay N. V., Albores-Saavedra J., Compton C., Garrett E., Goodman S. N., Kern S. E., Klimstra D. S., Kloppel G., Longnecker D. S., Luttges J., Offerhaus G. J. A. (2001a): Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): A New nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*, Vol. 25: 579–586.

Hu Y. X., Watanabe H., Ohtsubo K. (1997): Frequent loss of p16 expression and its correlation with clinicopathologic parameters in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*. Vol. 3: 1473–1477.

Chunxia Z., Guowang X., Xianzhe S., Jianmei M., Shen L., Qing Y. (2003): Detection of K-ras exon 1 mutations by constant denaturant capillary electrophoresis. *Biomed. Chromatogr*. 18: 538–541.

Kern S. E., Goggins M. G., Hruban R. H. (1985): Pancreas Cancer: Molecular Biology and Genetics. In: Devita V. T., Hellman S., Rosenberg S. A. (eds.): *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2nd edition, 435–449.

Kinzler K. W., Vogelstein B. (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. Vol. 87: 159

Kinzler K. W., Vogelstein B. (1998): Landscaping the cancer terrain. *Science*. Vol. 280: 1036–1037.

Kirsch D. G., Kastan M. B. (1998): Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol*. Vol. 16: 3158–3168.

Ko L. J., Prives C. (1996): p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. Vol. 10: 1054.

Kressner U., Inganas M, Byding S., Blikstad I., Pahlman L., Glimelius B. (1999): Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. Vol 17: 593–599.

Lassus H., Salovaara R., Aaltonen L. A., Butzow R. (2001): Alelic Analysis of Serous Ovarian Carcinoma Reveals Two Putative Tumor Suppressor Loci at 18q22-q23 Distal to SMAD4, SMAD2, and DCC. *American Journal of Pathology*, Vol. 159, No. 1: 35–42.

Marra G., Boland C. R. (1995): Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 87, No. 15: 1114–1125.

Minárik, M.; Mináriková, L.; Bjorheim, J.; Ekstrom, P.O. (2003): Cycling Gradient Capillary Electrophoresis (CGCE): A low cost tool for high-throughput analysis of genetic variations, *Electrophoresis*, Vol. 24, No. 11: 1716–1722.

Minárik M., Mináriková L., Hrabíková M., Mináriková P., Hrabal P., Zavoral M. (2004): Application of cycling gradient capillary electrophoresis to detection of APC, K-ras, and DCC point mutations in patients with sporadic colorectal tumors. *Electrophoresis*, Vol. 25, No. 7–8: 1016–1021.

Miyaki M., Konishi M., Kikuchi-Yanoshita R. (1994): Characteristics of somatic mutations of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res*. Vol. 54: 3011.

Miyoshi Y., Nagase H., Ando H. (1992): Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*. Vol. 1: 229.

Moerkerk P., Arends J., van Driel M., de Bruine A., de Goeij A., Kate J. (1994): Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Res* 54: 3376–3378.

Nakamori S., Yashima K., Murakami Y. (1998): Association of p53 gene mutations with short survival in pancreatic adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res*. Vol. 86: 174–181.

Narayan S., Roy D. (2003): Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer* 2003, 2–41.

Národní Onkologický Registr (2003), Praha.

Neufeld K. L., Nix D. A., Bogerd H., Kang Y., Beckerle M. C., Cullen B. R., White R. L. (2000): Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12085–12090
Citováno podle Narayan S., Roy D. (2003): Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer* 2003, 2–41.

Neufeld K. L., White R. L. (1997): Nuclear localizations of the adenomatous polyposis coli protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3034–3039 Citováno podle Narayan S., Roy D. (2003): Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer* 2003, 2–41.

Nussbaum R. L., McInnes R. R., Willard H. F. (2004): *Klinická Genetika*, 6. vydání, TRITON, Praha.

Pellegata N. S., Sessa F., Renault B. (1994): K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res.* Vol. 54: 1556–1560.

Prives C. (1998): Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell.* Vol. 95: 5.

Powell S. M., Zilz N., Beazer-Barclay Y. (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* Vol. 359: 235.

Prosser J. (1993): Detecting single-base mutations. *Trends Biotech.*, Vol. 11: 238–246.

Queneau P. E., Adessi G. L., Thibault P., Cleau D., Heyd B., Manton G., Carayon P. (2001): Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a K-ras point mutation in the pancreatic juice, *Am. J. Gastroenterol.*, Vol. 96: 700–704.

Robbins D. H., Itzkowitz S. H. (2002): The molecular and genetic basis of colon cancer. *The Medical Clinics of North America*, Vol. 86: 1467–1495.

Rosin-Arbesfeld R., Townsley F., Bienz M. (2000): The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* 406: 1009–1012 Citováno podle Narayan S., Roy D. (2003): Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer* 2003, 2–41.

Rozenblum E., Schulte M., Goggins M. (1997): Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* Vol. 57, 1731–1734.

Russo A. A., Tong L., Lee J. O., Jeffrey P. D., Pavletich N. P. (1998): Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature*. Vol. 395: 237–243.

Seemann S., Maurici D., Olivier M., Caron de Fromental C., Hainant P. (2004): The Tumor Suppressor Gene TP53: Implications for Cancer Management and Therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. Vol. 41, No. 5–6: 551– 583.

Sellers W. R., Rodgers J. W., Kaelin W. G. (1995): A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 92: 11544–11548.

Schulte M., Hruban R. H., Geradts J. (1997): Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* Vol. 57: 3126–3130.

Schutte M., Hruban R. H., Hedrick L. (1996): DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res.* Vol. 56: 2527–2530.

Smith G., Carey F. A., Beattie J., Wilkie M. J. V., Lightfoot T. J., Coxhead J., Garner R. C., Steele R. J. C., Wolf C. R. (2002): Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53 – alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Medical Sciences*, Vol. 99, No. 14: 9433–9438.

Su L. K., Vogelstein B., Kinzler K. W. (1993): Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*. Vol. 262: 1734–1737.

Sun X. F., Rutten S., Zhang H., Nordenskjöld B. (1999): Expression of the deleted in colorectal cancer gene is related to prognosis in DANN diploid and low proliferative

colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* Vol. 17: 1745–1750.

Takahashi K., Yamao K., Okubo K., Sawaki A., Mizuno N., Ashida R., Koshikawa T., Ueyama Y., Kasugai K., Hase S., Kakumu S. (2005): Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc.*, Vol. 61, No. 1: 76–79.

Tortola S., Marcuello E., González I., Reyes F., Arribas R., Aiza G. (1999): p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* Vol. 17: 1375–1381.

Trková M., Babjuk M., Dušková J., Benešová-Mináriková L., Soukup V., Mareš J., Minárik M., Sedláček Z. (2005): Analysis of genetic events in 17p13 and 9p21 regions supports predominant monoclonal origin of multifocal and recurrent bladder cancer. *Cancer Letters*: 1–9, Article in press.

Uldrian S., Kotala V., Vojtěšek B. (2002): Regulace stability a aktivity nádorového supresoru p53. *Chemické listy* 96: 145–149.

Vogelstein B., Fearon E. R., Hamilton S. R., Kern S. E., Preisinger A. C., Leppert M. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* Vol. 319: 525–532.

Vousden K. H. (2000): p53: Death Star. *Cell*, Vol. 103: 691–694.

Waldmann V., 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.* Vol. 192: 883–891.

Wilkening S., Hemminki K., Thirumaran R. K., Bermejo J. L., Bonn S., Forsti A., Kumar R. (2005): Determination of allele frequency in pooled DNA: comparison of three PCR-based methods. *Biotechniques.* Vol. 39, 853–858.

Zhang F., White R. L., Neufeld K. L. (2000): Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 97: 12577–12582 Dle Narayan S., Roy D. (2003): Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol.Canc.*, 2–41.

