

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Katedra genetiky a mikrobiologie



Genomac International, s.r.o.

Laboratoř molekulární genetiky a onkologie



Dizertační práce

**Využití moderních molekulárně-genetických metod
v prevenci, časně diagnóze, predikci léčby a
prognóze nádorových onemocnění**

Lucie Benešová

Školitel: RNDr. Marek Minárik, Ph.D.

Praha 2007

1	Seznam zkratk.....	2
1.1	Seznam zkratk genů a proteinů.....	2
1.2	Seznam ostatních zkratk	3
2	Úvod	5
3	Literární přehled	9
3.1	Nádorová onemocnění.....	9
3.1.1	Kolorektální karcinom.....	9
3.1.2	Karcinom pankreatu	10
3.1.3	Karcinom plic	12
3.1.4	Karcinom prostaty	13
3.1.5	Karcinom močového měchýře.....	14
3.2	Nádorové onemocnění na molekulární úrovni	16
3.2.1	Molekulární původ nádorového bujení.....	16
3.2.2	Protoonkogeny analyzované v této práci.....	17
3.2.2.1	Gen KRAS.....	17
3.2.2.2	Gen EGFR	18
3.2.3	Tumor supresorové geny analyzované v této práci	21
3.2.3.1	Gen TP53.....	21
3.2.3.2	Gen CDKN2A	24
3.2.3.3	Gen APC.....	25
3.2.3.4	Gen DCC	27
3.2.3.5	Gen SMAD4.....	28
3.3	Polymorfismy a nádorová onemocnění	30
3.3.1	Vztah polymorfismů a nádorového bujení	30
3.3.2	Geny metabolické dráhy testosteronu analyzované v této práci.....	31
3.3.2.1	Gen CYP17A1	31
3.3.2.2	Gen CYP3A4.....	32
3.3.2.3	Gen SRD5A2.....	32
3.4	Analýzy molekulárních markerů u nádorových onemocnění.....	33
3.4.1	Molekulární markery	33
3.4.1.1	Somatické DNA variace	33
3.4.1.2	Polymorfismy	34
3.4.2	Typy a charakter vzorků.....	34
3.4.3	Metody vyšetřování molekulárních markerů u nádorových onemocnění ...	35
3.4.3.1	Kapilární elektroforéza	36
3.4.3.2	Restrikční analýza.....	37
3.4.3.3	DNA sekvenování podle Sangera.....	38
3.4.3.4	Fragmentační analýza	39
3.4.3.5	Loss of heterozygosity	40
3.4.3.6	TGCE.....	41
3.4.3.7	SSCP.....	43
4	Publikace	45
5	Závěr.....	55
6	Seznam citované literatury	57
7	Prohlášení	67

1 Seznam zkratek

1.1 Seznam zkratek genů a proteinů

APC	adenomatosis polyposis coli
AR	androgen receptor
ATM	ataxia telangiectasia mutated
BRCA1	breast cancer 1
BRCA2	breast cancer 2
CCND1	cyclin D1
CDK4	cyclin dependent kinase 4
CDK6	cyclin dependent kinase 6
CDKN2A (p14, p16)	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
c-Jun	jun oncogene
COX2	cyclooxygenase 2b
CYP17A1	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
DCC	deleted in colorectal carcinoma
E2F1	E2F transcription factor 1
EGF	epidermal growth factor
EGFR (ERBB2,HER1)	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)
ERCC1	excision repair cross-complementing 1
ERCC2	excision repair cross-complementing 2
GCK3 β	glycogen synthase kinase 3 beta
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
HER2(ERBB2)	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
Her3 (ErbB3)	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
Her4 (ErbB4)	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
IFNG	interferon gamma
IL6	interleukin 6
IL8	interleukin 8
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MDM2	p53 binding protein (mouse)

MDR1	multi drug rezistence 1
MYC (c-Myc)	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
NF-kappaB (NFKB1)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PLC	phospholipase C
Raf (Raf1)	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
Ral (RalA)	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A
RB1	retinoblastoma 1
RPA	replication protein A
Shc1	Src homology 2 domain containing transforming protein 1
Smad2	SMAD family member 2
Smad3	SMAD family member 3
SMAD4 (DPC4)	SMAD family member 4 (deleted in pancreatic carcinoma 4)
Sos	son of sevenless
Sp1	Sp1 transcription factor
SRD5A2	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2
TGF β	transforming growth factor β
TNF alfa	tumor necrosis factor alpha
TP53	tumor protein p53
Wnt (Wnt1)	wingless-type MMTV integration site family, member 1
XRCC1	X-ray repair cross complementing protein 1
XRCC3	X-ray repair cross complementing protein 3

1.2 Seznam ostatních zkratek

ADD	addiction/dependence domain
ATP	adenosin trifosfát
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CGCE	kapilární elektroforéza v cyklujícím gradientu (cycling gradient capillary electrophoresis)
ddNTP	dideoxyribonukleosid trifosfát
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza (denaturing gradient gel electrophoresis)

DHT	dihydrotestosteron
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
ERPC	endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie
FAP	familiární adenomatózní polypóza (familial adenomatous polyposis)
GAP	GTPázu aktivující proteiny (GTPase Activating Proteins)
GDP	guanosin difosfát
GEF	guanozin výměnný faktor (guanosin exchange factor)
GTP	guanosin trifosfát
HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma)
LOH	ztráta heterozygosity (loss of heterozygosity)
MAPK	mitogenně aktivovaná protein kináza
MCR	mutační klastr (mutation cluster region)
MH1	Mad homolog 1 (Mad homology1)
MH2	Mad homolog 2 (Mad homology 2)
MMR geny	mutátorové geny (mismatch repair genes)
NLS	jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal)
PanIN	pankreatická intraepiteliální neoplasie
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymer chain reaction)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
SAD	Smad4 aktivační doména (Smad4 activation domain)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
SSCP	jednořetězcový konformační polymorfismus (single strand conformation polymorphism)
STR	krátké tandemové repetice (short tandem repeat)
TCC	karcinom z přechodných buněk (transitional cell carcinoma)
TKI	inhibitor tyrozin kináz (tyrosin kinase inhibitor)
VNTR	variabilní množství tandemových repetice (variable number tandem repeat)

2 Úvod

Nádorová onemocnění jsou v současné době po kardiovaskulárních onemocněních nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích. V České republice na nádorová onemocnění umírá ročně více než 27 tisíc osob, což představuje 23 % z celkové úmrtnosti. Příčiny vysoké úmrtnosti spočívají v narůstající incidenci, pozdním zachytu a špatné odpovědi na léčbu⁹. Proto se současné výzkumy v této oblasti zaměřují především na podrobnou charakteristiku jednotlivých typů nádorů na molekulární úrovni, která by umožnila časnou diagnostiku a odhad chování a odpovědi nádoru na konkrétní léčbu.

Jedním z nadějných směrů pro detekci časných fází nádorového procesu se ukazuje být vyšetření molekulárních markerů. Vyšetření zahrnuje nejčastěji analýzu somatických DNA mutací a analýzu exprese RNA u vybraných genů. Tyto analýzy mohou být využívány také pro predikci léčebné odpovědi na konkrétní terapeutika, kde je navíc sledován také výskyt jednonukleotidových polymorfismů a genové amplifikace. Detekce určitých kombinací vybraných jednonukleotidových polymorfismů může také sloužit ke zjištění zvýšené náchylnosti jedince k určitému typu nádorového onemocnění a na základě toho provést jeho zařazení do preventivního programu.

Tato dizertační práce je zaměřená na vyšetřování molekulárních markerů u různých typů nádorových onemocnění zahrnujících karcinom kolorekta, slinivky, plic, močového měchýře a prostaty. V úvodní části jsou shrnuty základní údaje o výše uvedených nádorových onemocněních včetně genů, které jsou v jejich souvislosti nejčastěji vyšetřovány a dále jsou zde popsány vybrané metody používané při analýze DNA variací v těchto genech. Výsledková část se skládá z osmi publikací - pět z nich bylo uveřejněno v mezinárodních recenzovaných časopisech, jedna byla přijata do tisku tuzemského časopisu a dvě byly zaslány k recenzi do mezinárodních časopisů. Tři publikace jsou zaměřeny výhradně metodicky, zbývajících pět obsahuje také klinická data. Jsou to tyto publikace:

1) Cycling gradient capillary electrophoresis: a low-cost tool for high-throughput analysis of genetic variations.¹

Tato práce představuje novou metodu pro analýzu DNA variací vycházející z teplotně denaturační kapilární elektroforézy. Místo dosud používaného lineárního teplotního gradientu je použit cyklující, který kromě zlepšení separace jednotlivých fragmentů

umožňuje opakované dávkování několika vzorků za sebou v jedné analýze, což při použití 96-ti kapilárního genetického analyzátoru, na který byl postup optimalizován, představuje až 17 000 analyzovaných vzorků během 24 hodin.

2) Application of cycling gradient capillary electrophoresis to detection of APC, K-ras, and DCC point mutations in patients with sporadic colorectal tumors. ²

Publikace ukazuje využití dříve popsané metody kapilární elektroforézy v cyklickém gradientu (CGCE) na vzorcích pacientů s různými stádii kolorektálního karcinomu. Byly vyšetřeny mutace v genech APC, KRAS a DCC účastnících se procesu přechodu od adenomu ke karcinomu. Na vzorcích s velmi malým podílem nádorových buněk bylo mimo jiné ukázáno, že metoda vykazuje vysokou citlivost, která je při detekci sporadických mutací základním předpokladem.

3) Multicapillary electrophoresis of unlabeled DNA fragments with high-sensitive laser-induced fluorescence detection by counter-current migration of intercalation dye. ³

Zde je ukázána alternativa k analýze fluorescenčně značených PCR fragmentů pomocí multikapilárního genetického analyzátoru využívající značení fragmentů dvěma běžně dostupnými interkalačními činidly (ethidium bromid a Sybr Green II). Použití této metody umožňuje univerzálně analyzovat DNA fragmenty bez použití drahých fluorescenčně značených primerů a vyplatí se zejména v případech, kdy je vyšetřováno menší množství vzorků nebo kdy jsou pro daný marker k dispozici pouze nezařazené primery například pro účely sekvenování.

4) Analysis of genetic events in 17p13 and 9p21 regions supports predominant monoclonal origin of multifocal and recurrent bladder cancer. ⁴

Hlavním cílem této práce bylo ověření monoklonální povahy mnohočetného karcinomu močového měchýře porovnáním vybraných molekulárních markerů u jednotlivých tumorů. Kromě mutací v genu TP53 byly sledovány rozsáhlé delece v oblastech 17p13 and 9p21 metodou ztráty heterozygosity (LOH) za použití postupu značení DNA fragmentů pomocí interkalačního činidla Sybr Green II popsaného v předchozí publikaci i fluorescenčně značených primerů. Na základě výsledků byla podpořena teorie o monoklonálním původu mnohočetného karcinomu močového měchýře.

5) Parallel optimization and genotyping of multiple single-nucleotide polymorphism markers by sample pooling approach using cycling-gradient CE with multiple injections. ⁵

Publikace je zaměřena na využití metody CGCE s opakovaným dávkováním pro genotypování jednonukleotidových polymorfismů (SNP). Na 44 polymorfismech a téměř 500 pacientech je zde ukázána 80% úspěšnost celého postupu od návrhu primerů, přes optimalizaci PCR a separačních podmínek až po vlastní analýzy. Pro zvýšení pravděpodobnosti záchytu analyzovaného polymorfismu při optimalizaci separačních podmínek je zvolen speciální přístup, při kterém jsou použity směsi 20 DNA vzorků od různých pacientů. Z práce je patrné, že ve srovnání s jinými postupy umožňujícími vysokokapacitní analýzy, jde o poměrně jednoduchou metodu s nízkými náklady a velmi dobrými výsledky.

6) Frekvence výskytu vrozených DNA polymorfismů genů syntetické dráhy testosteronu v České populaci pacientů s karcinomem prostaty. ⁶

Tento článek shrnuje výsledky projektu zabývajícího se vyšetřením SNP markerů v souvislosti s karcinomem prostaty postupem popsáním v předchozí publikaci. Bylo genotypováno 30 jednonukleotidových polymorfismů nacházejících se ve třech genech dráhy metabolismu testosteronu, u kterých se předpokládá možná souvislost s tímto onemocněním. Na základě výsledků provedených na 237 pacientech a 229 mužích bez karcinomu prostaty byl nalezen SNP v genu SRD5A2, který má statisticky významný rozdíl poměrů jednotlivých alel u mužů s karcinomem oproti kontrolní skupině. Je to tedy kandidátní marker pro odhad vrozené predispozice ke karcinomu prostaty.

7) Genetic variations in epidermal growth factor receptor gene (EGFR) and their role in prediction of response to gefitinib therapy in non-small cell lung cancer. ⁷

V této práci je ukázána souvislost přítomnosti somatických mutací (jednonukleotidových substitucí a malých delecí) v genu EGFR s odpovědí pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic na biologickou léčbu založenou na inhibici tyrozin-kinázové aktivity. Metodou sekvenování byla provedena vyšetření mutací v exonech 18 - 21, které kódují část tyrozin-kinázové domény proteinu Egfr. Pro analýzy byly použity zejména archivované preparáty typu parafínových bločků a mikroskopických sklíček s buněčnými nátěry. Výsledky práce podporují dosavadní poznatky několika ostatních výzkumných

týmů hovořící o prognostickém významu mutací v genu EGFR při odpovědi na biologickou léčbu a to zejména u žen s adenokarcinomem.

8) 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. ⁸

Poslední z předkládaných článků ukazuje využití analýzy molekulárních markerů při určení diagnózy karcinomu pankreatu. Pomocí biopsie tenkou jehlou byly získány vzorky tkáně pankreatu, u kterých pak byla kombinací cytologického a molekulárně-biologického vyšetření rozlišena diagnóza karcinomu pankreatu nebo chronické pankreatitidy. Následně byla tato diagnóza ověřena histologicky nebo sledováním dalšího vývoje onemocnění. Pro molekulárně-biologické vyšetření byly využity markery nacházející se v genech KRAS, TP53, SMAD4 a CDKN2A. Ukázalo se, že zařazení molekulárně-biologického vyšetření vedle cytologického zvyšuje správnost určení diagnózy. Toho je mimo jiné docíleno použitím vysoce citlivé metody CGCE v kombinaci s laserovou mikrodisekcí.

3 Literární přehled

3.1 Nádorová onemocnění

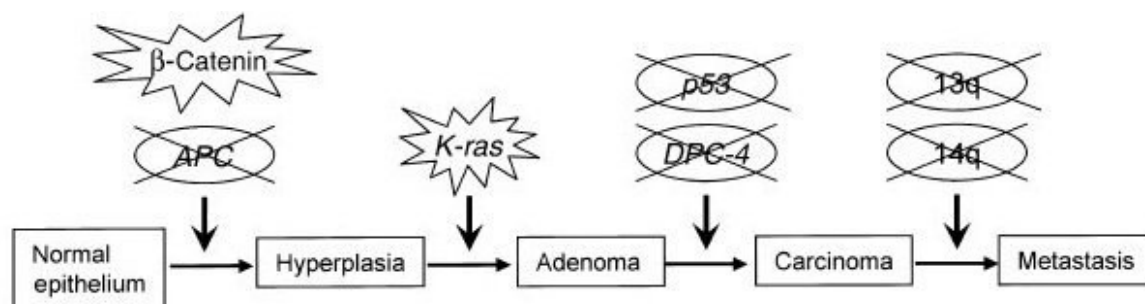
3.1.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom je civilizační onemocnění s nejvyšším výskytem ve vyspělých státech. V České republice je to druhý nejčastější karcinom u obou pohlaví. V roce 2003 bylo v ČR diagnostikováno 4 568 případů u mužů a 3 306 případů u žen⁹. Jedná se o onemocnění středního a vyššího věku, až 90 % případů kolorektálního karcinomu je diagnostikováno po padesátém roce života, což vyplývá z etiologie, kde vedle genetické predispozice jsou rizikovými faktory především strava (bohatá na tuky, proteiny a červené maso a chudá na vlákninu), kouření a karcinogenní látky z prostředí. Hlavní příčinou vysoké úmrtnosti je skutečnost, že téměř polovina nádorů je diagnostikována v pokročilém stadiu díky absenci subjektivních potíží u časného stádia tohoto onemocnění¹⁰.

Až u 75% případů kolorektálního karcinomu jde o sporadickou formu, u které není patrná žádná predispoziční etiologie. Zbýlých 25% vzniká na základě vrozené predispozice - tzv. familiární forma (24%) nebo chronického zánětu střev (1%). Většina případů familiární formy je však neznámé genetické etiologie a pouze jednu čtvrtinu případů tvoří dva dobře popsané genetické syndromy: hereditární nepolypózní kolorektální karcinom - HNPCC (5%) a familiární adenomatózní polypóza - FAP (1%). Za vznik FAP je zodpovědná přítomnost zárodečných mutací v genu APC, zatímco u HNPCC je to přítomnost zárodečných mutací v tzv. mutátorových genech (MMR - mismatch repair genes).

U sporadické formy kolorektálního karcinomu dochází k hromadění více mutací v buňkách nádoru a to především v genech APC, KRAS, DCC a TP53¹¹. Tento karcinom vzniká z původně nezhoubného polypu (adenomu) a transformace v maligní karcinom může trvat i několik let. Vývojová stádia karcinomu jsou určena patologickým gradingem, který vychází z morfologického popisu stupně displasie, celková progrese onemocnění pak klinickým stagingem. Na molekulární úrovni proces vývoje popisuje klasický tzv. Vogelsteinův model, podle kterého dochází během transformace k postupnému hromadění mutací a rozsáhlých delecí v tumor supresorových genech a protoonkogenech, kde v časně

vývojové fázi se vyskytují mutace v genu APC, pak v genu KRAS, dále dochází k mutacím a následně rozsáhlým delecím v genu DCC a nakonec, ve fázi pokročilého karcinomu, lze detekovat mutace a genové delece v genu TP53¹² (Obr. 1).



Obr. 1 Molekulární model kolorektální karcinogeneze¹³

Existují práce, které ukazují, že typy molekulárních změn, které probíhají v kolorektální nádorové tkáni, mohou mít souvislost s prognózou vývoje onemocnění¹⁴⁻¹⁷, v některých případech byla vysledována i souvislost s odpovědí na cytostatickou léčbu¹⁸.

Z výše uvedeného vyplývá, že vyšetření vybraných molekulárních markerů může zpřesnit molekulární charakterizaci nádoru a na základě toho odhadnout prognózu a pomoci při cílené volbě jeho léčby.

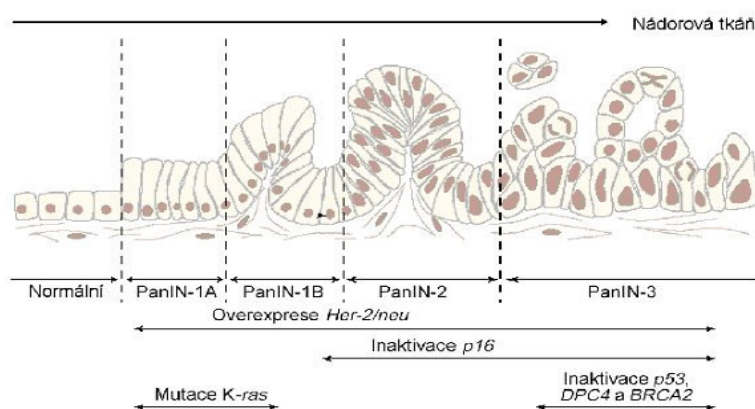
3.1.2 Karcinom pankreatu

Karcinom pankreatu je onemocnění, jež vzhledem ke své rostoucí incidenci představuje závažný medicínský problém. Pankreatické léze jsou díky malé velikosti těžko detekovatelné a již ve velmi časných stádiích mají potenciál šíření nádorových buněk a zakládání vzdálených mikrometastáz. Onemocnění proto vykazuje vysokou mortalitu, průměrná doba přežití od stanovení diagnózy se udává 3–6 měsíců a pravděpodobnost pětiletého přežití je pouze 0,4–2,0%. V západním světě je pátou nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění (např. v USA je čtvrtým nejčastějším nádorovým onemocněním u obou pohlaví)¹⁹. V České republice byla jeho incidence v roce 2003 udávána 876 případů u mužů, u žen to bylo přibližně třikrát méně a ČR tak zaujímá přední místo ve světových statistikách⁹.

Etiologie karcinomu pankreatu je neznámá, byly identifikovány jen některé rizikové faktory, jako např. kouření, nadměrné užívání alkoholu, vysokoenergetická strava

bohatá na tuky nebo řada hereditárních syndromů. Současný výzkum přinesl důkazy, že jedním z významných rizikových faktorů pro vznik karcinomu pankreatu je chronická pankreatitida. Dědičné i sporadické formy chronické pankreatitidy jsou spojeny s proliferací a genetickou alterací pankreatických buněk, a tím i se zvýšeným rizikem maligního zvratu ²⁰. Navíc mediátory zánětlivých pochodů mohou indukovat genetické změny, buněčné dělení a inhibici apoptózy. Z tkáně karcinomu pankreatu byly izolovány některé takové mediátory, jako např. cytokiny (TNFalfa, IL6, IL8 a IFNG) a transkripční faktory (nukleární faktor kappa B) ²¹. Zároveň byla popsána zvýšená exprese isoformy cyklooxygenázy COX2 účastnící se produkce prozánětlivých prostaglandinů ²².

Nejnovější medicínské poznatky ukazují na spojitost mezi tímto karcinomem a výskytem mutací v genech, řazených do skupiny onkogenů a tumor supresorových genů. Rozvoj karcinomu pankreatu tak představuje několikastupňový proces charakterizovaný postupnou akumulací genetických změn v DNA buněk slinivky, které byly s rostoucí četností identifikovány v terénu „zdravé“ pankreatické tkáně, chronické pankreatitidy, dále všech morfologických stupňů charakterizovaných tzv. pankreatickou intraepiteliální neoplasí (PanIN) ²³ a karcinomu. Nejčastěji jsou v této souvislosti uváděny mutace v genech KRAS, TP53, CDKN2A (s proteinovým produktem p16INK4A - viz dále) a delece genu SMAD4. K těmto genům lze dále přiřadit BRCA2, jehož mutace jsou popisovány v 7–10% sporadických forem. V úvodní fázi buněčné proliferace PanIN1-A a PanIN1-B dochází ke vzniku mutantních forem onkogenu KRAS při současné aktivaci a zvýšené expresi protoonkogenu HER2. Střední fáze karcinogeneze (PanIN-2) je charakterizována inaktivací tumor supresoru CDKN2A. Vznik infiltrujícího nádoru je doprovázen současnou inaktivací dalších tumor supresorů jako je TP53, DPC4 a BRCA2 ²⁴ (Obr. 2).



Obr. 2 Molekulárně-morfologický model karcinogeneze pankreatu ²⁵

Hlavním důvodem špatné prognózy tohoto onemocnění je pozdní diagnóza v pokročilém stádiu onemocnění. Odhalení premaligních stavů odpovídajících časným

stadiům PanIN-1A a PanIN-1B je klíčové pro chirurgickou léčbu, která v současné době zůstává základní léčebnou možností tohoto onemocnění. Moderní diagnostické postupy pro zjištění morfologického stavu pankreatické tkáně zahrnují kombinaci histologického a cytologického vyšetření vzorků získaných náběry pankreatické šťávy, kartáčovým stíráním hlavního pankreatického vývodu či endoskopicky naváděnou aspirační biopsií tenkou jehlou²⁶. U těchto vyšetření však výsledek nebývá vždy spolehlivý a jednoznačný. Některé práce proto demonstrují zvýšení citlivosti této metody zařazením vyšetření molekulárních markerů charakteristických pro jednotlivá stadia vývoje karcinomu²⁷. To by mohl být nadějný směr pro zlepšení diagnostiky a záchyt časných stádií karcinomu pankreatu.

3.1.3 Karcinom plic

Plicní karcinom je závažnou civilizační chorobou s nepříznivou prognózou a vysokou mortalitou. Každým rokem je na světě diagnostikováno asi 1,2 milionů nových případů a i přes nesporné pokroky v léčbě na tuto nemoc ročně zemře asi 1,1 milionů obyvatel²⁸. Incidence v ČR u mužů, kde představuje nejčastější nádorové onemocnění, v posledních letech mírně klesá, v roce 2003 to bylo 4 589. U žen je toto onemocnění na čtvrtém místě, ale jeho incidence se stále zvyšuje, v roce 2003 dosahovala 1 397⁹. I přes vývoj nových léků a léčebných kombinací zůstává prognóza pacientů s tímto onemocněním velmi špatná, medián přežití pokročilých stádií od stanovení diagnózy je pouze cca 6 měsíců, pravděpodobnost 5-letého přežití je 3,5%. Mortalita tím prakticky dosahuje úrovně incidence. Primárním rizikovým faktorem je aktivní i pasivní kouření, v menší míře se podílejí i další faktory, jako je expozice chemickým karcinogenům a radioaktivitě²⁸.

Hlavním typem je nemalobuněčný karcinom plic představující přibližně 80% všech plicních karcinomů. Mutace detekované v tomto typu nádoru se nacházejí především v genech EGFR, HER2, KRAS, TP53²⁹ a nedávné studie ukázaly jejich význam v predikci odpovědi na biologickou a chemickou léčbu nebo v odhadu prognózy onemocnění. Především přítomnost genových mutací a amplifikací EGFR se ukazuje být významným prediktorem při odpovědi na léčbu biologickými preparáty fungujícími jako inhibitory tyrozin kinázové aktivity³⁰⁻³². V souvislosti s odpovědí na různé typy chemoterapeutik, především v kombinaci s platinovými preparáty, se u plicního karcinomu ukázalo být nadějně také vyšetření některých jednonukleotidových polymorfismů nacházejících se

v genech hrajících roli při opravě poškozené DNA (ERCC1, ERCC2, XRCC1 a XRCC3)³³⁻³⁵, mnohočetné lékové rezistenci (MDR1)³⁶ či kontrole buněčného cyklu (CCND1)³⁷.

3.1.4 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty je na druhém místě v incidenci nádorových onemocnění u mužů. Ve státech Evropské unie je ročně diagnostikováno 85 000 nových případů³⁸. Incidence v ČR v roce 2003 byla 3 728 mužů, mortalita 2,3x nižší⁹. V porovnání se situací v jiných zemích je takzvaný index mortality/incidence v ČR jedním z nejhorších³⁸ (Obr. 3). Mezi nejdůležitější faktory této kritické situace patří skutečnost, že průvodní příznaky onemocnění jsou často podceňovány a tak stále značná část případů je odhalena až v pokročilém stádiu³⁹.

<i>incidence (na 100 000 osob)</i>	<i>mortalita (na 100 000 osob)</i>	<i>index mortalita/incidence</i>
Svýcarsko	Svýcarsko	Kuba
Spojené Státy Americké	Norsko	Slovensko
Švédsko	Švédsko	Dánsko
Nový Zéland	Dánsko	Chorvatsko
Finsko	Belgie	Maďarsko
Norsko	Portugalsko	Slovensko
Belgie	Kuba	Polsko
Rakousko	Francie	Chile
Kanada	Velká Británie	Argentina
Island	Rakousko	Česká republika
Austrálie	Island	Recko
Německo	Nizozemsko	Portugalsko
Francie	Finsko	Španělsko
Velká Británie	Německo	Norsko
Lucembursko	Španělsko	Irsko
Nizozemsko	Nový Zéland	Velká Británie
Itálie	Maďarsko	Nizozemsko
Portugalsko	Slovensko	Francie
Irsko	Austrálie	Švýcarsko
Dánsko	Irsko	Itálie
Španělsko	Česká republika	Izrael
Česká republika	Itálie	Brazílie
Recko	Lucembursko	Belgie
Maďarsko	Kanada	Island
Izrael	Recko	Švédsko
Slovensko	Spojené Státy Americké	Lucembursko
Argentina	Chorvatsko	Německo
Chorvatsko	Slovensko	Rakousko
Slovensko	Argentina	Austrálie
Kuba	Chile	Kanada
Brazílie	Polsko	Finsko
Chile	Izrael	Nový Zéland
Polsko	Brazílie	Spojené Státy Americké

Obr. 3 Incidence a mortalita karcinomu prostaty ve vybraných státech

Etiologie nádoru prostaty vykazuje závislost na celé řadě faktorů. Mezi hlavními jsou rasa, věk a rodinná historie tohoto onemocnění. Je dokázáno, že zatímco afro-americká populace vykazuje téměř dvakrát vyšší incidenci ve srovnání s evropskou populací, nejnižší výskyt je u Asiatů. Uvedené rasové předpoklady mohou naznačovat genetické predispozice, avšak lze je také interpretovat jako působení vnějších karcinogenních látek podle geografické lokace nebo rozdíly volby medicínských postupů.

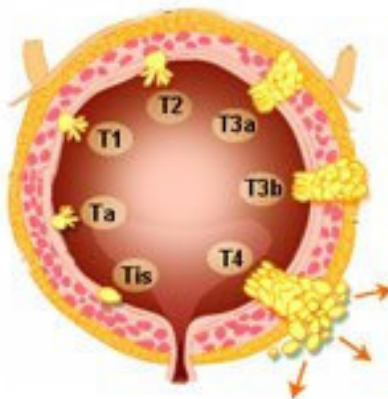
Tradičně se toto onemocnění považuje za onemocnění vyššího věku - nad 70 let, i když růst incidence je v posledních desetiletích patrný i ve věkových skupinách nižších (40-70 let). Závislost na věku naznačuje významnost dlouhé exponovanosti endogenními (hormony) nebo exogenními faktory (vnější karcinogeny). Poslední významný faktor tohoto onemocnění – rodinná anamnéza ukazuje na genetickou predispozici. Nedávné studie teorii existence těchto genetických predispozic jednoznačně podporují. Dalšími rizikovými faktory je strava s vysokým obsahem tuků, zvýšená fyzická námaha a zvýšená sexualita spojená s promiskuitou, která zvyšuje pravděpodobnost získání pohlavně přenosných virových infekcí ³⁹⁻⁴¹.

Je známo, že růst prostatických buněk závisí na hladině aktivního testosteronu. Z nedávných studií vyplývá, že dlouhodobá expozice testosteronu způsobuje predispozici ke vzniku nádoru prostaty. Ve shodě s touto hypotézou je i to, že se nádor objevuje především ve vyšším věku a že toto onemocnění nepostihuje muže kastrované v mladém věku. Z tohoto důvodu jsou geny mající roli při metabolismu testosteronu jako například SRD5A2, CYP17, CYP3A4 a gen pro androgenní receptor (AR) potenciálními kandidáty při sledování molekulárně-genetického mechanismu růstu nádorových buněk prostaty. V těchto genech byly již dříve identifikovány mutace a polymorfismy a u některých z nich byla objevena souvislost s prognosticky nepříznivým klinickým průběhem onemocnění či se zvýšenou incidencí karcinomu prostaty ^{42,43}. Vyšetření vhodné kombinace polymorfismů umožňující identifikovat jedince se zvýšeným rizikem výskytu karcinomu prostaty a jejich zařazení do preventivních dispenzárních programů by tak mohlo být nadějí na časnější záchyt tohoto onemocnění.

3.1.5 Karcinom močového měchýře

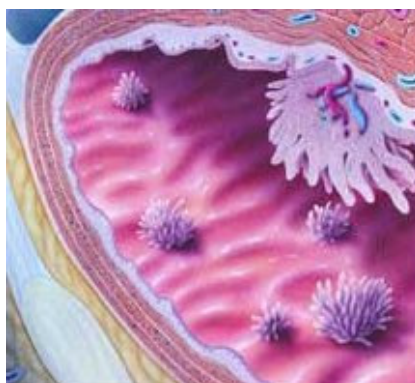
Karcinom močového měchýře je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním genitourinárního traktu s výskytem u mužů přibližně 2,5x vyšším než u žen. Maximum výskytu je u jedinců ve věku 60-80 let ⁴⁴. V České republice bylo v roce 2003 toto onemocnění diagnostikováno u 1 646 mužů ⁹. Hlavními rizikovými faktory pro vznik karcinomu močového měchýře je kouření, působení karcinogenních látek, chronické infekce, močové kameny, ozáření pánve a v přibližně deseti procentech genetické vlivy ⁴⁴.

Histologicky se jedná v 90% o nádor z buněk přechodného epitelu (transitional cell carcinoma - TCC) pocházející z urotelia a z toho více než 80% jsou povrchové neboli superficiální tumory (klasifikované jako Ta, T1 nebo Tis) (Obr. 4).



Obr. 4 Vývojová stadia karcinomu močového měchýře ⁴⁵

U přibližně 70% pacientů s neinvazivním TCC dojde po transuretrální resekci k rekurenci a 10-20% progreduje do svalové invaze ⁴⁶. U téměř 30% všech pacientů je diagnostikován paralelní výskyt několika oddělených tumorů nacházejících se v různých částech stěny močového měchýře (Obr. 5). Tento paralelní vývoj mnohočetného superficiálního TCC vyvolává otázku klonality těchto tumorů, pro kterou existují dvě teorie. První, tzv. teorie monoklonality, předpokládá vznik z jediné maligní buňky, jejíž dceřiné buňky proliferují a poté, co se uvolní z primárního tumoru, se šíří do ostatních částí močového měchýře a zakládají další nádory. Naopak druhá teorie uvažující model kancerizace předpokládá nezávislou transformaci několika uroteliálních buněk na různých místech sliznice měchýře jakožto výsledek akumulace karcinogenních látek vedoucí k růstu mnohočetných nezávislých tumorů ⁴⁷.



Obr. 5 Mnohočetný karcinom močového měchýře ⁴⁸

Určení klonality nádorů a jejich charakterizace na molekulární úrovni může pomoci při dispenzarizaci pacientů po chirurgické léčbě karcinomu močového měchýře a přispět k časnému odhalení rekurence onemocnění. Pro určení této klonality je nutná analýza jejich DNA profilů, například na bázi mikrosatelitních markerů. Dosud bylo popsáno několik molekulárně-genetických změn charakteristických pro tento karcinom, především mutace a rozsáhlé delece v oblasti genů TP53 a CDKN2A.

3.2 Nádorové onemocnění na molekulární úrovni

3.2.1 Molekulární původ nádorového bujení

Nádorové bujení je genetické onemocnění. Vzniká díky přítomnosti DNA mutací v genech, které kódují proteinové produkty, jejichž ztráta funkce nebo naopak permanentní aktivace, dává buňce růstovou výhodu a vede k nekontrolovatelné proliferaci. Nejprve dojde k náhodnému vzniku mutace, která buňce umožní proliferaci bez nutnosti stimulace růstovými faktory. Poté se přidávají další mutace, které mají za následek další, masivnější proliferaci, růst nádoru, jeho invazi do okolní tkáně, krevního a lymfatického oběhu a posléze i tvorbu vzdálených metastáz. Mutace hrající roli při nádorové transformaci často postihují geny kódující růstové faktory, receptory růstových faktorů, proteiny signálních drah, kontrolních bodů buněčného cyklu, buněčné diferenciaci, cytoskeletu, angiogeneze, apoptózy a reparace DNA. Většinu těchto genů můžeme zahrnout do dvou skupin - protoonkogeny a tumor supresorové geny.

Protoonkogeny kódují proteiny, které pozitivně regulují buněčný růst a dělení, například jako růstové faktory nebo jejich receptory, proteiny signálních kaskád, cykliny a cyklin-dependentní kinázy, transkripční faktory a inhibitory apoptózy. Mutované formy těchto genů nacházející se v nádorových buňkách jsou označovány jako onkogeny. Jejich proteinové produkty jsou permanentně aktivovány a díky tomu dochází k nekontrolované buněčné proliferaci. Jde o dominantní mutaci, takže stačí její přítomnost pouze na jedné alele protoonkogenu. Mezi protoonkogeny patří například geny KRAS, HER2, EGFR nebo MYC. Nejčastějším typem DNA mutací u protoonkogenů jsou bodové mutace, delece a genové přestavby, časté jsou i genové amplifikace.

Tumor supresorové geny kódují proteiny, které působí proti buněčné proliferaci. Jedná se zejména o geny kódující inhibitory v signálních drahách, negativní transkripční

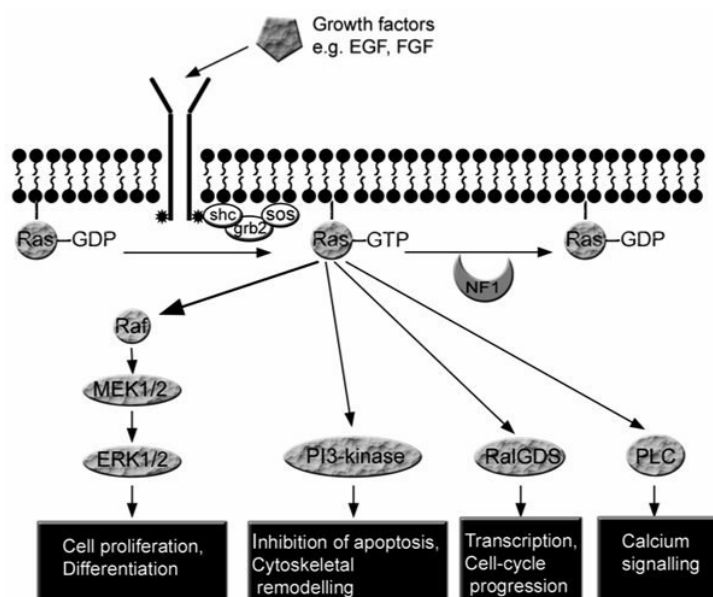
faktory, aktivátory apoptózy nebo proteiny účastníci se opravy DNA. Pro maligní transformaci buněk je zapotřebí poškození obou alel genu (tzv. dvojitý zásah), aby došlo ke ztrátě funkce příslušného proteinu. Zpravidla to bývá bodová mutace na jedné alele genu jako první zásah a následná bodová mutace na druhé alele nebo její úplná ztráta jako druhý zásah. Dalším mechanismem, který může vést k inaktivaci genu je hypermetylace. Zástupci tumor supresorových genů jsou například TP53, RB1, APC, DCC, SMAD4, BRCA1, BRCA2 nebo CDKN2A ⁴⁹.

3.2.2 Protoonkogeny analyzované v této práci

3.2.2.1 Gen *KRAS*

Gen *KRAS* leží v oblasti chromozómu 12p12.1, jeho délka je přibližně 45 kbp a obsahuje 6 exonů. Jeho produktem je Ras neboli p21 protein o velikosti 189 aminokyselin. Jde o malý GTP-vazebný protein lokalizovaný na vnitřní straně plazmatické membrány, který přenáší prostřednictvím transdukčních drah do jádra signály stimulující buněčný růst nebo inhibující apoptózu. Tento protein se vyskytuje ve dvou stavech - v inaktivním stavu ve vazbě s GDP a v aktivním stavu ve vazbě s GTP. Ve fyziologických podmínkách je Ras v inaktivním stavu, což zajišťují GAPs proteiny (GTPase Activating Proteins) indukující GTP hydrolýzu a tvorbu inaktivního komplexu Ras/GDP (například neurofibromin 1) ^{50,51}.

Aktivace Ras proteinu nastává působením extracelulárních signálů (např. růstových faktorů, cytokinů nebo signálů pro adhezi) prostřednictvím specifických povrchových receptorů. Po navázání signální molekuly na receptor dojde k jeho autofosforylaci, dimerizaci a následné vazbě dalších proteinů (například Shc1 a Grb2) včetně některého ze specifických GEFs proteinů (Guanine Exchange Factors) jako je Sos protein, který se následně váže na Ras a indukuje jeho konformační změnu vedoucí k uvolnění GDP, vazbě GTP a tedy přechodu Ras do aktivního stavu. Ten pak, v závislosti na specifickém GEF proteinu, zahajuje některou z transdukčních drah Ras/Raf, Ras/PI3-K, Ras/Ral nebo Ras/PLC ^{52,53} (Obr. 6).



Obr. 6 Signální dráhy Ras proteinu ⁵³

Mutace v KRAS genu detekované v nádorových buňkách způsobují permanentní aktivaci proteinu a to díky znemožnění hydrolýzy GTP navázaného na Ras. Narozdíl od přirozeně aktivovaného Ras proteinu, který je v krátké době opět inaktivován, zůstává mutovaná forma aktivována permanentně, což vede k rozsáhlé interakci s různými efekty. Tím se role mutovaného Ras proteinu stává v postižených buňkách mnohem komplexnější a kvantitativně rozdílná než funkce Ras ve zdravých buňkách a umožňuje nekontrolovaný růst a nádorovou transformaci ⁵². Ve většině případů jde o jednonukleotidové mutace v kodonech 12 a 13 (exon 1), výjimečně v kodonu 61 (exon 2). Bylo ukázáno, že konkrétní typ a pozice mutace v kodonech 12 a 13 může mít vliv na prognózu, průběh onemocnění nebo odpověď na léčbu ⁵⁴⁻⁵⁷. Mutační oblast exonu 1 je také častým cílem účinku nové generace léčiv na bázi genové terapie ⁵⁸.

Z uvedených publikací jsme se zaměřili na detekci mutací KRAS genu ve tkáni rekta a tlustého střeva a slinivky.

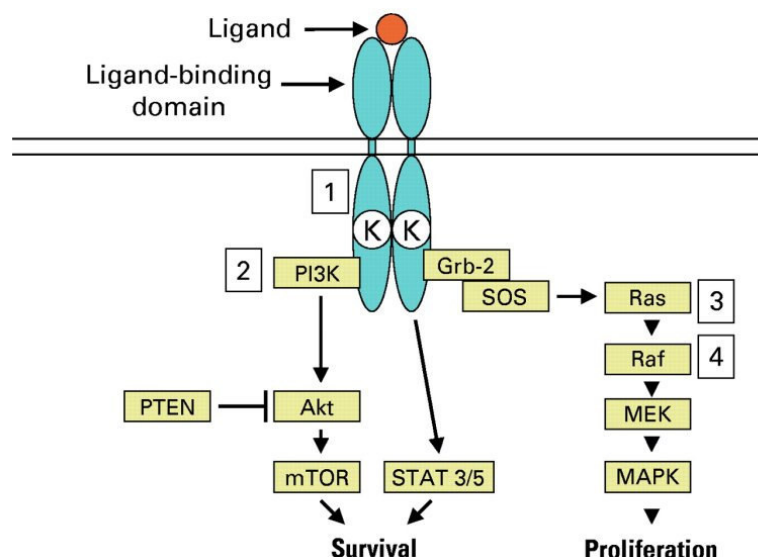
3.2.2.2 Gen EGFR

Gen EGFR je lokalizován do oblasti chromozomu 7p12, skládá se z 28 exonů a je dlouhý přibližně 188 kbp ⁵⁹. Jeho proteinový produkt je receptor pro epidermální růstový faktor (Egfr, Her1 nebo ErbB1) jehož hlavní funkcí je stimulace buněčné proliferace,

diferenciace, přežívání, angiogeneze a migrace⁶⁰. Egfr patří do ErbB rodiny spolu s Her2 (ErbB2), Her3 (ErbB3) a Her4 (ErbB4)⁶¹. Jsou to membránově vázané receptory, které se řadí mezi tyrozin kinázy I. Egfr je syntetizován z 1210 aminokyselin dlouhého prekurzoru štěpením na N-konci. Konečný produkt má délku 1186 aminokyselin a jeho lokalizace je v buněčné membráně⁶². Tento glykoprotein se skládá ze tří částí: extracelulární (dochází zde k vazbě ligandu) transmembránové a intracelulární (s tyrozin kinázovou aktivitou). Extracelulární část má čtyři domény - I (aminokyseliny 1-165), II (aminokyseliny 166-309), III (aminokyseliny 310-481) a IV (aminokyseliny 482-621). Domény I a III mají 37% homologii, jsou chudé na cystein a obsahují místo pro vazbu ligandu (váže se na doménu III). Cystein-bohaté domény II a IV obsahují N-glykosylační místa a disulfidové vazby, které zajišťují terciární strukturu externí části molekuly^{63,64}. Velká smyčka, která vystupuje ze zadní části domény II, umožňuje kontakt s příslušnou doménou na druhém receptoru a zajišťuje tak tvorbu dimeru mezi dvěma molekulami Egfr nebo heterodimeru mezi molekulou Egfr a jinou molekulou z rodiny ErbB receptoru (např. Her2) po vazbě ligandu^{65,66}. Intracelulární doména obsahuje na svém C-konci oblast s několika autofosforylačními místy s tyrozinové zbytky, které mohou být fosforylovány, čímž dochází ke spuštění Egfr signální dráhy. Také se zde vyskytuje několik serin/threoninových zbytků, u nichž se předpokládá, že jsou důležité pro downregulační procesy a dále sekvence, které nejspíš hrají roli v endocytóze^{61,66}.

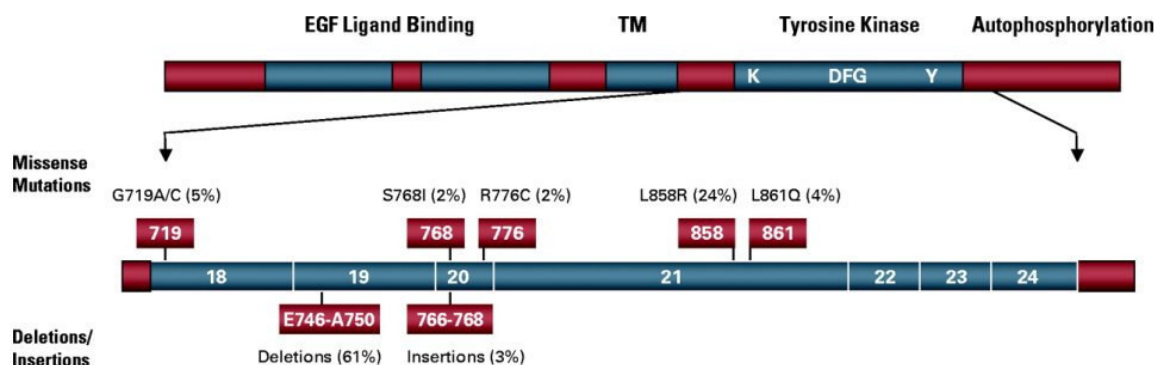
Egfr je důležitým proteinem pro udržování normální buněčné funkce a pro přežití. Při deregulaci Egfr signální dráhy dochází k vývoji maligního procesu v důsledku aktivace buněčného cyklu, inhibice apoptózy, indukce angiogeneze, pohybu nádorových buněk a metastazování⁶⁷.

Aktivace Egfr nastává po navázání ligandu na extracelulární část proteinu. Po vazbě ligandu receptor vytváří homo nebo heterodimer s dalším receptorem z rodiny ErbB, pak následuje autofosforylace receptoru přenesením fosfátu z ATP a nakonec dochází fosforylací některého z adaptérových proteinů jako je například Sos a Grb2 aktivující Ras protein ke spuštění signální kaskády. Hlavní kinázy účastníci se tohoto procesu jsou mitogenně-aktivované protein kinázy (MAPK) a fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K). Existuje několik ligandů, které vykazují vysokou afinitu k Egfr. Hlavní z nich je epidermální růstový faktor (EGF) a transformující růstový faktor alfa (TGF)^{68,69} (Obr. 7).



Obr. 7 Signální dráhy Egfr proteinu ⁷⁰

Mutace, které se vyskytují v nádorových buňkách, jsou lokalizovány v exonech 18 - 21 genu EGFR, což je oblast kódující tyrozin kinázovou doménu, kde dochází k vazbě ATP. Jde o tři typy mutací - missense mutace měnící aminokyseliny v exonech 18 a 21, několikanukleotidové delece v exonu 19 a malé inserce v exonu 21, přičemž téměř 90% těchto mutací představují delece v exonu 19 a substituce L858R v exonu 21 (Obr. 8).



Obr. 8 Struktura genu EGFR a mutace v tyrozin kinázové oblasti ⁷¹

V nedávné době bylo provedeno několik studií ukazujících, že inhibitory tyrozin kináz (TKI), které se vážou na ATP vazebné místo a tím zabraňují aktivaci receptoru, mají významně vyšší účinek u pacientů s mutacemi v EGFR genu. Předpokládá se, že mutace v tyrozin kinázové oblasti mají za následek změnu konformace vedoucí na jedné straně ke zvýšené aktivitě proteinu a na druhé straně k jeho vyšší citlivosti na TKI ³⁰⁻³². Dalšími

genetickými změnami v EGFR detekovanými v nádorových buňkách jsou genové amplifikace a rozsáhlá delece exonů 2-7 (+EGFRvIII)⁷².

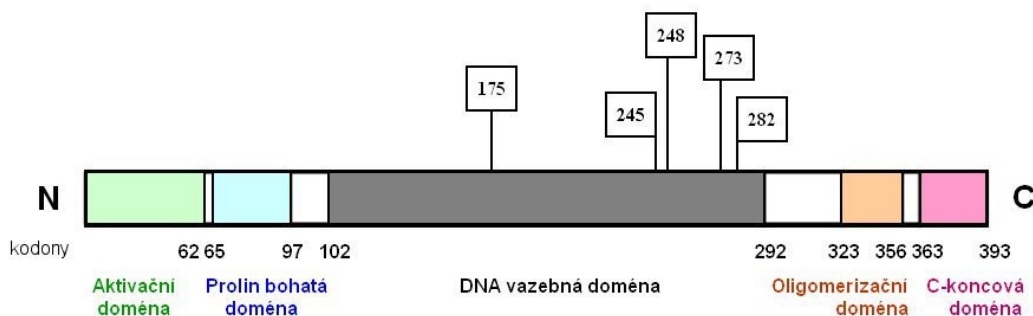
Mutace v genu EGFR jsme analyzovali v projektu nemalobuněčného karcinomu plic.

3.2.3 Tumor supresorové geny analyzované v této práci

3.2.3.1 Gen TP53

Gen TP53 leží v oblasti chromozómu 17p13.1 a je dlouhý 20 kbp. Skládá se z 11 exonů, přičemž první z nich je nekódující. Přestože obsahuje několik potenciálních vazebných míst pro transkripční faktory jako je Sp1, NF-kappaB nebo c-Jun, gen TP53 je exprimován konstitutivně a regulace hladiny proteinu se odehrává na posttranskripční úrovni⁷³.

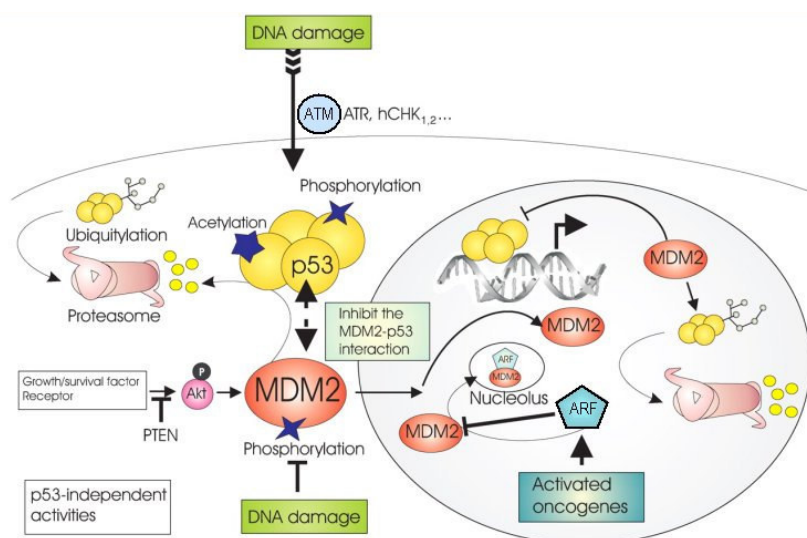
Produktem genu TP53 je jaderný fosfoprotein p53. Skládá se z 393 aminokyselin a obsahuje 5 strukturních a funkčních domén: N-terminální transaktivační doménu, prolin-bohatou regulační doménu, sekvenčně specifickou DNA-vazebnou doménu, oligomerizační doménu a C-terminální doménu hrající roli při regulaci vazby na DNA⁷⁴ (Obr. 9).



Obr. 9 Struktura p53 proteinu s vyznačením kodonů s nejčastějším mutačním postižením

V prostorové struktuře je DNA-vazebná doména tvořena lešením z beta listů podpírající flexibilní smyčky a helixy, které jsou v přímém kontaktu s DNA⁷⁵. Pozice těchto smyček a helixů je stabilizovaná atomy zinku. Ve většině buněk se p53 vyskytuje v téměř nedetekovatelné hladině v důsledku silné ubiquitinace a degradace v proteasomech. Hlavní faktor zodpovědný za tuto permanentní nestabilitu p53 je protein Mdm2, který se váže na krátkou doménu na N-konci proteinu p53. Po navázání plní Mdm2 tři funkce: za

prvé, slouží jako exportér p53 z jádra, kde je jeho primární lokalizace, do cytoplazmy. Za druhé, vazbou na transkripčně aktivační doménu ji zakrývá a zabraňuje tak transaktivaci p53 dependentních genů. Za třetí, slouží jako E3-ubikvitin ligáza, která indukuje kovalentní vazbu ubikvitinu na několik lysinů na C-konci a zahajuje tak degradaci p53 v proteasomech. MDM2 gen je sám transkripčním cílem p53, takže se jedná o autoregulaci, kdy se při aktivaci p53 protein Mdm2 akumuluje a účastní se navrácení množství p53 na základní hladinu ⁷⁶ (Obr. 10).



Obr. 10 Regulace aktivity p53 proteinu ⁷⁶

p53 má velmi speciální roli v kontrole buněčné proliferace. Reguluje transkripci mnoha různých genů účastnících se zastavení buněčného cyklu, apoptózy, opravy DNA, stárnutí a angiogeneze. Navíc tvoří různé proteinové komplexy, které bývají součástí komplexů regulujících DNA transkripci, replikaci a opravu. p53 tedy jedním z centrálních proteinů signálních drah spojujících odpověď na stres s regulací buněčného růstu. V p53 deficitních buňkách dochází k proliferaci i v takových podmínkách, při kterých normální buňky zastavují růst nebo vstupují do apoptózy, aby zabránily přenosu poškozeného genomu a zvyšuje se tak pravděpodobnost vzniku další genetické změny během procesu kancerogeneze ⁷⁷.

Aktivaci p53 mohou vyvolat různé druhy genotoxických i negenotoxických stresů zahrnující látky vyvolávající jedno nebo dvouvláknové zlomy v DNA (gamma záření, UV světlo, volné radikály a inhibitory topoizomeráz), mutageny způsobující tvorbu DNA aduktů (aflatoxiny, benzo(a)pyreny a alkylační činidla) nebo látky, které blokují elongaci

RNA polymerázou. Dalšími faktory, které indukují p53 jsou poškození mitotického vřeténka, vyčerpání ribonukleotidů, hypoxie, teplotní šok a působení oxidu dusnatého. Protein p53 obsahuje mnoho fosforylačních míst pro kinázy účastnící se stresové a růstové signalizace a míst pro acetylaci histon acetyl transferázami. Různé modifikace těchto míst v závislosti na jednotlivých signálech indukují uvolnění p53 z kontroly proteinem Mdm2 a následnou akumulaci p53 v jádře. Dvě hlavní cesty vedoucí k aktivaci p53 je dráha zahrnující ATM kinázu, která fosforyluje p53 při poškození DNA a znemožňuje tak vazbu Mdm2 na p53 a dráha zahrnující protein p14ARF, který je aktivován v odpovědi na růstový podnět při onkogenním stresu a v jádře se váže na Mdm2 čímž umožňuje uvolnění p53⁷⁷ (Obr. 10).

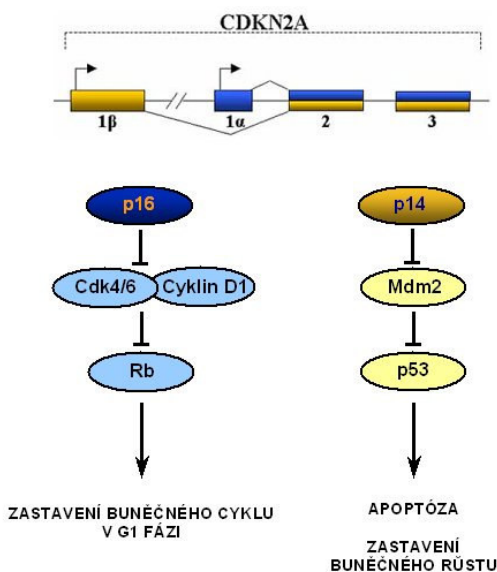
Aktivovaný p53 spouští řadu buněčných pochodů přes dvě oddělené paralelní dráhy - transkripčně nezávislou a transkripčně závislou. Příkladem transkripčně nezávislé dráhy je dráha, kde dochází k vazbě p53 na komponenty replikačně-reparačního systému, helikázy ERCC2 a ERCC3 a replikační protein RPA. V transkripčně závislých drahách reguluje p53 proteiny buněčného cyklu G1 a G2 fáze, apoptózy nebo proteiny účastnící se odpovědi na buněčný stres nebo opravy DNA^{78,79}. Výběr mezi tím, zda buňka zastaví dělení nebo vstoupí do apoptózy závisí na povaze a síle indukujícího signálu a dále na typu buňky nebo tkáně. Bylo zjištěno, že oba tyto procesy mohou probíhat ve stejné tkáni, kde v buňkách s vysokým rizikem neoplastické transformace probíhá apoptóza zatímco v buňkách s menším rizikem klonální expanze dochází pouze k zastavení buněčného cyklu. Znamená to tedy, že p53 se účastní genetické a zároveň tkáňové homeostáze v odpovědi na stres⁸⁰.

Mutace v genu TP53 byly popsány téměř ve všech typech nádorů⁸¹. Většinou se jedná o missence mutace lokalizované v sekvenci kódující DNA vazebnou doménu a tedy znemožňující vazbu proteinu na DNA nebo narušující správné prostorové uspořádání proteinu. 30% těchto mutací je lokalizováno v pěti hotspot kodonech (175, 245, 248, 273 a 282). Mutovaná forma proteinu p53 se akumuluje v nádorových buňkách i ve vzdálených metastázách. Tato akumulace je umožněna zvýšenou stabilitou mutované formy p53 proteinu⁸². Vedle jednonukleotidových mutací dochází v nádorových buňkách velmi často ke ztrátě alely⁸³⁻⁸⁶.

V předložených pracích jsme analyzovali mutace nebo ztráty alely TP53 ve tkáni tlustého střeva a konečníku, slinivky a močového měchýře.

3.2.3.2 Gen CDKN2A

Gen CDKN2A se nachází v oblasti chromozomu 9p21.3, skládá se ze tří exonů a je dlouhý 6,6kbp. Kóduje dva alternativní proteinové produkty - cyklin-dependentní kinázový inhibitor p16INK4a a p53 aktivátor p14ARF, což je umožněno dvěma promotory a alternativním sestřihem, kdy je první exon spojen s druhým v různých čtecích rámcích^{87,88} (Obr. 11). Oba proteiny se účastní negativní regulace buněčného cyklu, ale pouze v případě p16INK4a byla u pacientů s karcinomem slinivky detekována ztráta funkce odpovídající genovým mutacím nebo delecím⁸⁹.



Obr. 11 Alternativní proteinové produkty genu CDKN2A a jejich signální dráhy

Protein p16INK4a nebo také p16 je dlouhý 156 aminokyselin a inhibuje cyklin-dependentní kinázy CDK4 a CDK6. Ty za normálních okolností interagují s cyklinem D a tento komplex fosforyluje Rb (retinoblastoma) protein. Fosforylace má za následek uvolnění Rb proteinu s komplexu s E2F1 (elongační faktor 1), který následně aktivuje transkripci genů potřebných pro DNA syntézu a následnou progresi buněčného cyklu. p16 tedy hraje klíčovou roli v negativní regulaci G1 kontrolního bodu buněčného cyklu⁸⁷ (Obr. 11).

Protein p14ARF nebo také p14 se skládá ze 132 aminokyselin⁹⁰. Oblast proteinu kódovaná exonem 1 obsahuje Mdm2 vazebnou doménu, zatímco funkční doména je kódovaná exonem 2. Po aktivaci (např. proteinem Ras nebo c-myc) se p14 prostřednictvím své N-koncové domény váže na protein Mdm2 a lokalizuje ho v jádře. To zabrání ubikvitinaci proteinu p53, který je v komplexu s Mdm2, a dojde tak k jeho stabilizaci a spuštění dráhy zastavující buněčný cyklus v G1/S a G2/M fázi nebo indukující apoptózu⁹¹

(Obr. 11). Některé studie ukázaly, že p14 se účastní ještě jiné p53-nezávislé dráhy vedoucí k inhibici biogeneze ribozomální RNA ⁹².

Inaktivace CDKN2A genu může být způsobena genovou mutací na jedné alele spolu se ztrátou druhé alely (karcinom slinivky), homozygotní delecí (karcinom močového měchýře a slinivky, melanomy, gliomy a další) nebo hypermetylací promotoru (kolorektální karcinom, močový měchýř a další) ⁹³.

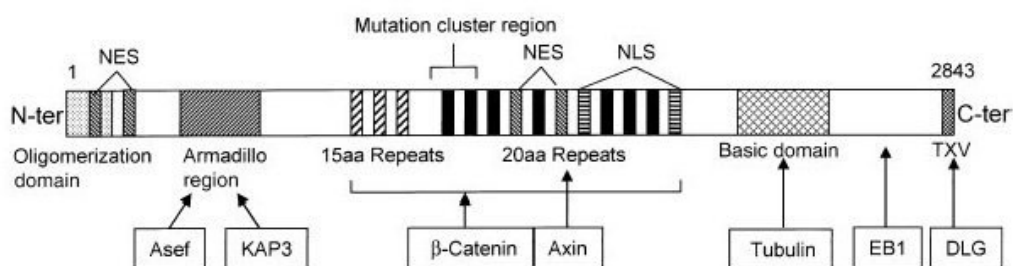
Přibližně 95% pacientů s karcinomem slinivky má mutovaný nebo deletovaný gen CDKN2A ^{94,95}, zatímco u pacientů s chronickou pankreatitidou jsou změny CDKN2A genů velmi vzácné ^{96,97}. Tyto genové inaktivace korelují se ztrátou exprese proteinu p16, zatímco exprese p14 zůstává nezměněna ⁹⁸. Ve většině případů bylo u pacientů s karcinomem slinivky s prokázanou ztrátou p16 exprese zaznamenáno nižší přežití, větší rozsah tumoru a zvýšené riziko metastázování. Ztráta p16 se zdá být poměrně časná událost v progresi karcinomu slinivky, což může být důvod, proč je p16 významným prognostickým faktorem pro přežití u pacientů s tímto onemocněním ⁹⁹.

U karcinomu močového měchýře jsou především nalézány homozygotní delece genu CDKN2A odpovídající ztrátě exprese obou proteinových produktů a hypermetylace p14 promotoru. V souvislosti se zvýšenou hypermethyací p14 promotoru byla pozorována horší prognóza onemocnění ¹⁰⁰.

V předkládaných pracích jsme v genu CDKN2A sledovali alelické ztráty u vzorků karcinomů močového měchýře a kombinaci mutací a alelických ztrát u pankreatických tkání.

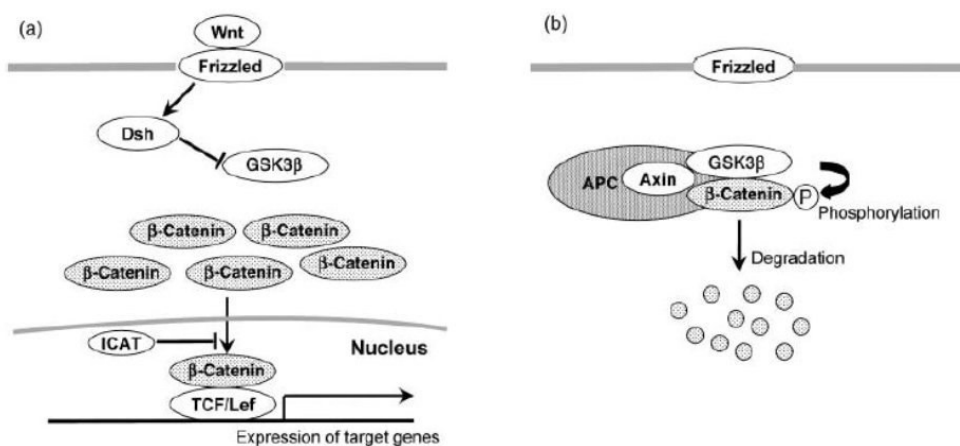
3.2.3.3 *Gen APC*

APC (adenomatous polyposis coli) gen je lokalizován v oblasti chromozomu 5q21-22 a skládá se z 15 exonů a jeho velikost je přibližně 108 kbp. Kóduje protein Apc dlouhý 2843 aminokyselin ¹⁰¹. Hlavní funkce tohoto proteinu je negativní regulace buněčného cyklu a inhibice buněčné proliferace. Mimo to hraje roli také v buněčné diferenciaci a migraci ¹³. Jeho základní lokalizace je v cytoplazmě ^{102,103}, ale ve své aminokyselinové sekvenci obsahuje také dva jaderné lokalizační signály (NLS) - aminokyseliny 1767-1772 a 2048-2053 a několik jaderných exportních signálů ^{104,105}. Dále obsahuje oligomerizační doménu, několik domén usnadňujících protein - protein interakci (včetně vazebných domén pro β -katenin, axin a tubulin) a PDZ vazebný motiv na C-konci ¹⁰⁶ (Obr. 12).



Obr. 12 Struktura proteinu Apc¹³

V buňkách se Apc váže na β -katenin, regulátor E-kadherinu^{107,108}, který má jednu z hlavních funkcí ve Wnt signální dráze důležité při embryonálním vývoji a v tumorigenezi^{109,110}. Tato dráha probíhá tak, že po navázání Wnt na receptor dojde k inhibici GSK3 β (glukóza syntáza inhibitor 3 β), což je protein, který iniciuje degradaci β -kateninu v proteazomech jeho fosforylací. Inhibicí GSK3 β je tedy β -katenin stabilizován a akumulován v cytoplazmě. Jeho přebytek je pak transportován do jádra, kde se váže na transkripční aktivátor TCF (T cell factor)/LEF (lymphoid enhancer factor) a následuje transkripce cílových genů jako je například onkogen c-myc a cyklin D1. To pak vede k progresi buněčného cyklu. Apc usnadňuje fosforylaci β -kateninu proteinem GSK3 β tím, že se ještě za pomoci axinu váže na oba tyto proteiny a vytváří multiproteinový komplex¹³. Navíc díky svému jadernému exportnímu signálu Apc lokalizovaný v jádře vyvazuje nadbytek β -kateninu, který se zde naakumuluje a transportuje ho z jádra do cytoplazmy, kde dojde k jeho degradaci (Obr. 13). V nádorových buňkách střeva s mutantním Apc proteinem dochází k akumulaci β -kateninu v jádře a aktivaci TCF/LEF zprostředkované transkripce i bez přítomnosti Wnt faktoru¹¹¹.



Obr. 13 Signální dráha β -kateninu a jeho degradace Apc proteinem¹³

Mutace v APC genu se vyskytují nejen v zárodečné formě u familiární adenomatózní polypózy (FAP), ale také v somatické formě u většiny sporadických kolorektálních karcinomů a to v jejich časných stádiích. To ukazuje na roli Apc v iniciaci vzniku adenomu, který se může následně vyvinout v karcinom¹¹². Ačkoliv byly mutace v APC nalezeny také v karcinomech některých dalších částech trávicího traktu (např. slinivce), frekvence není zdaleka tak vysoká. V jiných tumorech než tumorech zažívacího traktu mutace v APC téměř nebyly detekovány. Většina vrozených i somatických mutací, které byly dosud nalezeny, jsou nonsense nebo měnící čtecí rámec, které vedou ke zkrácení C-koncové domény proteinového produktu. Ten sice obsahuje vazebné místo pro β -katenin, ale ztrácí regulační aktivitu¹¹³. Vzhledem k přítomnosti jaderných lokalizačních signálů v této oblasti a jejich předpokládané účasti na segregaci chromozómů^{114,115}, mohou APC mutace také přispívat k chromozomální nestabilitě. Zkrácená forma Apc proteinu může navíc dimerizovat s normálním Apc proteinem, tudíž i mutace pouze na jedné alele genu může mít dominantní negativní efekt¹¹⁶. Většina mutací v APC genu se vyskytuje v exonu 15 v tzv. MCR (mutation cluster region), oblasti pokrývající rozsah kodónů 1286 – 1513, nejčastěji však v kodónech 1309 a 1450¹¹³.

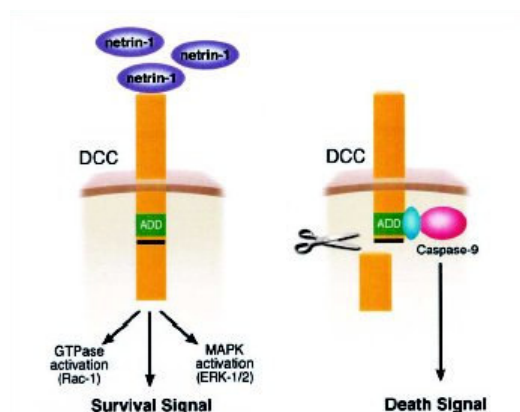
Vyšetření mutací ve vybraných oblastech exonu 15 jsme v předkládaných pracích prováděli ve tkáních střeva a konečníku.

3.2.3.4 Gen DCC

Gen DCC (Deleted in colorectal carcinoma) leží v oblasti chromozómu 18q21.3, má 29 exonů a jeho velikost je téměř 1200kbp. Jeho proteinovým produktem je transmembránový protein o velikosti 1447 aminokyselin. Struktura Dcc vykazuje znaky, které ho řadí do rodiny proteinů neurální buněčné adheze. Jeho extracelulární část představuje čtyři imunoglobulinové domény a šest fibronectinových motivů typu III¹¹⁷.

Přesná role Dcc v normálních i nádorových buňkách zatím ještě není zcela prozkoumána. Hlavní dosud známou funkcí proteinu Dcc je indukce apoptózy prostřednictvím kaspázové dráhy. Tato indukce ale probíhá pouze při absenci ligandu Dcc proteinu, kterým je netrin 1. Za těchto podmínek je Dcc aktivován rozštěpením ve střední části intracelulární domény (zbytek aspartátu 1290) kaspázami¹¹⁸. Toto štěpení umožňuje uvolnění inhibiční C-koncové domény a odhalení domény lokalizované nad místem štěpení kaspázou. Tato doména zvaná ADD (addiction/dependence domain) je zodpovědná za

indukci kaspázově dependentní apoptózy pravděpodobně nepřímou interakcí a následnou aktivací iniciační kaspázy této dráhy, kaspázy 9^{119,120}. Za přítomnosti netrinu 1 je apoptóza indukovaná proteinem Dcc blokována¹¹⁸⁻¹²⁰ (Obr. 14). Dcc má také důležitou roli při netrinem 1 zprostředkovaném směřování růstu a orientaci axonů v průběhu vývoje nervového systému¹²¹ a při aktivaci malých GTP proteinů Cdc42 a Rac1 účastnících se řady buněčných procesů, zejména organizace aktinu a pohybu buněk¹²².



Obr. 14 Aktivace Dcc proteinu a její blokace netrinem 1¹¹⁷

Jak už z názvu genu vyplývá, v nádorech je nejčastěji u DCC genu pozorována ztráta alely. Jde o rozsáhlé delece chromozomu 18q. U tumorů kolorekta jsou alelické ztráty detekovány až v pozdějších stádiích, převážně v karcinomech a jejich jaterních metastázách, což naznačuje, že tyto ztráty hrají roli spíše v progresi než iniciaci kolorektálního karcinomu. Také bylo pozorováno, že alelická ztráta a snížená exprese Dcc je spojená se špatnou prognózou a špatnou odpovědí na adjuvantní terapii u pacientů s kolorektálním karcinomem¹¹⁷. Somatické mutace se v DCC téměř nevyskytují. Byly detekovány prozatím pouze ve dvou případech, v intronu 13 a v exonu 28 buněk kolorektálního karcinomu¹²³.

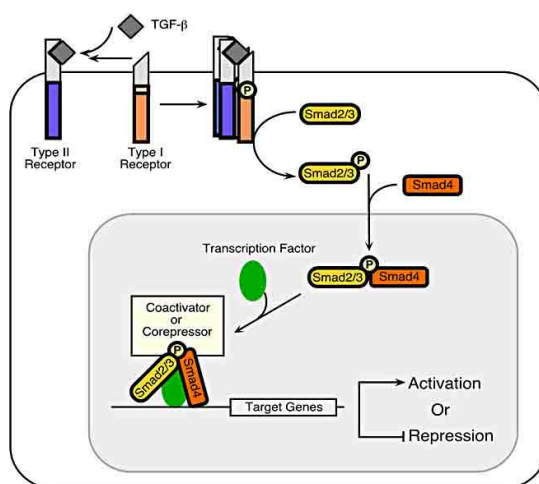
Mutace v DCC genu jsme analyzovali v projektu kolorektálního karcinomu.

3.2.3.5 Gen *SMAD4*

Gen *SMAD4* nebo také *DPC4* leží v oblasti chromozomu 18q21.1, jeho velikost je přibližně 50kbp a má 13 exonů. Jeho proteinový produkt *Smad4* je dlouhý 552 aminokyselin a patří do rodiny tzv. Darwin proteinů, které mají ve své aminokyselinové sekvenci vysoce konzervované amino- a karboxyl terminální domény nazývané MH1 (Mad homology1) a MH2 (Mad homology 2)¹²⁴ a mezi nimi spojovací oblast, která je variabilní

ve své délce i sekvenci. MH1 oblast je zodpovědná za autoinhibici a vazbu proteinu na DNA, zatímco MH2 doména je nezbytná pro interakci proteinu s ostatními Smad proteiny. Spojovací oblast obsahuje tzv. SAD doménu (Smad4 activation domain), která zajišťuje transkripční aktivitu Smad komplexu ¹²⁵.

Smad4 je centrální složkou Smad dráhy, která přenáší signály od proteinů superrodiny TGF β (Transforming growth factor β) ¹²⁶. Po navázání TGF β na svůj receptor vznikne aktivní receptorový komplex, který fosoryluje Smad2 a Smad3. Ty se následně vážají na Smad4 a tvoří s ním komplex, který je transportován do jádra a zde reguluje transkripci cílových genů vedoucí k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi ¹²⁷ (Obr. 15).



Obr. 15 Signální dráha Smad4 proteinu ¹²⁸

SMAD4 byl původně identifikován jako tumor supresor v oblasti 18q21.1 ¹²⁹. Bylo ukázáno, že tento gen je mutovaný nebo deletovaný u přibližně 50% karcinomů slinivky ^{130 131} a 20% kolorektálních tumorů ^{132,133} a dále také karcinomech děložního čípku, prsu, vaječníku, jater, hlavy a krku ¹³⁴. Vrozené mutace se ve SMAD4 vyskytují v malé skupině pacientů s juvenilními polypy ¹³⁵.

Přestože má TGF β dráha původně tumor supresorový účinek, ukázalo se, že v nádorových buňkách má působení TGF β efekt zcela opačný a výsledkem je zvýšená schopnost invaze, metastazování, angiogeneze a imunosuprese těchto buněk ¹²⁷. Zatím není jasné, zda ztráta Smad4 v nádorových buňkách vede pouze ke ztrátě tumor supresorové aktivity anebo zda se také přímo účastní progresu nádoru aktivované TGF β . Některé práce totiž naznačují, že existuje i jiná TGF β dráha, nezávislá na Smad4 ¹³⁶.

V předkládaném projektu karcinomu slinivky jsme analyzovali alelickou ztrátu oblasti 18q.21.

3.3 Polymorfismy a nádorová onemocnění

3.3.1 Vztah polymorfismů a nádorového bujení

Polymorfismy jsou vrozené genetické variace, které jsou přítomny ve všech buňkách těla. Většinou se jedná o jednonukleotidové změny (single nucleotide polymorphisms - SNPs), ale mohou se také vyskytovat tandemové repeaty nebo delece. SNPs jsou charakterizovány jako jednonukleotidové variace, jejichž frekvence v populaci je pro obě alely větší než 1%, vyskytují se přibližně každou 100. - 300. bázi a zpravidla nemají přímý vliv na funkci proteinů (nemění aminokyselinovou sekvenci nebo se nevyskytují v kódující sekvenci)¹³⁷. V současné době je popsáno přes 12 milionů SNPs, z toho jsou přibližně 4 miliony lokalizovány v kódujících sekvencích¹³⁸.

Funkční význam SNPs ve většině případů není znám. V závislosti na lokalizaci v genu mohou ovlivňovat genovou transkripci, translaci, mRNA stabilitu, proteinovou aktivitu nebo také nemusí mít žádný známý účinek. Pokud genová nebo proteinová aktivita hraje roli v odpovědi na léčbu nebo v mechanismu vzniku onemocnění, může mít přítomný SNP prediktivní nebo prognostický potenciál. Navíc se v jednom genu může nacházet i několik SNP pozic najednou a to buď ve vzájemné vazbě či vazebné nerovnováze¹³⁹. V takovém případě může být kromě jednotlivých SNP markerů důležitá i jejich kombinace. Pokud se SNPs nacházejí na stejném řetězci DNA, nazýváme takovou kombinaci haplotypem¹⁴⁰.

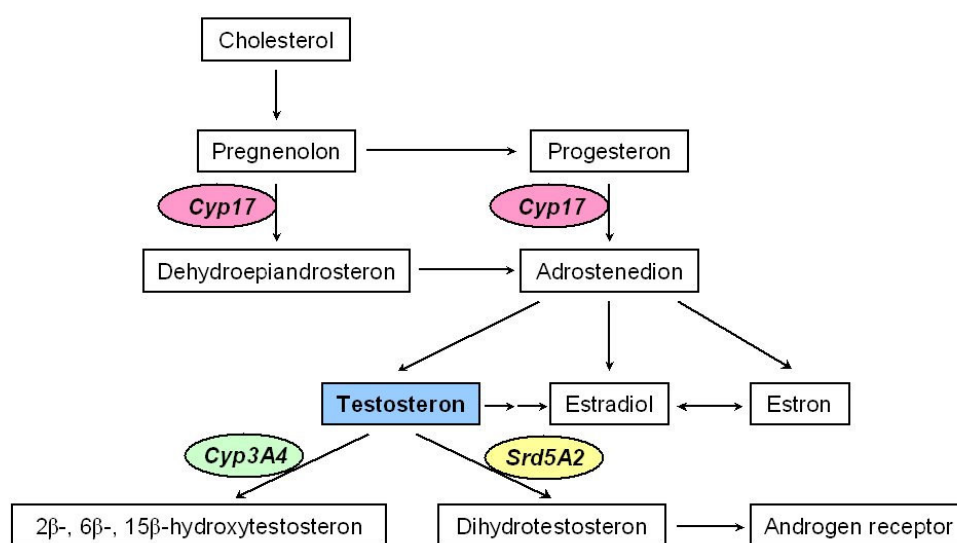
Současné biomedicínské výzkumy se v oblasti jednonukleotidových polymorfismů zaměřují zejména na hledání statisticky významné asociace mezi SNP alelami ve vybraných genech s předpokládaným významem v určitém onemocnění a daným onemocněním, s cílem nalézt kandidátní SNPs nebo jejich kombinace, které by mohly hrát roli v odpovědi na léčbu, prognóze nebo samotném vzniku onemocnění. Například v souvislosti s rizikem vzniku a prognózou karcinomu prostaty byla provedena již řada studií ukazujících na možnou spojitost s výskytem SNPs v genech metabolické dráhy testosteronu^{42 43}. U karcinomu plic zase některé práce předkládají možnou souvislost výskytu SNPs v genech účastnících se opravy DNA a odpovědí na léčbu^{35,141}. Zatím jde o klinické výzkumy, které směřují k tomu, že v blízké budoucnosti bude možno na základě vyšetření sady specifických polymorfismů rozhodnout, zda má pacient zvýšené riziko

určitého onemocnění, o jak agresivní formu onemocnění se jedná, případně která léčba vzhledem k toxicitě a odpovědi bude nejvhodnější.

3.3.2 Geny metabolické dráhy testosteronu analyzované v této práci

3.3.2.1 Gen CYP17A1

Gen CYP17A1 je lokalizován v oblasti chromozomu 10q24.3, je dlouhý 7kb a obsahuje 8 exonů. Jeho proteinový produkt Cyp17 (cytochrom P450, rodina 17, podrodina A, polypeptid 1) se skládá z 508 aminokyselin, je lokalizován v endoplazmatickém retikulu a má dvě enzymové aktivity: 17alfa-hydroxylázovou a 17,20-lyázovou. Je to klíčový enzym v biosyntéze steroidních hormonů v nadledvině, vaječníku a varleti. Cyp17 svými dvěmi enzymovými aktivitami katalyzuje přeměnu pregnenolonu na dehydroepiandrosteron a progesteronu na androstenedion. Tyto androgeny pak mohou být konvertovány na testosteron, estron a estradiol ¹⁴² (Obr. 16).



Obr. 16 Metabolická dráha testosteronu

V tomto genu je zejména prozkoumán SNP nacházející se v jeho promotoru (rs743572), ale zatím není zcela potvrzena jeho souvislost se zvýšeným rizikem onemocnění karcinomem prostaty, přestože některé práce předložily i výsledky ukazující na vztah tohoto polymorfismu s vyšším tumorovým stagingem a gradingem ⁴².

3.3.2.2 *Gen CYP3A4*

Gen CYP3A4 leží v lokalitě chromozomu 7q22.1, je dlouhý 27kbp a zahrnuje 13 exonů. Jeho proteinový produkt je Cyp3A4 (cytochrom P450, rodina 3, podrodina A, polypeptid 4), který obsahuje 502 aminokyselin, je lokalizován v membráně endoplazmatického retikula a v jeho aminokyselinové sekvenci se kromě jiných oblastí nalézá i p53 vazebný motiv. Je exprimován zejména v játrech a dále pak v prostatě, prsu a tenkém i tlustém střevu. Má širokou substrátovou specifitu a je zodpovědný za oxidaci mnoha léků a strukturálně rozdílných látek, jako jsou steroidy, mastné kyseliny a xenobiotika. Má důležitou roli v oxidaci testosteronu a estrogener. Může být indukován mnoha látkami jako například léky, pesticidy nebo karcinogeny, což vede k vysokým hladinám tohoto proteinu v játrech a dalších orgánech ¹⁴³.

Produktem oxidace testosteronu tímto enzymem je 2 β -, 6 β -, 15 β -hydroxytestosteron, který je méně biologicky aktivní než testosteron (Obr. 16). Mutace v CYP3A4 genu může způsobit sníženou schopnost oxidace testosteronu a jeho následnou intracelulární přeměnu na mnohem více biologicky aktivní formu dihydrotestosteron. Tato látka je hlavní androgenní hormon, který se účastní regulace růstu prostaty a tudíž může dojít k tumoróznímu růstu ¹⁴³.

V genu CYP3A4 bylo identifikováno několik SNPs, z nichž nejvíce prozkoumaným je SNP v oblasti -392 (rs2740574). Přestože u tohoto polymorfismu byla v karcinomu prostaty pozorována souvislost s vyšším gradingem a stagingem tumoru, není jeho role v tumorigenezi prostaty ještě definitivně prokázána ¹⁴³⁻¹⁴⁵.

3.3.2.3 *Gen SRD5A2*

Gen SRD5A2 leží v oblasti chromozomu 2p23.1, je dlouhý přibližně 56kbp a obsahuje 5 exonů. Jeho proteinový produkt Srd5A2 (steroidní 5- α -reduktáza typu 2) se skládá z 254 aminokyselin a je to důležitý regulátor aktivity androgenů. Katalyzuje irreverzibilní redukci testosteronu na biologicky aktivnější prostatický androgen dihydrotestosteron (DHT), který se váže na androgen receptor (AR) s 5x vyšší afinitou než testosteron (Obr. 16). Komplex DHT-AR transaktivuje řadu genů jejichž exprese vede k vývoji a růstu prostaty. Navíc bylo zjištěno, že DHT může aktivovat buněčnou proliferaci prostřednictvím estrogen receptoru α bez přeměny na estrogeny. Srd5A2 je exprimován v játrech, prostatě, nadvarleti a pravděpodobně i prsu ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

V genu SRD5A2 bylo studováno několik genetických variací, ale nejvíce prozkoumány jsou dva SNP - V89L (rs523349) a A49T (rs9282858) a jeden TA dinukleotidový repeatový polymorfismus v 3' nepřekládané oblasti. U všech tří variací existují práce popisující vztah k riziku nebo agresivitě karcinomu prostaty, ale také práce tuto asociaci nepotvrzující¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Nicméně se zdá, že pokud existuje nějaká spojitost mezi polymorfismy v genech metabolické dráhy testosteronu a karcinomem prostaty, gen SRD5A2 je jedním z hlavních kandidátů na přítomnost těchto polymorfismů.

3.4 Analýzy molekulárních markerů u nádorových onemocnění

3.4.1 Molekulární markery

3.4.1.1 Somatické DNA variace

DNA variace vyskytující se v nádorových tkáních zahrnují řadu různých typů DNA změn od velkých chromozomálních přestaveb čítajících až desítky Mbp, které jsou zachytitelné pouze cytogenetickými metodami, přes alelické delece postihující několik sousedních genů, malé delece a inserce nebo jednonukleotidové substituce až po epigenetické změny jako například metylace promotoru. Jelikož se v našich výzkumech nezabýváme cytogenetickými technikami a postupy pro identifikaci metylací, zaměřím se dále pouze na metody odhalující alelické ztráty a jedno nebo několik nukleotidové mutace (substituce, inserce a delece).

Alelické ztráty pozorované u tumor supresorových genů jsou delece o rozsahu až několik stovek kbp, které mohou postihnout i sousední geny, nezřídka také tumor supresorové (například DCC a DPC na chromozomu 18q21). Bývají pozorovány v kombinaci s bodovou mutací nebo s další ztrátou na druhé alele genu a výsledkem je pak ztráta funkce proteinového produktu. Mutace typu substituce, inserce nebo delece způsobující defekt proteinu a následný vznik onemocnění se mohou vyskytovat v různých částech genu: v upstream regulační oblasti, kde mohou mít za následek potlačení, snížení nebo zvýšení exprese, v exonech, kde přímo ovlivňují aminokyselinové složení proteinového produktu a v intronech, kde mohou mít vliv na sestřih RNA a tedy i výslednou aminokyselinovou sekvenci proteinu. Vzhledem však k tomu, že intronové

oblasti bývají dlouhé až několik desítek kbp, zaměřují se běžné mutační analýzy zpravidla pouze na exony a přilehlé oblasti do 100bp¹⁵⁰.

3.4.1.2 Polymorfismy

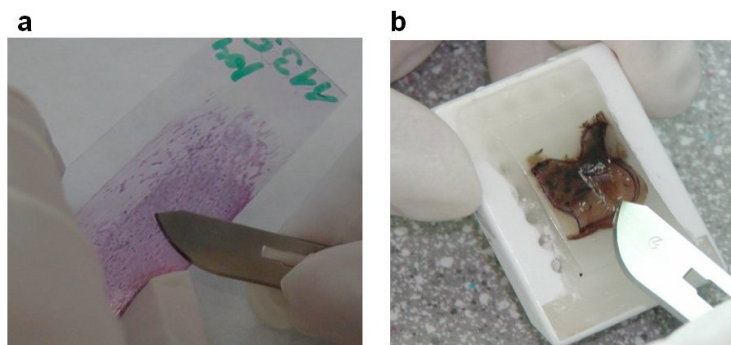
Nejčastěji vyšetřovanými polymorfismy v souvislosti s nádorovým onemocněním bývají SNPs (viz kapitola 3.3.1) nebo STR (short tandem repeat) a VNTR (variable number tandem repeat) markery. Jde o vrozené DNA variace nacházející se po celé délce DNA. SNP jsou jednonukleotidové substituce u nichž se v populaci nachází pouze dva typy alel zatímco STR a VNTR jsou opakující se krátké sekvence, jejichž počet může být různý¹³⁷.

3.4.2 Typy a charakter vzorků

Typy vzorků, které jsou k dispozici pro vyšetření DNA mutací, mohou být různé. U solidních tumorů to bývá nejčastěji zmrazená tkáň získaná peroperativně nebo biotická tkáň, například z tlustého střeva při koloskopii, z plic při bronchoskopii, ze slinivky při ERCP endoskopii (endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie) nebo z močového měchýře při cystoskopii. Výtěžky i kvalita DNA izolované z takových typů vzorků bývá většinou dobrá a zcela dostačující pro následné analýzy. Společným rysem vzorků nádorů vzhledem k analýze somatických mutací je jejich heterogenita z hlediska typu buněk (nádorové/nenádorové) a typu mutací. To může představovat problém, jelikož příměs nenádorových buněk maskuje záchyt mutací obzvláště v případech, kdy nenádorové buňky ve vzorku převažují a použitá detekční metoda nemá dostatečnou citlivost. Především u biotických vzorků pak bývá podíl zdravé tkáně dosti značný a někdy vzorek nádorovou tkáň dokonce neobsahuje vůbec. Správný odběr tkáně pro následnou analýzu závisí zejména na schopnostech a zkušenostech odborníka provádějícího biopsii nebo resekci. Přítomnost nádorových buněk s různými mutacemi opět snižuje jejich záchyt a navíc stěžuje interpretaci výsledků, kdy není zcela jasné, zda se jedná o jeden klon buněk s více mutacemi nebo o více klonů.

Podrobnější charakterizaci vzorku umožňují preparáty ve formě parafínových bločků, kde lze nejprve přítomnost nádorových buněk ověřit histologickým vyšetřením nebo ve formě buněčných nátěrů na mikroskopickém sklíčku, které mohou být nejprve

vyšetřeny cytologicky (Obr. 17). V obou případech lze navíc použít speciální techniku laserové mikrodisekce, při které jsou v preparátech pod mikroskopem vybrány konkrétní oblasti (nádorové buňky, jejich shluky nebo jiné části nádorové tkáně) a ty jsou pak pomocí laserového paprsku vyňaty pro další analýzu. Další výhodou těchto archivovaných preparátů je možnost dlouhodobého uchovávání pro pozdější opakovaná vyšetření. U těchto preparátů je poněkud komplikovanější izolace genetického materiálu. DNA izolovaná z parafínových bločků je vlivem fixace tkáně pomocí roztoku formaldehydu degradovaná a i přes dostatek buněk jsou pak výtěžky nízké a DNA je fragmentována na úseky s délkou kratší než 500bp. Buněčné nátěry na sklíčkách naopak často obsahují málo buněk, navíc bývají zality do akrylátové pryskyřice, jejíž odstranění je složité a také zhoršuje kvalitu DNA ¹⁵⁰.



Obr. 17 Archivované vzorky: a - mikroskopické sklíčko barvené roztokem Giemsy, b - parafínový bloček

U vyšetření v souvislosti s nádorovým onemocněním bývá analyzována také DNA z krve, zpravidla při analýzách polymorfismů nebo jako srovnávací kontrola k analýzám somatických mutací z nádorové tkáně. Izolace z krve je bezproblémová, získaná DNA bývá kvalitní a v dostatečném množství, vyžaduje pouze odběr do protisrážlivého roztoku a její následné uchovávání při teplotě -20°C.

3.4.3 Metody vyšetřování molekulárních markerů u nádorových onemocnění

Existuje řada metod pro vyšetřování genových variací a jejich výběr závisí na různých faktorech jako je personální a přístrojové vybavení laboratoře, počet a typ vzorků, charakter detekované variace a v neposlední řadě také finanční prostředky. Tyto metody mohou být založeny na různých principech od klasického sekvenování, přes PCR amplifikaci s následnou separací fragmentů na základě různých parametrů (délka,

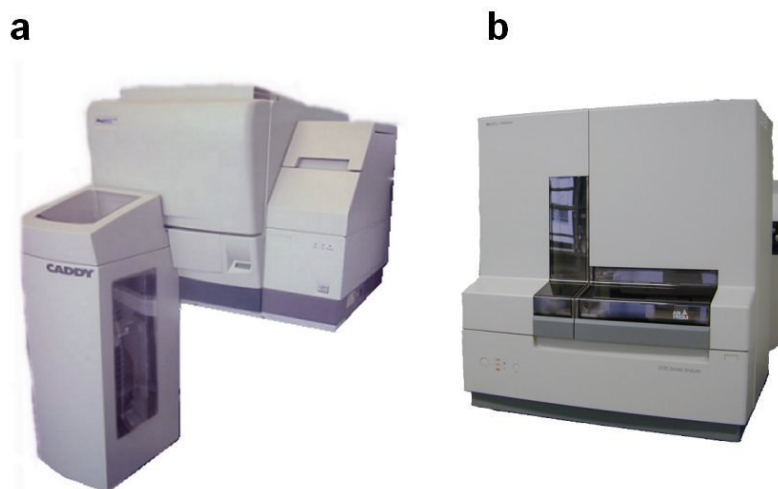
konformace, denaturační teplota atd.) až po postupy založené na specifické hybridizaci. V poslední době je při výběru metody zejména kladen důraz na její vysokou citlivost (vyšetřování somatických mutací), specifitu a kapacitu neboli throughput (genotypování SNPs).

Níže uvádím několik metod pro detekci mutací, alelických ztrát a SNPs, které byly použity v předkládaných publikacích. Všechny metody použité v této práci jsou založené na PCR amplifikaci vybraného úseku DNA a jeho následné elektroforetické analýze. Některé metody zahrnují ještě mezikrok jako je sekvenační reakce nebo restriční štěpení. PCR amplifikace je zacílena na vybrané exony tumor supresorových genů a protoonkogenů s předpokládaným výskytem somatických mutací a na kódující i nekódující oblasti DNA, kde se nacházejí zkoumané jednonukleotidové polymorfismy nebo STR markery. Výsledné PCR produkty jsou analyzovány pomocí gelové nebo kapilární elektroforézy.

3.4.3.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis - CE) je dobře zavedená metoda pro elektromigrační separaci širokého spektra látek včetně DNA molekul. Separace DNA v automatizovaných CE přístrojích probíhá v kapiláře o vnitřním průměru 50-100 μm a délce 30-80 cm. Kapiláry jsou před každou analýzou plněny gelem rozpuštěným v elektroforetickém pufru. Vzorek DNA je dávkován do kapiláry působením elektrického pole a separace probíhá na základě rozdílu ve velikosti nebo konformaci DNA fragmentů pod vysokým napětím (5-30 kV, 200-1000 V/cm). Separované fragmenty jsou detekovány za použití laserem indukované fluorescence při jejich průchodu detektorem na konci kapiláry. Získaná data jsou sbírána a uchovávána v počítači a následně vyhodnocena pomocí příslušného programu. V dnešní době existují CE přístroje pro analýzu DNA od čtyř významných výrobců: GE Healthcare (dříve Amersham Biosciences), Applied Biosystems, Beckman a Spectrumedix, z nichž nejvíce rozšířené jsou přístroje MegaBACE a ABI PRISM od prvních dvou výrobců (Obr. 18). Různé typy přístrojů se liší zejména vlastnostmi kapilár (průměr, délka, vnitřní povrch), jejich počtem (1, 4, 8, 16, 48, 96, 192 nebo 384), vlastnostmi gelu (porozita, viskozita, denaturační vlastnosti), možností automatického dávkování (interní autosampler, externí dávkovací robot nebo žádné), teplotním rozpětím (18-60°C) a způsobem detekce (skenující nebo prosvěcující). Pro

vysokokapacitní analýzy čítající stovky vzorků a desítky analyzovaných oblastí (markerů) jsou vhodné přístroje s vyšším počtem kapilár (96 nebo 384) a automatickým dávkováním



Obr. 18 Genetické analyzátory: a - MegaBACE 1000 (GE Healthcare) s automatickým dávkovačem Caddy (Watrex), b - ABI PRISM 3100 (Applied Biosciences)

3.4.3.2 Restrikční analýza

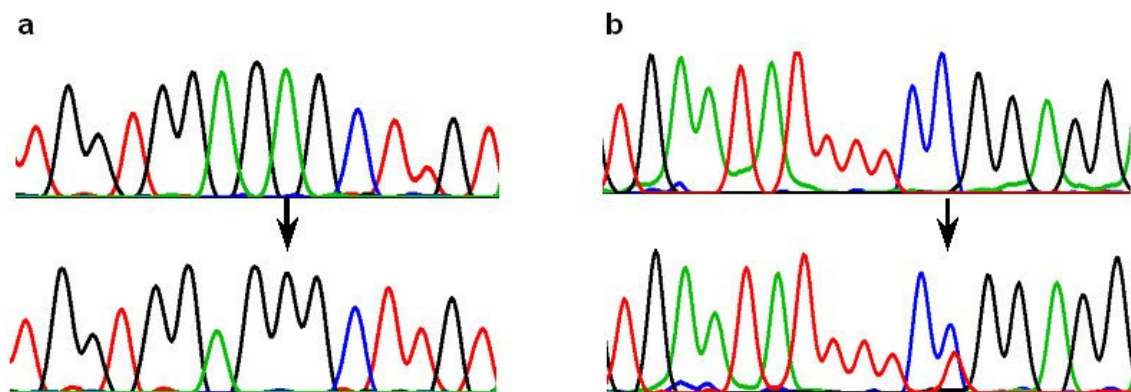
Restrikční analýza je metoda založená na specifickém štěpení PCR fragmentu endonukleázou a následnou elektroforetickou analýzou produktů štěpení. Endonukleáza je zvolena tak, aby štěpila v místě substituce (mutace nebo SNP), pokud se zde vyskytuje detekovaná báze. Přítomnost substituce na jedné nebo obou alelách je pak zjišťována podle toho, zda enzym rozštěpil fragment a v jaké míře (zda celý vzorek - homozygot nebo jeho polovinu - heterozygot). Standardně je pro analýzu restrikční směsi používána horizontální gelová elektroforéza, ale je možno aplikovat i CE, pokud je jeden z primerů fluorescenčně značen²⁶.

Hlavní výhody této metody v kombinaci s gelovou elektroforézou jsou nízké náklady, jednoduchý postup a nenáročnost na přístrojové vybavení. Nevýhody jsou nemožnost detekce neznámé mutace, nízká citlivost (metodu lze použít především pro detekci vrozených mutací a SNP), nároky na vyšší koncentraci PCR produktu a možné nežádoucí vlivy při štěpení zkreslující výsledek (například metylace DNA a charakter sekvence snižující efektivitu štěpení, hvězdičková aktivita enzymu vede k nespecifickému štěpení). Dalším negativem je to, že ne vždy existuje endonukleáza specificky štěpící zkoumanou oblast a proto metodu nelze použít ve všech případech.

Tuto metodu jsme použili při screeningu několika SNP v projektu karcinomu prostaty, které nebylo možno díky denaturačním vlastnostem analyzovat pomocí CGCE.

3.4.3.3 DNA sekvenování podle Sangera

DNA sekvenování podle Sangera je základní metodou pro detekci známých i neznámých mutací nebo jednonukleotidových polymorfismů. Tato metoda byla vyvinuta již v roce 1974 Fredem Sangerem pro určování sekvence nukleotidů v DNA. Je založena na DNA polymerační reakci s jedním primerem a PCR fragmentem nebo plazmidem jako templátem za použití směsi deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) a dideoxyribonukleosidtrifosfátů (ddNTP). Jakmile jsou ddNTP zabudovány do sekvence, zabraňují navázání dalšího nukleotidu z důvodu chybějící volné OH skupiny a tedy nemožnosti vytvoření fosfodiesterové vazby. Fragment je tím ukončen, polymeráza se uvolní a začne syntetizovat nový fragment. Fragmenty různých délek pokrývajících postupně celou velikost původního templátu, jsou následně elektroforeticky separovány. Adaptace na CE vyžaduje fluorescenční značení jednotlivých ddNTP (každý ze čtyř jinou fluorescenční značkou) a sekvence je pak zpracována a odečtena pomocí speciálního čtecího programu^{151, 157, 158} (Obr. 19).



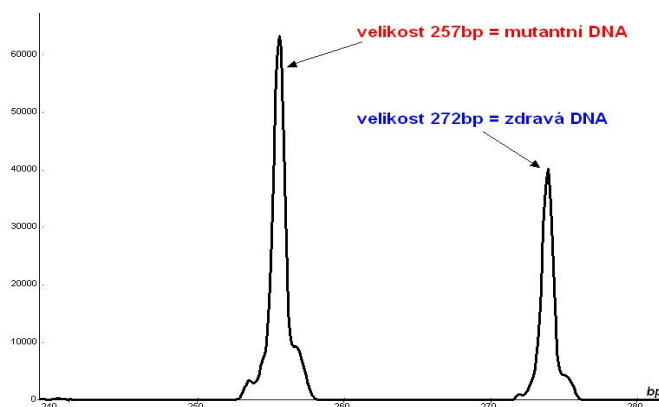
Obr. 19 Příklady výsledků sekvenování: a - úplná záměna A→G, b - částečná záměna C→T

Výhodou sekvenování je přímá identifikace mutace. Nevýhodami jsou poměrně vysoké náklady, složitý postup, nutnost vyššího množství PCR produktu a nízká citlivost, jelikož při konečném čtení bývají fragmenty odpovídající mutované sekvenci zastíněny fragmenty bez mutace¹⁵⁹.

Sekvenování jsme využili při identifikaci nalezených neznámých mutací, ale pouze v těch případech, kdy poměr mutované a nemutované DNA byl větší než cca 30%. Dále jsme tuto metodu použili při hledání vzorků obsahujících vybraný jednonukleotidový polymorfismus pro účely přípravy standardů u vzorků pacientů s karcinomem prostaty.

3.4.3.4 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza se používá pro dělení DNA fragmentů (nejčastěji PCR produktů) na základě jejich délky. Při použití CE je třeba jejich značení fluorescenční značkou nebo interkalačním činidlem (např. Sybr Greenem), častá je také jejich denaturace na jednořetězcové molekuly, aby během elektroforézy nedocházelo k nespecifickým interakcím komplementů s nepříznivým vlivem na separaci. Dále je nezbytné přidat ke vzorku velikostní standard (směs fragmentů o známých velikostech), který je také fluorescenčně značený, ovšem jinou značkou než vzorek a díky němu je pak možno po zpracování výsledků srovnáním migrační polohy určit velikosti jednotlivých fragmentů. Tato metoda se používá pro detekci delecí nebo inzercí o rozsahu maximálně několika desítek nukleotidů (Obr. 20) nebo při určování LOH (viz dále) ^{151,154}.



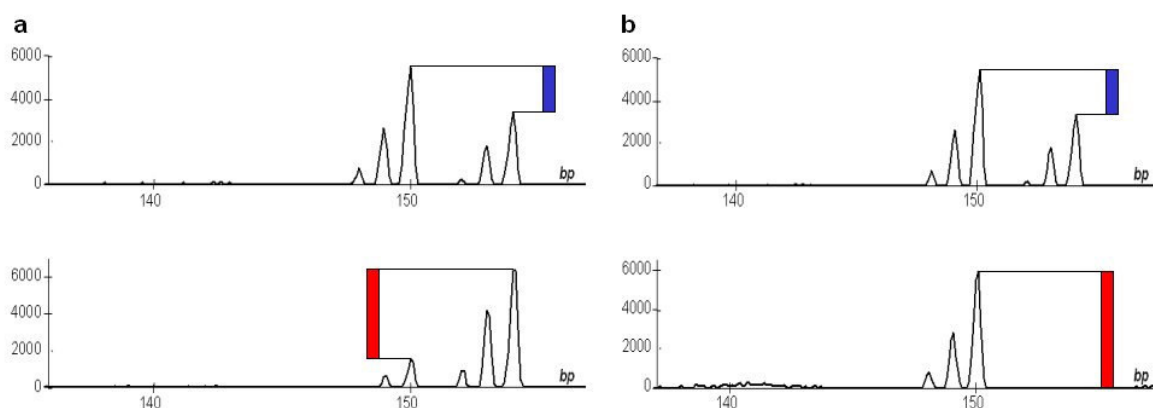
Obr. 20 Příklad výsledku fragmentační analýzy směsi normální a mutované (s 15bp delecí) DNA

Výhodou této metody je její univerzálnost, jednoduchá příprava vzorku i samotná analýza. Nevýhodou je nutnost značení fragmentů a dále nemožnost použití na mutace typu substituce.

Fragmentační analýzu jsme využili při detekci delečních mutací v genu EGFR v projektu karcinomu plic a při analýze alelických ztrát pomocí LOH ve vzorcích slinivky a močového měchýře.

3.4.3.5 Loss of heterozygosity

Loss of heterozygosity (LOH) neboli ztráta heterozygosity je metoda speciálně určená k detekci alelických ztrát. Využívají se při ní markery typu STR, které se nacházejí v blízkosti nebo přímo uvnitř zkoumané alely. Tyto markery jsou nejprve pomocí PCR amplifikovány z templátové DNA izolované z krve pacienta a podrobeny fragmentační analýze. Ty, ve kterých je pacient heterozygotní (vykazují dva píky), jsou vybrány pro PCR amplifikaci z templátové DNA izolované ze zkoumaného vzorku nádoru a opět analyzovány pomocí fragmentační analýzy. Nakonec se sleduje, zda poměr intenzit jednotlivých píků daného markeru u krve a vzorku nádoru je stejný. Pokud ano, ke ztrátě heterozygosity a tudíž ani alelické delecí nedošlo. V případě však, že je poměr odlišný (nachází se mimo interval $\langle 0,6;1,67 \rangle$) nebo dokonce jeden z píků u vzorku nádoru chybí, jedná se o LOH a tedy i alelickou ztrátu (Obr. 21).

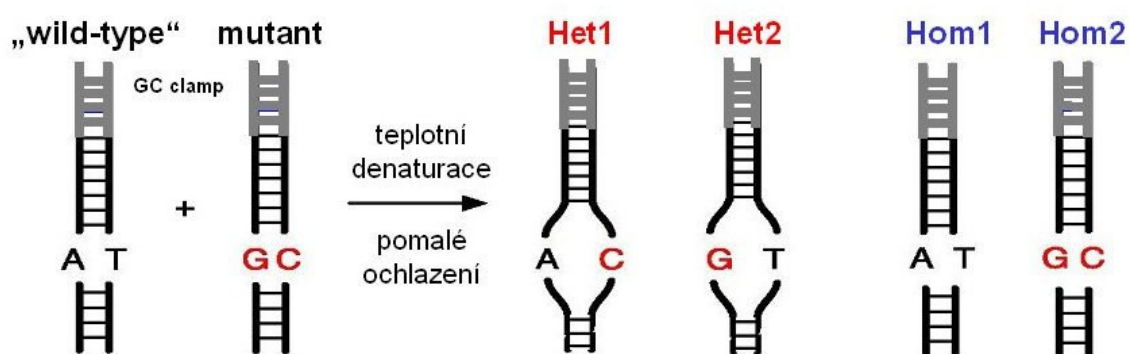


Obr. 21 Příklad výsledku LOH analýzy: a - částečná ztráta alely, b - úplná ztráta alely

Jde o poměrně jednoduchou metodu, která má ovšem několik limitací. První z nich je to, že pro jednoznačné potvrzení LOH je třeba zaznamenat změnu poměrů intenzit u více STR markerů najednou (doporučují se minimálně tři). Vzhledem k tomu, že pro vyšetření lze použít pouze markery, ve kterých je pacient heterozygotní, bývá často nutné analyzovat velké množství STR markerů a to je poměrně nákladné. Druhá limitace metody je v požadavku na geneticky homogenní vzorek. Výrazný podíl zdravé tkáně nebo více nádorových klonů s rozdílným genetickým profilem přítomných v analyzovaném vzorku může vést k falešně negativnímu výsledku, kdy změna poměru píků není dostatečná pro LOH. Tento problém částečně řeší použití laserové mikrodisekce, při které jsou vybrány pouze nádorové buňky, podobně jako v případě detekce mutací (viz kap. 3.4.2).

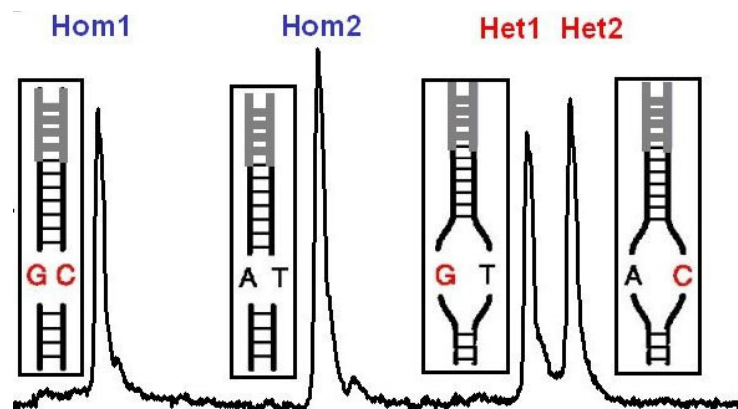
3.4.3.6 TGCE

TGCE (Temperature Gradient Capillary Electrophoresis) je metoda pro analýzu známých i hledání neznámých bodových mutací¹⁶⁰. Princip metody je založen na separaci heteroduplexů neboli párů nekomplementárních bazí mezi dvěma řetězcí DNA lišícími se v jednom nukleotidu (zdravá DNA a DNA s mutací). Heteroduplexy se vytvoří denaturací dvojřetězcových molekul DNA na jednořetězcové a jejich pomalou reasociací, při které dochází ke vzniku jak původních "zdravých" a mutantních dvojřetězcových DNA (obsahují homoduplexy) tak i k jejich kombinacím (obsahují heteroduplexy) (Obr. 22).



Obr. 22 Tvorba heteroduplexů pro TGCE analýzu

K separaci takto vzniklých DNA molekul pak dochází v důsledku rozdílů v jejich denaturačních teplotách. Při CE za postupně se zvyšující teploty se dvouřetězcové fragmenty rozevírají nejprve v místě heteroduplexu a následně v celém zbytku fragmentu a tato postupná denaturace způsobí jejich postupné zbrždění v průběhu elektroforézy. K denuraci nakonec dojde i u fragmentů obsahujících homoduplexy, ale až po dosažení vyšší teploty, tudíž jsou zbržděny později a tak dochází k jejich separaci od molekul s heteroduplexy. Denaturace přitom závisí na sekvenci v místě heteroduplexu nebo homoduplexu a v jeho nejbližším okolí a tak jsou separovány i jednotlivé fragmenty s heteroduplexy a homoduplexy mezi sebou. U vzorku obsahujícího zdravou i mutovanou DNA jsou pak typickým výsledkem čtyři píky (2 píky pro fragmenty s heteroduplexy a 2 píky pro fragmenty s homoduplexy) (Obr. 23). U vzorku bez mutace je výsledkem pouze jeden pík. Aby během separace nedošlo k úplnému oddělení obou řetězců, které by značně zhoršilo výsledek analýzy, bývá jeden z PCR primerů prodloužený o 40ti nukleotidovou sekvenci skládající se z G a C bazí (tzv. GC clamp) zajišťující díky své vysoké denaturační teplotě permanentní dvojřetězcový stav molekuly v oblasti tohoto GC clampu.



Obr. 23 Separace heteroduplexů pomocí TGCE analýzy

Metoda separace homo- a heteroduplexů za částečné denaturace byla původně vypracovaná pro gelovou elektroforézu v polyakrylamidovém gelu a nazvána denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE). Postupná denaturace fragmentů byla zajištěna denaturačním činidlem (močovinou nebo formaldehydem), jehož koncentrace se podél gelu zvyšovala. Později byla metoda adaptovaná pro CE s teplotní denaturací (TGCE) ¹⁵⁵.

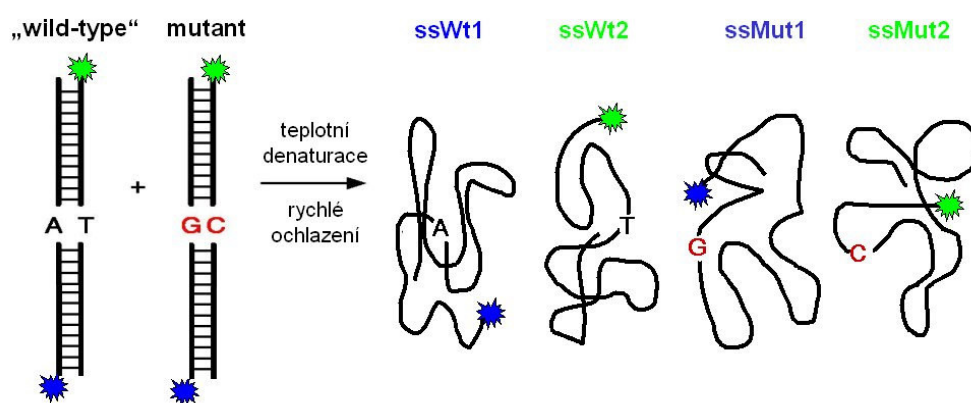
Pro účinnější separaci fragmentů, zejména pak těch, jejichž denaturační teplota je velmi podobná, jsme použili místo postupně se zvyšující teploty její cyklování a tuto metodu nazvali CGCE (Cycling gradient capillary electrophoresis). Klíčovým faktorem při této analýze je zvolená teplota. Ta se nejprve orientačně stanoví na základě teoretického výpočtu denaturačních teplot v oblasti homoduplexů u zdravé a u mutované DNA molekuly. Cyklování se pak nastaví v rozsahu $\pm 1^\circ\text{C}$ od této teploty s frekvencí 1x za 1 minutu a provede se zkušební analýza se vzorkem obsahujícím danou mutaci (tzv. mutačním standardem). Pro dosažení úplné separace všech čtyř píků je pak teplota případně upravena. Bylo zjištěno, že pokud u daného fragmentu při určité teplotě dochází k separaci při přítomnosti jedné mutace, lze pak při stejných teplotních podmínkách separovat jakoukoli jinou mutaci nacházející se v takovém fragmentu. Znamená to tedy, že po optimalizaci podmínek pro známou mutaci je pak možno detekovat jakoukoliv další.

Tato metoda má několik výhod. Je to zejména vysoká citlivost, kdy je možné odhalit mutaci, která je přítomna, ve směsi se zdravou DNA v zastoupení menším než 10 %, dále možnost detekce i neznámé mutace nebo více mutací najednou a jednoduché vyhodnocení i samotná příprava vzorku pro analýzu. Nevýhodou je nutnost fluorescenčního značení PCR produktů (nejčastěji pomocí jednoho z primerů), nemožnost přímé identifikace neznámé mutace a krátká analyzovaná oblast (velikost PCR produktů je většinou maximálně 200 bp), která nemusí vždy pokrýt celý exon.

CGCE jsme použili ve všech uvedených projektech, zejména při detekci somatických mutací ve tkáních kolorekta, slinivky a plic, ale také při genotypování jednonukleotidových polymorfismů u pacientů s karcinomem prostaty.

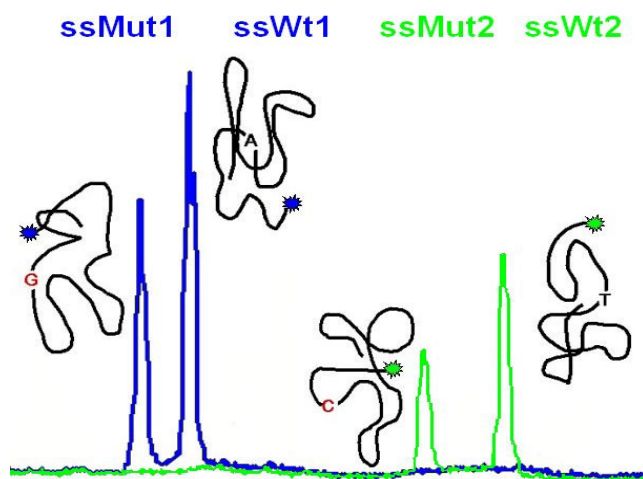
3.4.3.7 SSCP

SSCP (Single Strand Conformation polymorphism) je další z metod pro detekci známých i neznámých mutací. Spočívá v elektroforetické separaci náhodných klubek DNA fragmentů založené na jejich rozdílných konformacích v důsledku drobných odchylek v sekundární struktuře způsobených přítomnou mutací. Klubka se utvoří po teplotní denaturaci dvojřetězcové DNA a jejím následném prudkém ochlazení (Obr. 24).



Obr. 24 Tvorba konformací jednořetězcových DNA pro SSCP analýzu

Metoda SSCP byla vyvinuta před více než 15 lety ¹⁶¹ pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu, ale dnes je kombinována především s kapilární elektroforézou (CE-SSCP). Jde o jednoduchou a rychlou techniku pro detekci mutací s nízkými náklady ¹⁶². Při CE-SSCP je používána fluorescenční detekce, při které je značení DNA zajištěno interkalačním činidlem, které však neumožňuje rozlišit ssDNA komplementární řetězce, inkorporací značených nukleotidů při PCR amplifikaci anebo použitím značených primerů. V případě, že je při PCR amplifikaci každý z primerů značen jinou fluorescenční značkou, je pak možno rozlišit komplementární DNA řetězce, kdy vzorek ze zdravé tkáně vykazuje dva píky zatímco z nádoru obsahujícího zdravou i mutovanou DNA píky čtyři ¹⁵⁶ (Obr. 25).



Obr. 25 Separace jednořetězcových DNA pomocí SSCP analýzy

Při SSCP-CE má několik faktorů významný vliv na výslednou separaci. Klíčovým z nich je separační teplota, která je optimální v rozmezí 15 - 25°C v závislosti na dalších parametrech jako je sekvence DNA, složení gelu nebo pufru. Bylo zjištěno, že pro různé mutace v rámci jednoho PCR fragmentu mohou existovat různé optimální teploty, při kterých dochází k separaci mutovaných a nemutovaných klubek DNA. Dalšími faktory jsou složení gelu (který nesmí obsahovat denaturační činidlo a měl by mít nižší viskozitu) a vlastnosti pufru (např. nižší pH nebo přítomnost glycerolu) ¹⁵¹.

Výhodou této metody je snadná příprava vzorků a již zmiňovaná detekce i neznámých mutací. Nevýhodou je nutnost značení fragmentů a poněkud komplikované vyhodnocení výsledků s komplikovanou interpretací.

Tuto metodu jsme použili při detekci somatických mutací v genu CDKN2A ve vzorcích slinivky a to především z toho důvodu, že zkoumané PCR fragmenty by pro CGCE vykazovaly příliš vysokou teoretickou denaturační teplotu (>57°C), která není dosažitelná na používaném genetickém analyzátoru.