

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Klíčová úloha výzkumných biobank v současné aplikované molekulární onkologii a klinickém výzkumu

Essential Role of Research Biobanks for Contemporary Applied Molecular
Oncology and Clinical Research

Hrstka R., Michalová E. et al



Editorial

Vážení čtenáři,

dostává se Vám do rukou v pořadí již třetí supplementum časopisu Klinická onkologie, které bylo připraveno odbornými pracovníky Regionálního centra aplikované molekulární onkologie (RECAMO) za podpory infrastruktury BBMRI_CZ (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure). Projekt RECAMO byl zahájen v roce 2010 při Masarykově onkologickém ústavu a jeho hlavní cíle představovaly rozšíření interdisciplinární spolupráce mezi významnými evropskými výzkumnými institucemi, širší propojení výzkumných a klinických pracovníků, zefektivnění využití získaných znalostí základního výzkumu pro aplikovaný výzkum, zahájení užší spolupráce s komerční sférou a zpřístupnění výsledků výzkumu v oblasti nádorových onemocnění širší veřejnosti v daném regionu. Projekt velké infrastruktury BBMRI_CZ byl zahájen v roce 2010 a v současnosti zahrnuje pět akademických institucí, které se podílejí na archivaci vzácného biologického materiálu onkologických pacientů, jenž je následně využíván v onkologickém výzkumu (www.bbMRI.cz, <http://www.bbMRI-eric.eu/web/guest/bbmriCZ>).

S jistou dávkou uspokojení lze konstatovat, že projekt a s ním spojený „start-up“ grant byl úspěšně realizován, došlo k významnému rozšíření výzkumné platformy v rámci Masarykova onkologického ústavu, pořízení unikátních přístrojů a zavedení špičkových technologií umožňujících konkurenceschopnost centra RECAMO v celosvětovém měřítku. Odrazem toho je nejen zvýšená publikační aktivita v rámci centra i Masarykova onkologického ústavu, ale i zvýšená míra grantových projektů včetně akvizice projektu RECAMO2020 (LO1413) NPU I MŠMT. Odrazem těchto skutečností jsou rovněž práce otištěné v tomto supplementu. Převažují v něm články přehledové, jejichž širší zaměření odráží současný rozsah studované problematiky v rámci RECAMO.

Věříme, že toto supplementum rozšíří stávající náhled na výzkumnou činnost centra a bude přínosem pro široké spektrum čtenářů.

*Za kolektiv autorů RECAMO
doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D.*



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



Obsah | Contents

Editorial	2S3
Co může přinést studium oligomerizace proteinů v procesu onkogeneze? What Can Study of Oligomerization of Proteins in the Process of Oncogenesis Bring Us? Coufalová D., Vojtěšek B., Hernychová L.	2S6
Analýza změn fosfoproteomu nádorové buněčné linie MDA-MB-468 v odpovědi na expresi izoforem p63 pomocí hmotnostní spektrometrie Analysis of Phosphoproteome Changes in MDA-MB-468 Cancer Cell Line in Response to Expression of p63 Isoforms Using Mass Spectrometry Dvořáková P., Nekulová M., Holčáková J., Vojtěšek B., Hernychová L.	2S11
„Cukry zasahují“ aneb glykomika na poli nádorových biomarkerů ‘Sugars Interfere’ or Glycomics in the Field of Cancer Biomarkers Zahradníková M., Vojtěšek B., Hernychová L.	2S20
Nrf2 – dve tváře regulátora antioxidačního systému Nrf2 – Two Faces of Antioxidant System Regulation Pastorek M., Müller P., Vojtěšek B.	2S26
Polo-like kináza 1 jako cíl protinádorové terapie Polo-like Kinase 1 as a Target for Anti-tumor Therapy Procházková I., Vojtěšek B.	2S32
PDLIM2 a jeho role v onkogenezi – tumor supresor nebo onkoprotein? PDLIM2 and Its Role in Oncogenesis – Tumor Suppressor or Oncoprotein? Maryáš J., Bouchal P.	2S40
Profil aktivace receptorových tyrozinkináz a mitogenem aktivovaných proteinkináz v terapii Maffucciho syndromu Profile of Activation of Tyrosine Kinases and MAP Kinases in Therapy of Maffucci Syndrome Melichárková K., Neradil J., Múdry P., Zitterbart K., Obermannová R., Skotáková J., Veselská R., Štěrbá J.	2S47
Rekombinantní protilátky a jejich využití v protinádorové terapii Recombinant Antibodies and Their Employment in Cancer Therapy Růčková E., Müller P., Vojtěšek B.	2S52
Imunologické aspekty v onkologii – cirkulující $\gamma\delta$ T lymfocyty Immunological Aspects in Oncology – Circulating $\gamma\delta$ T Cells Cibulka M., Selingerová I., Fědorová L., Zdražilová Dubská L.	2S60
Cirkulující nádorová DNA v krvi a její využití jako potenciálního biomarkeru nádorových onemocnění Circulating Tumor DNA in Blood and Its Utilization as a Potential Biomarker for Cancer Ondroušková E., Hrstka R.	2S69
Adenovirusové vektory v génové terapii Adenoviral Vectors in Gene Therapy Pjehová M., Hernychová L., Tomašec P., Wilkinson G. W., Vojtěšek B.	2S75

Nádory u adolescentů Cancer in Adolescents Bajčiová V., Onderčová Z., Kodytková D.	2S81
Bioinformatika a sekvenování nové generace Bioinformatics and Next-generation Sequencing Krejčí A., Müller P., Vojtěšek B.	2S91
IntegRECAMO: úspěšná realizace projektu OP VK	2S97

Partneři supplementa



Bezplatná distribuce časopisu členům České onkologické společnosti České lékařské společnosti
Jana Evangelisty Purkyně je uskutečněna za podpory společnosti



Co může přinést studium oligomerizace proteinů v procesu onkogeneze?

What Can Study of Oligomerization of Proteins in the Process of Oncogenesis Bring Us?

Coufalová D., Vojtěšek B., Hernychová L.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Mnoho buněčných proteinů tvoří oligomery. Rovnováha mezi monomerním a oligomerním stavem těchto proteinů hraje důležitou roli v regulaci proteinové aktivity. Ovlivnění oligomerizace se tudíž nabízí jako zajímavý přístup při vývoji nových terapeutických látek. Cílem tohoto přehledového článku je shrnout informace o procesu proteinové oligomerizace a možnostech její cílené modulace. Role oligomerizace v onkogenezi je prezentována na příkladu nádorového supresorového proteinu p53, u kterého jsou v současné době zkoumány látky stabilizující jeho tetramerní strukturu. Z metod pro studium oligomerizace je zde představena metoda vodík/deuteriové výměny ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která je vhodná pro detekci protein-proteinových interakcí a analýzu dynamiky oligomerizace.

Klíčová slova

proteomika – vývoj nových léků – nádorový supresorový protein p53 – oligomerizace – vodík/deuteriová výměna

Summary

Many cellular proteins form oligomers. The equilibrium between monomeric and oligomeric states of these proteins is important for the regulation of protein activity. Modulation of the oligomerization equilibrium could be an interesting approach in the development of new therapeutic agents. This review summarizes information about protein oligomerization and modulation of this process, demonstrating the role of oligomerization in oncogenesis by tumor suppressor protein p53, which forms tetrameric structure. Today, many studies focus on finding compounds that stabilize its tetramers. Among the methods for studying oligomerization, we present hydrogen/deuterium exchange method coupled with mass spectrometry which is suitable for the detection of protein-protein interaction and analysis of oligomerization dynamics.

Key words

proteomics – drug design – tumor suppressor protein p53 – oligomerization – hydrogen/deuterium exchange

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projektem MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010-004).

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), MEYS – NPS I – LO1413, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Dominika Coufalová

Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: dominika.coufalova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 9. 4. 2015

Přijato/Accepted: 15. 6. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2015256>

Úvod

Proteiny se schopností oligomerizace reprezentují významný podíl všech buněčných proteinů [1]. Oligomery složené z identických proteinových podjednotek se nazývají homooligomery a oligomery tvořené interakcí mezi různými proteinovými podjednotkami jsou označovány jako heterooligomery. Oligomery většinou obsahují sudý počet podjednotek a tvoří symetrické struktury [2]. Síla interakce mezi podjednotkami a stabilita oligomerů se u různých komplexů liší a je závislá na koncentraci, teplotě a pH.

Procesu oligomerizace se účastní celá řada regulačních faktorů, které udržují dynamickou rovnováhu mezi jednotlivými oligomerními stavy proteinů v buňce. Navázání regulačních faktorů na podjednotky oligomerů může způsobovat změny ve struktuře podjednotek, a tím i dramatické změny ve struktuře a funkci celého oligomeru. Dříve se předpokládalo, že v důsledku strukturních změn se mění pouze struktura

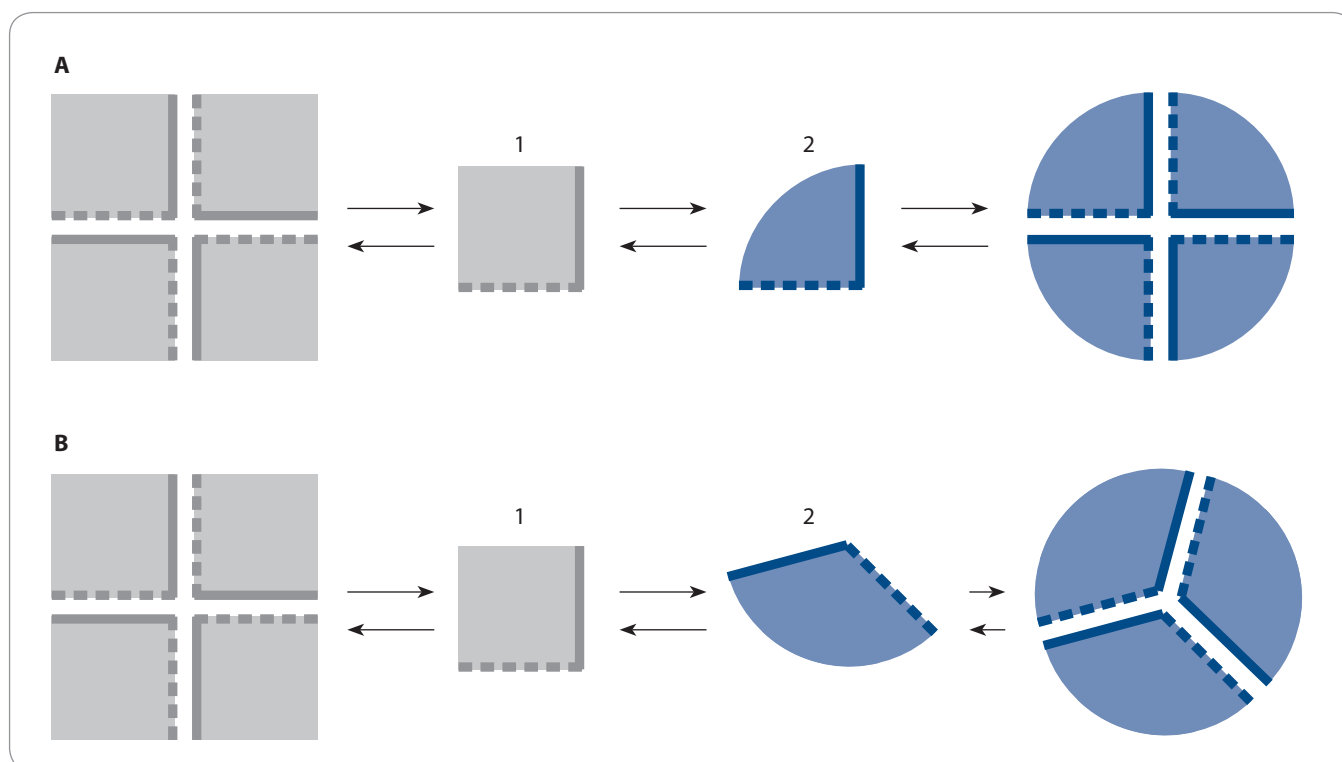
oligomeru, ale ne jeho stechiometrie (obr. 1) [3]. V roce 2005 byla publikována nová teorie oligomerizace, která ukázala na příkladu porfobilinogen syntázy (porfobilinogen synthase – PBGS; EC 4.2.1.24), že struktura proteinových podjednotek oligomeru stechiometrii oligomerizace ovlivňuje [4]. Dimery PBGS na základě alosterické modulace hořčíkem oligomerizují v inaktivní hexamer nebo v aktivní oktamer [5]. Je pravděpodobné, že podobná regulace bude nalezena i u dalších proteinů [6].

Proč spolu proteiny tvoří stabilní oligomerní komplexy? Tato schopnost jim přináší řadu funkčních výhod [1]. Jednou z výhod je, že exprese podjednotek o nižší molekulové hmotnosti snižuje pravděpodobnost chyby při ribozomální syntéze. Tudiž oligomer složený z malých proteinových podjednotek bude syntetizován bezchybně s vyšší pravděpodobností než protein se srovnatelnou velikostí. Další výhodou je možnost modulace aktivity proteinů ovlivněním je-

jich oligomerizace. Je-li protein aktivní pouze v oligomerní formě, lze iniciací oligomerizace protein aktivovat a její inhibicí naopak inaktivovat bez zásahů do proteinové exprese. V neposlední řadě je výhodou oligomerů jejich odolnost vůči denaturaci a následné degradaci.

Oligomery v onkogenezi

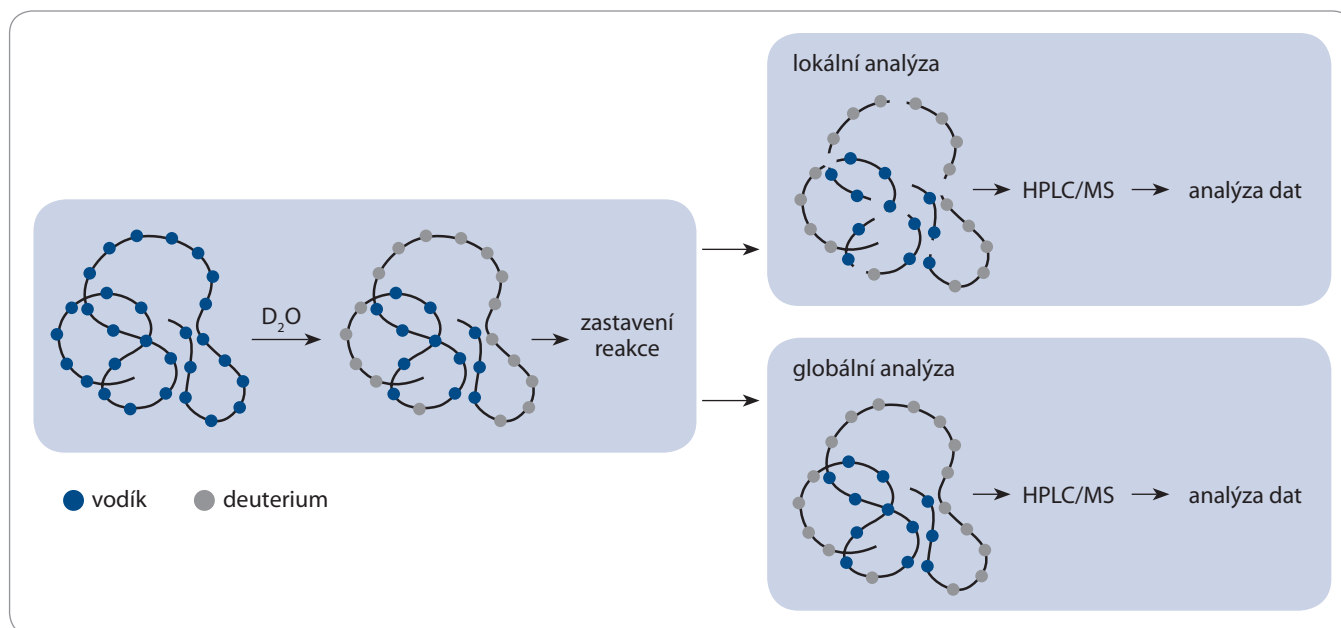
Jedním z nejstudovanějších proteinů tvořících oligomery je nádorový supresorový protein p53. Protein p53 je sekvencně specifický transkripční faktor, který může během buněčného stresu zastavit buněčný cyklus, aktivovat mechanismy pro opravu DNA, vyvolat senescenci, nebo apoptózu buněk [7]. Vzhledem k antionkogenním vlastnostem proteinu p53 jsou předmětem mnoha výzkumů faktory, které aktivitu tohoto proteinu regulují. Protein p53 se na DNA váže prostřednictvím DNA vazebné domény ve formě dimerů. Tyto dimery po vazbě k DNA vzájemně oligomerizují a dávají vzniknout aktivnímu tetrameru,



Obr. 1. Teorie oligomerizace.

A. Klasická teorie: aktuální konformace proteinu ovlivňuje strukturu výsledného oligomeru, ale nemá vliv na jeho stechiometrii. Protein v konformaci 1 i v konformaci 2 tvoří tetramer.

B. Nová teorie: aktuální konformace proteinu určuje strukturu i stechiometrii oligomeru. Protein v konformaci 1 tvoří tetramer, avšak změní-li se jeho struktura v konformaci 2, tvoří trimer.



Obr. 2. H/D výměna – globální a lokální analýza.

H/D výměna je zahájena inkubací proteinu v pufru s D_2O , kdy dochází k výměně amidových vodíků za deuteria z pufru. Při lokální analýze je po zastavení reakce protein štěpen a výsledné peptidy jsou separovány kapalinovou chromatografií (high performance liquid chromatography – HPLC) a měřeny hmotnostním spektrometrem (mass spectrometry – MS). Globální analýza vynechává krok štěpení a protein měří pomocí HPLC/MS v nativní formě.

který spouští transkripci [8,9]. Největší množství mutací vedoucích k inaktivaci proteinu p53 bylo popsáno právě v jeho DNA vazebné doméně [10]. Avšak i mutace v oligomerizační doméně, které blokují oligomerizaci, mohou způsobovat snížení nebo až zastavení jeho transkripční aktivity [9]. Mutace v oligomerizační doméně nepůsobí pouze na aktivitu proteinu p53, ale také mají vliv na jeho lokalizaci v buňce. V oligomerizační doméně se nachází signální sekvence pro export proteinu z jádra do cytoplazmy. U tetramerů je tato sekvence na rozdíl od dimerů a monomerů skrytá [11]. Monomery a dimery proteinu p53 jsou transportovány z jádra do cytoplazmy, kde mohou být degradovány ubiquitin-proteazomovou cestou, zatímco aktivní tetramery zůstávají v jádře. Vzhledem k významnosti proteinu p53 a důležitosti jeho tetramerizace roste počet studií, které se zabývají hledáním nízkomolekulárních ligandů stabilizujících jeho tetramerní formu [12–15]. Tyto ligandy by v budoucnu mohly dát základ novým terapeutickým látkám. Kromě proteinu p53 je proces oligomerizace zkoumán

i u dalších proteinů spojovaných s rakovinou, a to např. u proteinů AGR2 [16], MDM2 [17] a pyruvát kinázy M2 [18].

Ovlivňování oligomerizace a jeho přínos

Modulace oligomerizace je velice zajímavý přístup ve vývoji nových terapeutických látek. Jejím cílem může být inhibice oligomerizace anebo naopak stabilizace vznikajících oligomerů. Inhibovat oligomerizaci je možné za použití kompetitivních molekul, které se vážou přímo na oligomerizační místa proteinů, čímž zabraňují jejich vzájemné interakci [19,20]. Ke stabilizaci oligomerních molekul jsou využívány ligandy, které přemostňují vazbu mezi podjednotkami oligomeru a tím ji upevňují [14], nebo se vážou na jednotlivé monomery a cestou alosterických strukturních změn proteinů zvyšují jejich afinitu [21]. Jedním z dnes již používaných léků, který ovlivňuje oligomerizaci proteinů, je paclitaxel. Tento lék je užíván samostatně nebo v kombinaci s dalšími léky jako cytostatikum k léčbě rakoviny vaječníků, prsu, plic a dalších tkání [22]. Paclitaxel se váže na dimery tubulinu, stabilizuje vznikající mikrotubuly a tím inhibuje dělení buněk [23,24].

kající mikrotubuly a tím inhibuje dělení buněk [23,24].

Metody studia oligomerů

Řada látek ovlivňujících oligomerizaci proteinů byla objevena náhodou [25]. Avšak díky rozvoji nových metod množství publikací zabývajících se hledáním látek zacílených na modulaci oligomerizace proteinů v posledních letech stoupá. K analýze struktury proteinů a jejich oligomerních komplexů jsou používány metody rentgenové krystalografie a nukleární magnetické rezonance [26]. Zatímco při rentgenové krystalografii je hlavní nevýhodou nutnost krystalizace proteinů, nukleární magnetická rezonance sice proteiny měří v roztoku, ale nelze ji použít pro analýzu velkých komplexů. Vzhledem k těmto omezením jsou k určení oligomerního stavu používány také metody gelové chromatografie a analytické ultracentrifugace, které navíc dokáží určit i relativní zastoupení jednotlivých oligomerů [27,28]. S uvedenými technikami se lze v literatuře setkat nejčastěji, a ačkoliv jsou schopny poskytnout detailní informace o struktuře oligomerních

komplexů, nedokáží měřit molekulární dynamiku a drobné konformační změny proteinů.

Vodík/deuteriová výměna

Metoda vodík/deuteriové (H/D) výměny dokáže nejen detekovat koexistující monomerní a oligomerní formy proteinů, ale také analyzovat dynamiku oligomerizace a najít vazebná místa proteinů. H/D výměna je s oblibou spojována s hmotnostní spektrometrií [29], ale k detekci vyměněných vodíků je možné použít i nukleární magnetickou rezonanci [30]. Metoda je založena na principu výměny amidových vodíků proteinů za deuteria z okolního roztoku [31]. Vodíky, které tvoří vodíkové můstky, případně nepřístupné vodíky uvnitř složeného proteinu, jsou vůči výměně chráněny. Naopak snadno přístupné vodíky na povrchu proteinu jsou vyměňovány za deuteria s vysokou rychlostí. Jelikož je deuterium těžší než vodík, způsobuje jeho zabudování posun v hmotnostních spektrech k vyšším hmotnostem. Díky tomu je možné v hmotnostních spektrech od sebe odlišit různé konformace proteinu, které se liší v počtu zabudovaných deuterií.

Při H/D výměně existují dva základní typy analýz – lokální a globální [32]. U obou analýz je protein inkubován v pufru s D₂O a výměnná reakce je zastavována snížením pH a snížením teploty (obr. 2). U lokální analýzy je protein následně štěpen pepsinem nebo jinou proteázou štěpící v oblasti kyselého pH. Vzniklé peptidy jsou separovány pomocí kapalinové chromatografie on-line spojené s hmotnostním spektrometrem. Naopak u globální analýzy je štěpení proteinu vynecháno a protein je analyzován v hmotnostním spektrometru v nativní formě. Globální analýza je užitečná k celkovému náhledu na chování proteinů, k detekci protein-proteinových interakcí a k odhalení přítomnosti oligomerních forem proteinů ve vzorku. Lokální analýza poskytuje informace na úrovni peptidů a je schopna lokalizovat místa protein-proteinových interakcí a alosterických strukturních změn proteinů. Ke studiu oligomerizace proteinů je využívána globální i lokální analýza [33,34].

Je-li v analyzovaném vzorku protein přítomen v monomerní i oligomerní formě, je možné oba tyto stavy sledovat zároveň v jednom hmotnostním spektru. U monomerního proteinu lze očekávat vyšší rychlost výměny vodíků za deuteria než u proteinu v oligomerní formě, jelikož je celý jeho povrch přístupný okolnímu roztoku. V oligomerním proteinu si podjednotky vzájemně stíní, což způsobuje snížení deuterace ve stíněných místech. Díky tomu jsou ve výsledném hmotnostním spektru přítomné dva píky, které náležejí proteinu v monomerní a oligomerní formě.

Metodu H/D výměny je tedy možné využít k analýze struktury oligomerních komplexů, ale je také vhodná ke studiu látek ovlivňujících oligomerizaci proteinů, které mohou mít terapeutický potenciál.

Závěr

Detailní porozumění protein-proteinovým interakcím, mezi které patří i tvorba oligomerních struktur, je nezbytné k důkladnému pochopení biologických dějů a může být klíčem k návrhu nových terapeutických látek. Pro studium protein-proteinových interakcí je unikátní metoda H/D výměna, která lokalizuje vazebná místa proteinů a analyzuje jejich alosterické strukturní změny. Pomocí této metody lze studovat i interakce mezi potenciálními léčivy a proteiny a vliv těchto léčiv na změnu proteinové struktury a na změny v interakcích mezi studovanými proteiny.

Literatura

- Ali MH, Imperiali B. Protein oligomerization: how and why. *Bioorganic Med Chem* 2005; 13(17): 5013–5020.
- Goodsell DS, Olson AJ. Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000; 29: 105–153.
- Koshland DE, Némethy G, Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 1966; 5(1): 365–385.
- Jaffe EK. Morphoeins – a new structural paradigm for allosteric regulation. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(9): 490–497.
- Jaffe EK, Lawrence SH. Allostery and the dynamic oligomerization of porphobilinogen synthase. *Arch Biochem Biophys* 2012; 519(2): 144–153. doi: 10.1016/j.abb.2011.10.010.
- Selwood T, Jaffe EK. Dynamic dissociating homo-oligomers and the control of protein function. *Arch Biochem Biophys* 2012; 519(2): 131–143. doi: 10.1016/j.abb.2011.11.020.
- Šmardová J, Koptíková J. Brazílský příběh mutace p53 R337H. *Klin Onkol* 2014; 27(4): 247–254. doi: 10.14735/amko2014247.

- Kitayner M, Rozenberg H, Kessler N et al. Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Mol Cell* 2006; 22(6): 741–753.
- Kawaguchi T, Kato S, Otsuka K et al. The relationship among p53 oligomer formation, structure and transcriptional activity using a comprehensive missense mutation library. *Oncogene* 2005; 24(46): 6976–6981.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19(6): 607–614.
- Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS et al. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* 1999; 18(6): 1660–1672.
- Salvatorella X, Martinell M, Gairí M et al. A tetraguanidinium ligand binds to the surface of the tetramerization domain of protein p53. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43(2): 196–198.
- Martinell M, Salvatorella X, Fernández-Carriazo J et al. Synthetic ligands able to interact with the p53 tetramerization domain. Towards understanding a protein surface recognition event. *ChemBiochem* 2006; 7(7): 1105–1113.
- Kamada R, Yoshino W, Nomura T et al. Enhancement of transcriptional activity of mutant p53 tumor suppressor protein through stabilization of tetramer formation by calix[6]arene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20(15): 4412–4415. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.06.053.
- Gabizon R, Brandt T, Sukenik S et al. Specific recognition of p53 tetramers by peptides derived from p53 interacting proteins. *PLoS One* 2012; 7(5): e38060. doi: 10.1371/journal.pone.0038060.
- Gray TA, Murray E, Nowicki MW et al. Development of a fluorescent monoclonal antibody-based assay to measure the allosteric effects of synthetic peptides on self-oligomerization of AGR2 protein. *Protein Sci* 2013; 22(9): 1266–1278. doi: 10.1002/pro.2299.
- Graves B, Thompson T, Xia M et al. Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(29): 11788–11793. doi: 10.1073/pnas.1203789109.
- Anastasiou D, Yu Y, Israelsen WJ et al. Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nat Chem Biol* 2012; 8(10): 839–847.
- Miller GD, Woessner DW, Sirch MJ et al. Multidomain targeting of Bcr-Abl by disruption of oligomerization and tyrosine kinase inhibition: toward eradication of CML. *Mol Pharm* 2013; 10(9): 3475–3483. doi: 10.1021/mp400323c.
- He MM, Smith AS, Oslob JD et al. Small-molecule inhibition of TNF- α . *Science* 2005; 310(5750): 1022–1025.
- Teufel DP, Freund SM, Bycroft M et al. Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(17): 7009–7014.
- Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med* 1997; 48: 353–374.
- Mitra A, Sept D. Taxol allosterically alters the dynamics of the tubulin dimer and increases the flexibility of microtubules. *Biophys J* 2008; 95(7): 3252–3258. doi: 10.1529/biophysj.108.133884.
- Xiao H, Verdier-Pinard P, Fernandez-Fuentes N et al. Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(27): 10166–10173.
- Gabizon R, Friedler A. Allosteric modulation of protein oligomerization: an emerging approach to drug design. *Front Chem* 2014; 2(9): 1–15. doi: 10.3389/fchem.2014.00009.
- Veldkamp CT, Seibert C, Peterson FC et al. Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12. *Sci Signal* 2008; 1(37): ra4. doi: 10.1126/scisignal.1160755.

27. Lee CC, Lin TW, Ko TP et al. The hexameric structures of human heat shock protein 90. *PLoS One* 2011; 6(5): e19961. doi: 10.1371/journal.pone.0019961.
28. Aprile FA, Dhulesia A, Stengel F et al. Hsp70 oligomerization is mediated by an interaction between the inter-domain linker and the substrate-binding domain. *PLoS One* 2013; 8(6): e67961. doi: 10.1371/journal.pone.0067961.
29. Hamuro Y, Coales SJ, Southern MR et al. Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Biomol Tech* 2003; 14(3): 171–182.
30. Dempsey CE. Hydrogen exchange in peptides and proteins using NMR spectroscopy. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2001; 39(2): 135–170.
31. Hvidt A, Nielsen SO. Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem* 1966; 21: 287–386.
32. Wales TE, Eggertson MJ, Engen JR. Mass spectrometry data analysis in proteomics. *Methods Mol Biol* 2013; 1007: 263–288.
33. Paslawski W, Mysling S, Thomsen K et al. Co-existence of two different α -synuclein oligomers with different core structures determined by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014; 53(29): 7560–7563. doi: 10.1002/anie.201400491.
34. Mobley JA, Poliakov A. Detection of early unfolding events in a dimeric protein by amide proton exchange and native electrospray mass spectrometry. *Protein Sci* 2009; 18(8): 1620–1627. doi: 10.1002/pro.176.

Analýza změn fosfoproteomu nádorové buněčné linie MDA-MB-468 v odpovědi na expresi izoformem p63 pomocí hmotnostní spektrometrie

Analysis of Phosphoproteome Changes in MDA-MB-468 Cancer Cell Line in Response to Expression of p63 Isoforms Using Mass Spectrometry

Dvořáková P., Nekulová M., Holčáková J., Vojtěšek B., Hernychová L.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Nádorové buňky se od buněk normální tkáně liší mimo jiné aktivací různých signálních drah. Tyto změny jsou podmíněny odlišnou aktivitou kináz a fosfatáz způsobujících rozdíly ve fosforylaci proteinů. Detekce těchto změn je zásadní pro cílenou léčbu zaměřenou na inhibici nebo aktivaci konkrétních signálních drah. Existují různé metody, kterými lze fosforylaci proteinů stanovit. Jednou z vhodných metod schopných charakterizovat fosfoproteom je hmotnostní spektrometrie. Tento článek je zaměřen na analýzu změn ve fosfoproteomu buněčné linie MDA-MB-468 odvozené od nádoru prsu s vnesenými geny kódujícími izoformy proteinu p63. Buňky s tetracyklinem indukovanou expresí izoformem proteinu p63 byly srovnány s kontrolními buňkami s přirozenou expresí p63. Denaturované proteiny z buněčného lyzátu byly nejprve enzymaticky štěpeny na peptidy a následně obohaceny o fosfopeptidy. Měření probíhalo pomocí kapalinového chromatografu spojeného s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite. Každý vzorek byl analyzován třemi různými hmotnostně spektrometrickými metodami s cílem najít nejvhodnější podmínky pro detekování fosforylovaných peptidů. Z naměřených dat pak byly identifikovány a kvantifikovány fosfoproteiny. Počet fosfoproteinů identifikovaných jednotlivými hmotnostně spektrometrickými metodami byl srovnatelný, avšak každou metodou bylo získáno několik unikátních fosforylovaných proteinů. Analýzou získaných dat bylo zjištěno, že v buňkách MDA-MB-468 obě izoformy proteinu p63 (TAp63a a ΔNp63a) ovlivňují zejména fosforylaci proteinů odpovědných za sestřih RNA.

Klíčová slova

hmotnostní spektrometrie – fosfoproteiny – signální dráhy – izoformy p63 – rakovina prsu

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projektem MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805), IGA NT/14602-3/2013 a BBMRI_CZ (LM2010004).

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), by the project MEYS – NPS I – LO1413, by MH CZ – DRO (MMCI, 002 09805), by IGA NT/14602-3/2013 and BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Ing. Petra Dvořáková, Ph.D.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: petra.dvorakova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 9. 4. 2015

Přijato/Accepted: 20. 7. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152511>

Summary

Compared to normal cells, tumor cells can show different activity of kinases and phosphatases resulting in altered phosphorylation states of proteins affecting their activity within various signaling pathways. The detection of these alterations is essential for development of targeted therapy based on activation/inhibition of specific signaling pathways. Various methods can be used for detection of protein phosphorylation; however, a comprehensive assessment of phosphoproteome is performed by mass spectrometry. The differences in phosphoproteome were studied using MDA-MB-468 cell line (with incorporated genes encoding isoforms of p63) derived from breast carcinoma. Cells with tetracycline-induced expression of the p63 isoforms were compared to control cells with wild-type expression. Denatured proteins from cell lysates were digested to peptides, enriched for phosphopeptides and subsequently separated using liquid chromatograph coupled with mass spectrometer Orbitrap Elite. Three different mass spectrometric methods were used for each sample analysis to find the most suitable conditions for the detection of phosphorylated peptides. Then phosphoproteins were identified and quantified. The number of identified phosphoproteins using all chosen mass spectrometric methods was similar; however, each method showed several unique phosphorylated proteins. Our analysis revealed that both p63 isoforms (TAp63α a ΔNp63α) mainly affected phosphorylation of proteins associated with RNA splicing in MDA-MB-468 cells.

Key words

mass spectrometry – phosphoproteins – signaling pathways – p63 isoforms – breast cancer

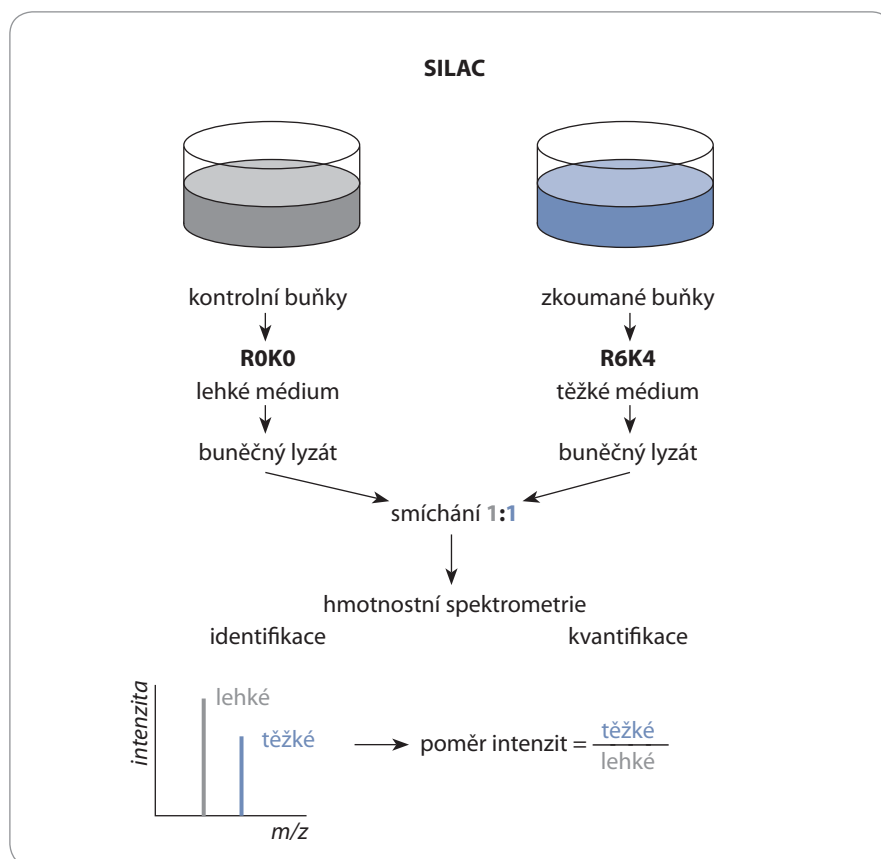
Úvod

Fosforylace proteinů je jedna z nejrozšířenějších kovalentních posttranslačních modifikací [1] a hraje klíčovou úlohu v regulaci buněčných signálních drah. Proteiny jsou v buňce fosforylovány prostřednictvím proteinových kináz, které katalyzují přenos fosfátové skupiny z adenosintrifosfátu na serin, treonin a tyrozin, k defosforylaci proteinů pak dochází prostřednictvím proteinových fosfatáz. Onkologická onemocnění jsou často spojena s chybnou funkcí proteinových kináz či fosfatáz a místa fosforylací bývají v nádorových buňkách mutována [2]. Fosforylace se rovněž podílí na regulaci proliferace nádorové buňky, signalizaci onkogenních kináz, regulaci transkripce genů a aktivity nádorového supresoru p53 a mnoha dalších proteinů. Kontrola hladiny fosforylace různých proteinů je proto cílem protinádorové terapie, která využívá především různé tyrozinkinázové inhibitory, jako je např. gefitinib, imatinib, sorafenib atd. [3].

K identifikaci a kvantifikaci změn fosforylace proteinů je možné využít různé metody a přístupy. Vhodný je test kinázové aktivity *in vitro* v přítomnosti substrátu a adenosintrifosfátu. Další možností je inkubování buněk s radioaktivně značeným ^{32}P -ortofosfátem s následnou separací získaných proteinů pomocí gelové elektroforézy. Lze také použít metody založené na existenci fosfo-specifických protilátek, jako je imunoblot, ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) a průtoková cytometrie. Úspěšná

detekce fosfoproteinů je však závislá na specifitě a afinitě protilátky a také na její komerční dostupnosti.

Moderní metoda, pomocí které je možné změny ve fosfoproteomu posoudit komplexně, je hmotnostní spek-



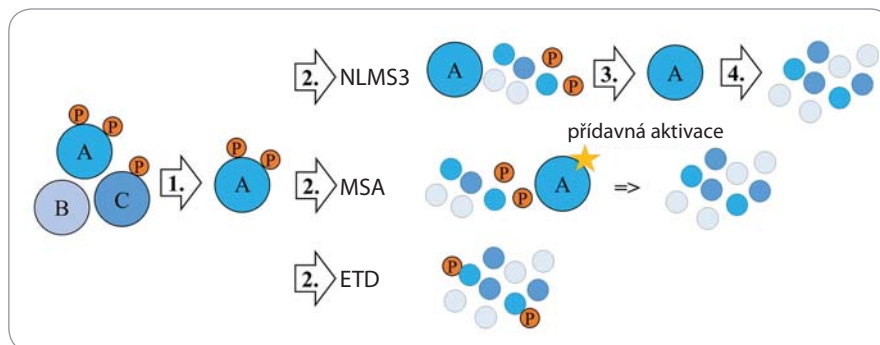
Obr. 1. Metabolické značení aminokyselin se aplikuje na živé buněčné kultury.

Dochází k inkorporaci těžkých aminokyselin lyzinu a argininu (jejichž hmota je díky izotopům uhlíku a dusíku navýšena – v případě lyzinu o 4, argininu o 6 Da) obsažených v těžkém médiu (R6K4) do nově syntetizovaných proteinů. Zároveň se kultivují buňky v lehkém médiu (R0K0) bez těžkých aminokyselin, které slouží jako kontrola. Následně se buněčné lyzáty smíchají v poměru 1 : 1 (lehké : těžké). Identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie se získají údaje ohledně intenzit analytů (zvláště pro kontrolu a zvláště pro zkoumaný vzorek). Poměrem intenzit se pak určí relativní kvantifikace proteinů ve vzorcích.

trometrie. Lze ji využít pro identifikaci fosfoproteinů i pro kvantifikaci změn ve fosfoproteomu. K tomu jsou využívány speciální techniky, mezi něž patří metabolické značení aminokyselin aplikované na živé buněčné kultury (stable isotope labeling with amino acids in cell culture – SILAC) [4], nebo izotopické či izobarické značení peptidů [5,6]. Při SILAC jsou během kultivace do nově syntetizovaných proteinů inkorporovány aminokyseliny značené stabilními izotopy lyzinu a argininu, paralelně jako kontrola jsou kultivovány buňky v lehkém médiu s přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami (obr. 1).

Z důvodu výskytu nízké koncentrace fosforylovaných proteinů v buňkách je nutné použít metodu, která specificky tyto proteiny zakoncentruje. Existuje celá řada přístupů, kterými lze obohatení provést, a to na úrovni proteinů či peptidů [7]. Obvykle se používají techniky pro obohacování fosfopeptidů, kdy je nejprve směs proteinů proteolyticky štěpena a vzniklé peptidy jsou následně obohaceny o fosforylované formy. Nejčastěji se volí obohacení fosfopeptidů oxidem titaničitým (TiO_2) [8] nebo chelatační afinitní chromatografie (immobilized metal ion affinity chromatography – IMAC) [9]. Při TiO_2 obohacení se fosforylované peptidy v kyselém prostředí navazují na TiO_2 částice přes svou fosfátovou OH-skupinu a po odstranění nefosforylovaných peptidů jsou z částic uvolněny změnou pH. V případě IMAC se záporně nabitý fosfopeptid navazuje na ionty kovů chelátované na částice pokryté nitrilotrioctovou nebo iminodiacetovou kyselinou.

Detekce fosfopeptidů může být provedena různými typy hmotnostních spektrometrů (mass spectrometer – MS). MS zaznamená efektivní hmotu fosfopeptidu (poměr hmotnosti a náboje, m/z), jež je navýšena o fosfátový zbytek (98 Da, 80 Da) [10]. Pomocí tandemového hmotnostního spektrometru (MS/MS) lze kromě identifikace určit i přesnou aminokyselinu, která byla fosforylována. Pro vznik fragmentačních spekter je třeba detekovaný fosfopeptid (prekurzor) izolovat a následně jej fragmentovat na menší ionty (obr. 2). Fragmentace bývá nejčastěji uskuteč-



Obr. 2. Zjednodušené schéma metod, které se používají pro analýzu fosforylovaných peptidů MS.

Ze směsi detekovaných peptidů/fosfopeptidů je jeden izolován a následně fragmentován. V případě MSA a NLM3 metody je použita CID fragmentace, při které dochází ke ztrátě fosfokupiny navázané na serinu či treoninu. Vzniklé fragmenty obsahují fragment neutrální ztráty, který je v případě metody MSA fragmentován pomocí přídavné fragmentace. Metoda NLM3 fragment neutrální ztráty izoluje a fragmentuje zvlášť. Při ETD fragmentaci nedochází ke ztrátě fosforylace a lze tak přímo identifikovat fosforylace.

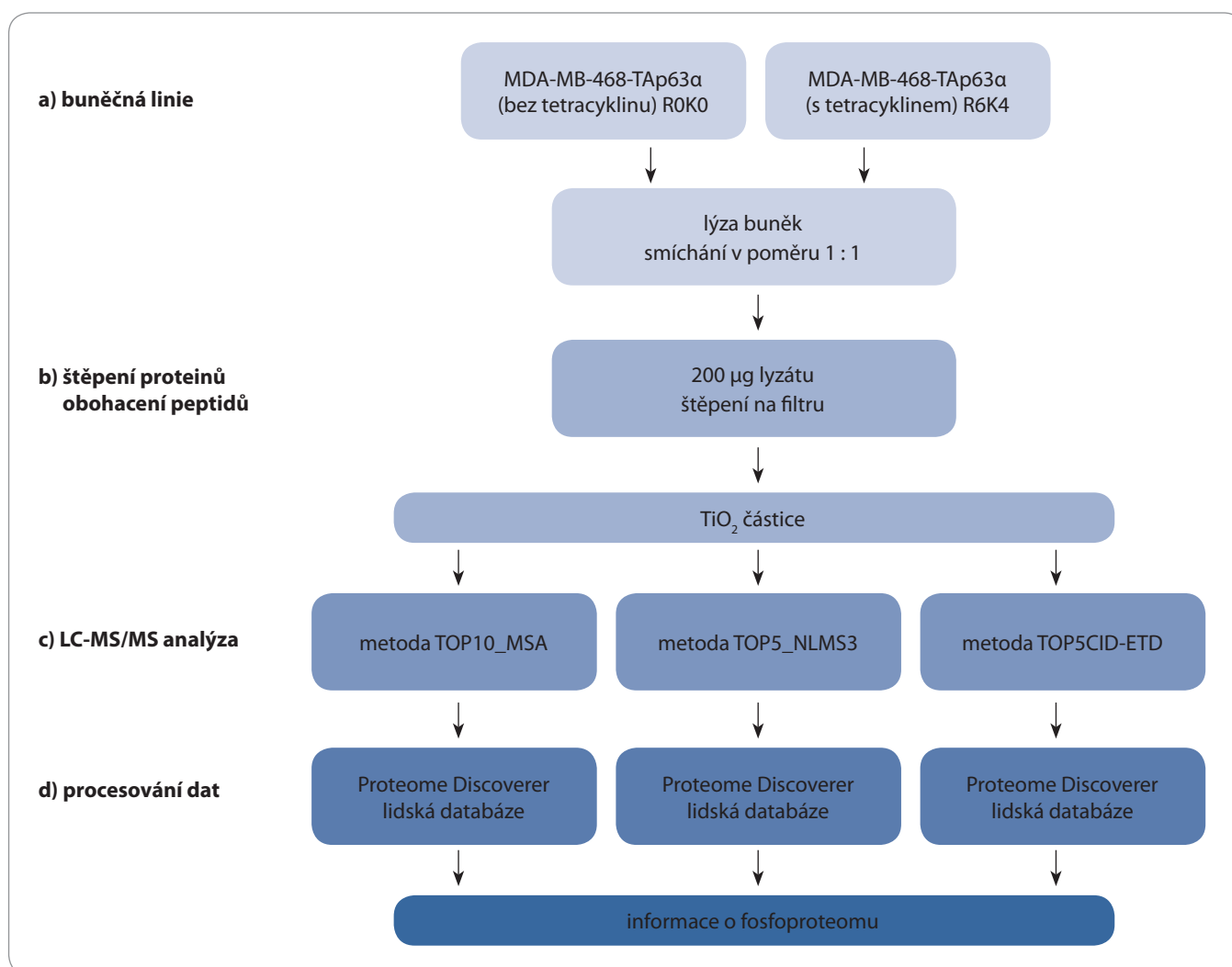
něna pomocí kolize iontů peptidů s molekulami plynu (collision induced dissociation – CID), při níž fosfopeptidy ztrácí fosfokupinu (fragment neutrální ztráty) [11]. Měří se tedy sken neutrálních ztrát (neutral loss – NLM3), kdy je fragmentační spektrum použito pro identifikování fragmentu neutrální ztráty. Tento fragment je izolován a znovu fragmentován [12]. Je také možné využít vícestupňovou aktivaci (multistage activation – MSA), při které jsou prekurzorový ion a ionty neutrálních ztrát fragmentovány dohromady. Dalším vhodným typem je fragmentace, při níž kladně nabitý peptid reaguje s elektrony např. s fluoranthenovým aniontem (electron transfer dissociation – ETD). Nedochází při ní ke ztrátě fosforylace, a tudíž mohou být přímo identifikovány [12].

Před MS je vhodné předřadit kapalinovou chromatografii, díky které dochází ke snížení komplexity vzorku. Směs fosfopeptidů je nejprve zachycena na analytické koloně a poté jsou fosfopeptidy postupně eluovány z kolony přímo do MS.

Naměřená data musí být hodnocena pomocí speciálních programů – fosfoproteomika využívá programy MaxQuant [13] nebo Proteome Discoverer s algoritmem PhosphoRS 3.1 [14] predikující lokalizaci fosforylovaných míst. Spektra získaná MS/MS analýzou jsou pomocí vyhledávacích algoritmů (Mascot, Sequest) porovnávána s proteinovou da-

tabází, při kvantitativních studiích je navíc určena změna fosforylace oproti kontrolnímu vzorku a celkové expresi proteinu. Proteiny vykazující signifikantní kvantitativní změny se mohou za pomoci speciálních programů, např. Ingenuity Pathway Analysis, David, PathVisio, využít ke studiu signálních drah [15].

Analýza fosfoproteomu byla provedena v buněčné linii MDA-MB-468 s indukibilní expresí N-koncových izoform proteinu p63 (TAp63a a ΔNp63a), které se od sebe liší přítomností N-koncové transaktivační domény. Linie MDA-MB-468 je odvozena od nádoru prsu bazálního typu a vykazuje triple-negativní fenotyp, tj. je negativní pro estrogenový a progesteronový receptor a bez zvýšené hladiny Her2. Do této linie byly vneseny geny kódující izoformy proteinu p63, TAp63a nebo ΔNp63a, jejichž exprese je indukovatelná tetracyklinem. Protein p63 má zásadní význam v průběhu ontogeneze epitelálních struktur včetně mléčné žlázy a jeho hladina je často zvýšená u spinocelulárních karcinomů [16–18]. V případě karcinomu prsu byla popsána exprese proteinu p63 u jeho bazálního typu, který je často spojen s triple-negativním fenotypem [19]. Buněčná linie MDA-MB-468 je proto vhodným modelem pro studium funkce izoform p63 u karcinomu prsu. Protein p63 plní funkci transkripčního faktoru a v nádorové buňce je zapojen do mnoha sig-



Obr. 3. Schéma experimentu pro buněčnou linii MDA-MB-468-TAp63α.

Buněčná linie byla kultivována bez tetracyklinu (kontrola) nebo s přidavkem antibiotika. Buněčné lyzáty z těchto buněčných kultur byly smíchány. Denaturované proteiny byly štěpeny na peptidy, které byly pomocí TiO_2 částic obohaceny o fosfopeptidy. Měření probíhalo pomocí LC-MS/MS třemi různými metodami. Z každého měření byla získána unikátní data, která byla zvlášť zpracována. Stejným způsobem byly analyzovány vzorky buněčné linie MDA-MB-468- $\Delta\text{Np63}\alpha$ a MDA-MB-468-pcDNA6/TR.

nálních drah, např. EGFR (epidermal growth factor receptor), FGFR (fibroblast growth factor receptor), Wnt/ β -catenin, Notch a dalších [20–22]. Předpokládá se tedy, že výrazně ovlivňuje i fosfoproteom nádorové buňky. Isoforma TAp63 α plní funkce nádorového supresoru a inhibitoru metastazování [23,24]. Isoforma $\Delta\text{Np63}\alpha$ byla původně považována pouze za dominantně negativní inhibitor aktivity TAp63 a případně i dalších členů rodiny p53 [25], dnes je však známo, že je také schopna aktivovat transkripci cílových genů [26].

Cílem této práce je nalezení optimální metody pro detekování fosfory-

lovaných proteinů ve výše popsané buněčné linii a zároveň zjistit změny ve fosfoproteomu.

Materiál a metody

V rámci studie byly porovnány fosfoproteiny buněk MDA-MB-468 s indukci a bez indukce exprese izoformou p63 (TAp63 α a $\Delta\text{Np63}\alpha$) pomocí tetracyklinu. Buněčné lyzáty byly po změření koncentrace smíchány, denaturované proteiny štěpeny a peptidy obohaceny o fosfopeptidy pomocí TiO_2 . Takto připravené vzorky (celkem tři) byly změřeny třemi různými hmotnostně spektrometrickými metodami s předřazenou

kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS). Získaná data z každého měření byla zpracována zvlášť pomocí programu Proteome Discoverer (obr. 3).

Buněčná linie

Buněčné linie MDA-MB-468- $\Delta\text{Np63}\alpha$ a MDA-MB-468-TAp63 α obsahují stabilně inkorporovaný gen kódující danou isoformu proteinu p63 pod kontrolou cytomegalovirového (CMV) promotoru, jehož exprese je inhibována vazbou tetracyklinového represoru. Přidání tetracyklinu do kultivačního média má za následek zablokování vazby represoru a tím spuštění transkripce příslušného genu.

Tab. 1. Počty identifikovaných proteinových skupin z jednotlivých analýz.

Tabulka uvádí hodnoty pro každou metodu zvlášť a zároveň i celkový počet proteinových skupin identifikovaných ze všech tří analýz dohromady.

MS/MS metoda	MDA-MB-468-ΔNp63α		MDA-MB-468-TAp63α		MDA-MB-468-pcDNA6/TR	
	proteinové skupiny		proteinové skupiny		proteinové skupiny	
CID_MSA	682	910	799	1 085	787	1 062
CID_NLMS3	744		893		869	
CID_ETD	683		823		801	

Jako kontrolní linie byly použity buňky MDA-MB-468-pcDNA6/TR, které jsou mateřskou linií výše zmíněných dvou linií a exprimují pouze tetracyklinový represor. Buňky byly kultivovány za standardních podmínek v DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) obohaceném o 10% fetální bovinní sérum (HyClone, Thermo Scientific, USA). Pro kvantifikaci byla použita metoda SILAC: buňky byly kultivovány v DMEM obsahujícím neznačené aminokyseliny (R0K0) a v médiu se značenými aminokyselinami (R6K4) (Dundee Cell Products, UK), s přidávkou 200 mg/l L-prolinu. K buňkám v DMEM R6K4 byl na 24 hod přidán tetracyklin v koncentraci 1 µg/ml. Buňky (dvě misky o průměru 10 cm) byly lyzovány v pufru obsahujícího 8 M močovinu (Sigma Aldrich, USA), 40 mM NaCl (Lach:ner, ČR), 50 mM tris(hydroxymetyl)aminometan (Bio-Rad, USA), 2 mM MgCl₂ (Sigma Aldrich, USA) s přidávkou inhibitoru fosfatáz a proteáz. Koncentrace proteinů byla změřena metodou dle Bradfordové. Lyzáty o stejné koncentraci celkového proteinu byly následně smíchány v poměru 1 : 1 (w/w).

Štěpení proteinů na peptidy a jejich následné obohacení o fosfopeptidy

Na přípravu každého vzorku bylo použito 200 µg celkového denaturovaného proteinu. Štěpení probíhalo na filtru FASP (filter aided sample preparation) [27] za použití trypsinu. Centrifugací byla směs peptidů uvolněna z filtru, odpařena do sucha a poté obohacena o fosfopeptidy pomocí TiO₂ částic (GL Sciences, Japan) [28]. Vzorky následně odpařené do sucha byly ihned analyzovány pomocí MS.

Tab. 2. Výsledky analýzy genové ontologie.

Jsou uvedeny jednotlivé klastry, seřazené podle významnosti (enrichment score).

MDA-MB-468-TAp63α	
Genová ontologie – biologický proces	enrichment score
sestřih RNA	4,54
buněčný cyklus, buněčné dělení	2,03
regulace buněčné smrti, apoptózy	1,60
intracelulární transport, lokalizace proteinů	1,50
metabolismus ribonukleotidů	1,45
odpověď na buněčný stres, opravy DNA	1,27
MDA-MB-468-ΔNp63α	
Genová ontologie – biologický proces	enrichment score
sestřih RNA	3,03
buněčná polarita, morfogeneze	2,37
organizace cytoskeletu	2,15
vytváření makromolekulárních komplexů, oligomerizace proteinů	1,92
negativní regulace organizace buněčných komponent	1,65
intracelulární transport, lokalizace proteinů	1,12

LC-MS/MS metoda

Vzorky byly rozpuštěny ve 20 µl 0,1% kyseliny mravenčí (Sigma Aldrich, USA) a podrobeny LC-MS/MS analýze na kapalinovém chromatografu UltiMate 3000 RSLCnano spojeném on-line s MS Orbitrap Elite. Fosfopeptidy byly nejprve odsoleny na předkolonce C18 PepMap 100 (30 µm × 5 mm; velikost částic: 5 µm) a následně byly separovány na analytické koloně Acclaim PepMap RSLC C18, (75 µm × 150 mm; velikost částic: 2 µm). Jako mobilní fáze byly použity 0,1% kyselina mravenčí (A) a 0,08% kyselina mravenčí v 80% acetonitrilu (B). Pro postupnou

eluci peptidů z kolony byl zvolen gradient s lineárně se zvyšující organickou frakcí (0–4 min 2 % B, 68 min 40 % B, 70–80 min 98 % B, 81–105 min 2 % B). Detekce eluovaných fosfopeptidů, jejichž efektivní hmotnost se nacházela v rozmezí 400–2 000, probíhala pomocí MS při rozlišení 120 000 (pro 400 m/z). Každý vzorek byl měřen třemi rozdílnými metodami – metodou víceetapové aktivace (CID_MSA), metodou neutrálních ztrát (CID_NLMS3) a metodou kombinující CID a ETD fragmentační techniku (CID_ETD). Nejintenzivnější píky v daném čase byly izolovány a fragmentovány v lineární iontové pasti

(10 000 iontů akumulováno po dobu 10 ms s izolačním oknem 2 m/z; CID: relativní energie 35 %; ETD: aktivací doba 100 ms).

Zpracování dat

Data získaná z LC-MS/MS analýz byla zpracována v programu Proteome Discoverer verze 1.4 s algoritmem Phos-

phoRS 3.1 a prohledávána proti lidské databázi Uniprot a Swissprot (databáze stažena v červnu 2014) [29]. Byly zvoleny běžně se vyskytující modifikace peptidů a dále fosforylace na serinu, treoninu a tyrozinu. Pro odstranění falešně pozitivních výsledků byly získané peptidy prohledány proti obrácené databázi a pro identifikaci fosfoproteinů byly vybrány pouze peptidy s menší než 1% falešně pozitivní mírou. Jelikož některé proteiny mají vzájemně společné peptidy, jsou tyto proteiny spojovány do proteinových skupin.

Z fosfoproteinů identifikovaných alespoň jednou ze tří metod byly následně vybrány ty, u kterých došlo po působení tetracyklinu ke kvantitativní změně o více než 20 %. Pro odstranění falešně pozitivních výsledků byly z analýzy vyloučeny proteiny, u nichž došlo ke změně exprese i v kontrolní linii MDA-MB-468-pcDNA6/TR. Hladina těchto proteinů tedy nebyla regulována v závislosti na expresi izoformou p63, ale nespecificky samotným půso-

Tab. 3. Analýza signálních drah (KEGG PATHWAYS).

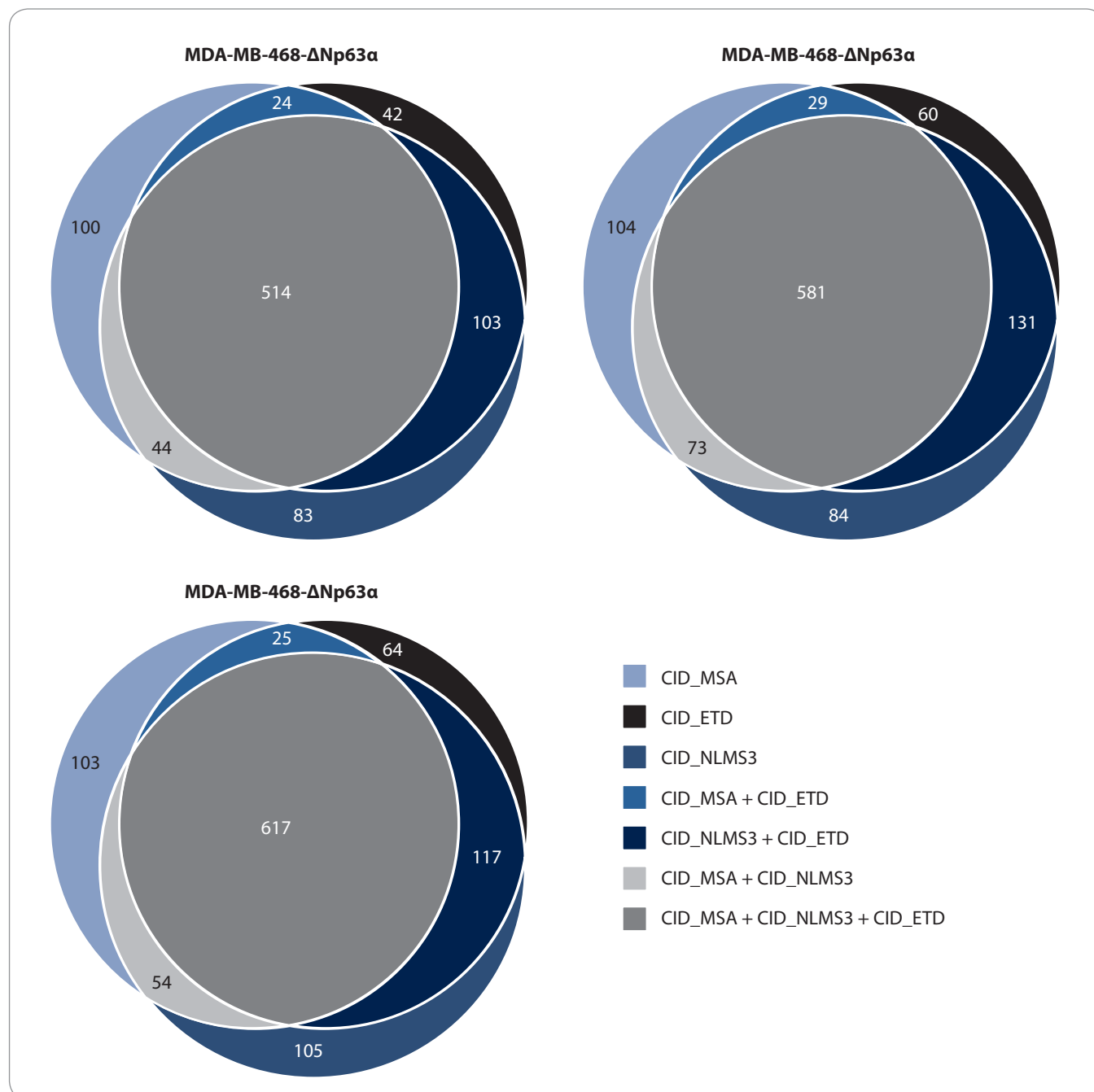
Hodnota p je vypočítána pomocí Fisherova exaktního testu; je-li $p < 0,05$, lze říci, že soubor je významně obohacen o geny spojené s touto signální dráhou.

MDA-MB-468-TAp63α	
Analýza signálních drah (KEGG PATHWAY)	hodnota p
spliceozom	0,028
nádory štítné žlázy	0,029
inzulinová signální dráha	0,035
degradace RNA	0,097
MDA-MB-468-ΔNp63α	
Analýza signálních drah (KEGG PATHWAY)	hodnota p
inzulinová signální dráha	0,002
spliceozom	0,010
replikace DNA	0,025
signální dráha MAPK	0,034

Tab. 4. Příklady proteinů identifikovaných všemi třemi metodami, tj. s vysokou spolehlivostí.

Nárůst/pokles jejich hladiny je uveden jako poměr výskytu ve vzorcích značených „těžkými“ (R6K4) a „lehkými“ (R0K0) aminokyselinami.

MDA-MB-468-TAp63α				
UniProt accession	Název	CID_MSA	CID_NLMS3	CID_ETD
P08559	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit α	1,517	1,215	1,242
O15231	zinc finger protein 185	1,194	1,289	1,356
Q9ULX3	RNA-binding protein NOB 1	0,450	0,498	0,379
Q9GZR7	ATP-dependent RNA helicase DDX24	0,456	0,583	0,444
Q02880	DNA topoisomerase 2-β	0,271	0,692	0,654
Q96IZ0	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	0,333	0,687	0,624
MDA-MB-468-ΔNp63α				
UniProt accession	Název	CID_MSA	CID_NLMS3	CID_ETD
P55072	transitional endoplasmic reticulum ATPase	1,832	1,489	1,331
P00533	epidermal growth factor receptor	1,443	1,263	1,260
Q14676	mediator of DNA damage checkpoint protein 1	1,410	1,238	1,150
Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	0,183	0,569	0,650
P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	0,416	0,507	0,497
O00267	transcription elongation factor SPT5	0,554	0,668	0,582
P18887	DNA repair protein XRCC1	0,569	0,648	0,634



Obr. 4. Vennovy diagramy ukazující na počet společných/rozdílných proteinových skupin získaných analýzou různými fragmentačními technikami.

Jedná se o fragmentaci pomocí kolizní energie s víceetapňovou aktivací (CID_MSA), nebo se skenem neutrálních ztrát (CID_NLMS3), či o kombinaci fragmentace pomocí kolizní energie a reakce kladně nabitých peptidů s elektrony (CID_ETD).

bením tetracyklinu. Takto vybrané proteiny, jejichž exprese souvisí s hladinou izoform p63, byly použity pro analýzu genové ontologie a signálních drah pomocí veřejně přístupné databáze DAVID Bioinformatics Resources 6.7 [30,31]. Dále byly vybrány proteiny identifikované s vysokou spolehlivostí, tj. všemi

třemi metodami, u kterých kvantitativní změna vykazovala stejný trend (nárůst vs. snížení).

Výsledky

V prvním kroku byla zjišťována vhodnost jednotlivých použitých fragmentačních metod a to na základě počtu identifiková-

vaných proteinových skupin v jednotlivých vzorcích. Získaná data jsou uvedena v tab. 1. Počet identifikovaných proteinových skupin jednotlivými metodami byl srovnatelný. Významně více proteinových skupin bylo identifikováno v případě zpracování dat ze všech třech měření dohromady.

V druhém kroku hodnocení dat byly vybrané fosforylované proteiny použity pro analýzu genové ontologie (tab. 2) a mapování signálních drah (tab. 3). Obě izoformy regulovaly fosfoproteiny podílející se na regulaci sestřihu RNA, izoforma Tap63 α ovlivňovala buněčný cyklus a apoptózu, izoforma Δ Np63 α buněčnou polaritu a organizaci cytoskeletu. Konkrétní příklady proteinů (identifikované všemi třemi metodami) s významným kvantitativním rozdílem jsou uvedeny v tab. 4.

Diskuze

U všech třech analyzovaných vzorků (MDA-MB-468- Δ Np63 α ; MDA-MB-468-Tap63 α ; MDA-MB-468-pcDNA6/TR) byl identifikován srovnatelný počet proteinů. Každou fragmentační metodou (CID_MSA, CID_NLMS3, CID_ETD) byla kromě společných proteinových skupin získána až desetina unikátních (obr. 4). Ze získaných výsledků je patrné, že kombinování fragmentačních metod je pro identifikaci většího množství fosforylovaných proteinů velmi výhodné. Předpokladem k tomuto přístupu je ovšem použití vysokorozlišovacího MS, který nabízí kombinování více typů fragmentací. Na druhou stranu je třeba upozornit na složitou interpretaci získaných dat. V některých případech může být fosforylace a její lokalizace zachycena pouze jednou metodou, zatímco ostatní metody detekují peptid bez fosforylace. Je tedy třeba vybrat strategii, která danému typu experimentu vyhovuje nejlépe.

Z analýzy fosfoproteinů identifikovaných alespoň jednou ze tří metod vyplynulo, že obě izoformy p63 se podílí na regulaci sestřihu RNA. Tento poznatek je ve shodě s výsledky analýzy interaktomu p63, která ukázala, že p63 interaguje s proteiny, jež jsou součástí tzv. spliceozomu [32,33]. Sestřih RNA je zásadní mechanismus regulace genové exprese, který umožňuje alternativní výběr sestřihových míst, a tím produkci širokého spektra proteinových izoform [34,35]. Mnoho genů zapojených do regulace buněčného cyklu a apoptózy kóduje proteinové izoformy s odlišnými až antagonistickými funkcemi [36]. Proto je v nádorových buňkách alternativní se-

střih často deregulován ve smyslu produkce izoform s onkogenním účinkem [37]. Nalezení souvislosti exprese izoform p63 s regulací alternativního sestřihu prostřednictvím změn ve fosforylaci proteinů zapojených do tohoto procesu ukazuje na nový potenciální mechanismus působení tohoto proteinu v nádorových buňkách.

Závěr

Získání informace o změnách ve fosfoproteomu nádorové buňky je zásadní pro pochopení změn v signálních drahách a může být základem pro vývoj personalizované léčby. Dnes používané techniky jsou schopny zachytit pouze nepatrnou část fosforylovaných proteinů přítomných v daném čase v dané buňce. Metody hmotnostní spektrometrie umožňují v současnosti velmi komplexní pohled na buněčný fosfoproteom, volba konkrétní metody pak závisí na povaze vzorku a požadovaných výsledcích. Jako nejvýhodnější řešení k identifikaci co největšího počtu fosforylovaných proteinů se jeví použití více fragmentačních metod pro měření jednoho vzorku. Tento přístup je spíše než do klinické praxe určen, aspoň prozatím, pouze pro výzkumné účely. Nabízí identifikaci nových proteinů nebo signálních drah aberantně aktivovaných nebo inaktivovaných v nádorových buňkách, které budou v další etapě validovány jako potenciální biomarkery.

Literatura

1. Yates JR, Shabaz M, Heck AJ. Phosphoproteomics. *Anal Chem* 2014; 86(3): 1313. doi: 10.1021/ac404019p.
2. Reimand J, Wagih O, Bader GD. The mutational landscape of phosphorylation signaling in cancer. *Sci Rep* 2013; 3: 2651. doi: 10.1038/srep02651.
3. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(1): 28–39. doi: 10.1038/nrc2559.
4. Oda Y, Huang K, Cross FR et al. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(12): 6591–6596.
5. Gygi SP, Rist B, Gerber SA et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnol* 1999; 17(10): 994–999.
6. Thompson A, Schafer J, Kuhn K et al. Tandem mass tag: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixture by MS/MS. *Anal Chem* 2003; 75(8): 1895–1904.
7. Fila J, Honys D. Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids* 2011; 43(3): 1025–1047. doi: 10.1007/s00726-011-1111-z.
8. Pinkse MW, Uitto PM, Hilhorst MJ et al. Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from

proteolytic digests using 2D-nano LC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal Chem* 2004; 76(14): 3935–3943.

9. Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT et al. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnol* 2002; 20(3): 301–305.

10. Mann M, Ong S, Grønborg M et al. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* 2002; 20(6): 261–268.

11. Hoffert JD, Knepper MA. Taking aim at shotgun phosphoproteomics. *Anal Biochem* 2008; 375(1): 1–10.

12. Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJ. Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2009; 44(6): 861–878. doi: 10.1002/jms.1599.

13. MaxQuant.org [homepage on the Internet]. MaxQuant. Max planck institute of biochemistry. Martinsried, Germany; c2015 [cited 2015 March 30]. Available from: <http://www.maxquant.org/>.

14. Taus T, Köcher T, Pichler P et al. Universal and confident phosphorylation site localization using phospho RS. *J Proteome Res* 2011; 10(12): 5354–5362. doi: 10.1021/pr200611n.

15. Pjehová M, Hernychová L, Tomašec P et al. Analýza fosfoproteinů a signálních drah kvantitativno-proteomickými metodami. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S116–S120. doi: 10.14735/amko2014S116.

16. Yang A, Schweitzer R, Sun D et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999; 398(6729): 714–718.

17. Hibi K, Trink B, Patturajan M et al. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(10): 5462–5467.

18. Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R et al. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol* 2002; 198(4): 417–427.

19. Leong CO, Vidnovic N, DeYoung MP et al. The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1370–1380.

20. Danilov AV, Neupane D, Nagaraja AS et al. Delta-Np63alpha-mediated induction of epidermal growth factor receptor promotes pancreatic cancer cell growth and chemoresistance. *PLoS One* 2011; 6(10): e26815. doi: 10.1371/journal.pone.0026815.

21. Ramsey MR, Wilson C, Ory B et al. FGFR2 signaling underlies p63 oncogenic function in squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* 2013; 123(8): 3525–3538. doi: 10.1172/JCI68899.

22. Wu N, Rollin J, Masse I et al. p63 regulates human keratinocyte proliferation via MYC-regulated gene network and differentiation commitment through cell adhesion-related gene network. *J Biol Chem* 2012; 287(8): 5627–5638. doi: 10.1074/jbc.M111.328120.

23. Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004; 2(7): 371–386.

24. Su X, Chakravarti D, Cho MS et al. Tap63 suppresses metastasis through coordinate regulation of dicer and miRNAs. *Nature* 2010; 467(7318): 986–990. doi: 10.1038/nature09459.

25. Yang A, Kaghad M, Wang Y et al. p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2(3): 305–316.

26. Ghioni P, Bolognese F, Duijff PH et al. Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. *Mol Cell Biol* 2002; 22(24): 8659–8668.

27. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 2009; 6(5): 359–362. doi: 10.1038/nmeth.1322.

28. Aryal UK, Ross AR. Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010; 24(2): 219–231. doi: 10.1002/rcm.4377.
29. UniProt.org [homepage on the Internet]. UniProt, c2002–2015 [cited 2015 March 30]. Available from: <http://www.uniprot.org/>.
30. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc* 2009; 4(1): 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
31. Huang Y, Jeong JS, Okamura J et al. Global tumor protein p53/p63 interactome. *Cell Cycle* 2012; 11(12): 2367–2379. doi: 10.4161/cc.20863.
32. Huang da DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(1): 1–13. doi: 10.1093/nar/gkn923.
33. Amoresano A, Di Costanzo A, Leo G et al. Identification of deltaNp63alpha protein interactions by mass spectrometry. *J Proteome Res* 2010; 9(4): 2042–2048. doi: 10.1021/pr9011156.
34. Moore MJ, Wang Q, Kennedy CJ et al. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell* 2010; 142(4): 625–636. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.019.
35. David CJ, Manley JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* 2010; 24(21): 2343–2364. doi: 10.1101/gad.1973010.
36. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2005; 19(1): 1–13.
37. Liu S, Cheng C. Alternative RNA splicing and cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013; 4(5): 547–566. doi: 10.1002/wrna.1178.

„Cukry zasahují“ aneb glykomika na poli nádorových biomarkerů

‘Sugars Interfere’ or Glycomics in the Field of Cancer Biomarkers

Zahradníková M., Vojtěšek B., Hernychová L.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Glykomika se zabývá detekcí a charakterizací glykanů přítomných v biologických vzorcích. Je známo, že glykanové struktury dodávají biomolekulám vysoký stupeň strukturní diverzity a tím i mnohostranné biologické funkce, jako jsou buněčné rozpoznávání, adheze nebo zapojení v buněčných signálních drahách. Významně se také účastní onkogeneze, např. ve fázích invaze, metastazování a angiogeneze. Analýza glykanových struktur přítomných v nádorových tkáních nebo tělních tekutinách pacientů je tedy slibným nástrojem pro hledání potenciálních nádorových biomarkerů nezbytných pro časnou diagnostiku nádorových onemocnění. V předložené práci je popsán proces glykosylace a vznik N- a O-glykanů, současně jsou zmíněny příklady glykanového profilování u rakoviny slinivky břišní, prostaty a vaječníku.

Klíčová slova

glykomika – nádorový biomarker – karcinom pankreatu – karcinom prostaty – karcinom vaječníku

Summary

Glycomics is concerned with detection and characterization of glycans present in biological samples. It is well-known that glycan structures impart high degree of structural diversity to biomolecules and thus add wide-ranging biological functions, such as cellular recognition, adhesion or involvement in cellular signaling pathways. They substantially participate in oncogenesis, e.g. in phases of invasion, metastasis and angiogenesis. Therefore, analysis of glycan structures in tumor tissues or body liquids is a promising tool for searching for potential tumor biomarkers essential for an early diagnosis of the neoplastic disease. The presented review describes the process of glycosylation and the origination of N- and O-glycans, presenting examples of glycan profiling in pancreatic, prostate and ovarian cancer.

Key words

glycomics – tumor biomarker – pancreatic cancer – prostate cancer – ovarian cancer

Práce byla podpořena IGA MZ ČR NT/13794-4/2012, Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101), MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010004).

This study was supported by IGA MH CRNT/13794-4/2012, by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), MEYS – NPS I – LO1413, by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and by BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE “uniform requirements” for biomedical papers.



Mgr. Martina Zahradníková
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail:
martina.zahradnikova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 10. 4. 2015
Přijato/Accepted: 25. 6. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152520>

Úvod

V ČR je každoročně nově diagnostikováno přes 82 000 případů nádorového onemocnění (data z roku 2010). Ze statistik současně vyplývá, že se u každého třetího obyvatele ČR v průběhu života nádorové onemocnění vyskytne a každý čtvrtý mu podlehně [1,2]. Jedním z faktorů vysoké úmrtnosti na nádorová onemocnění je absence diagnostických biomarkerů. Za nádorové biomarkery

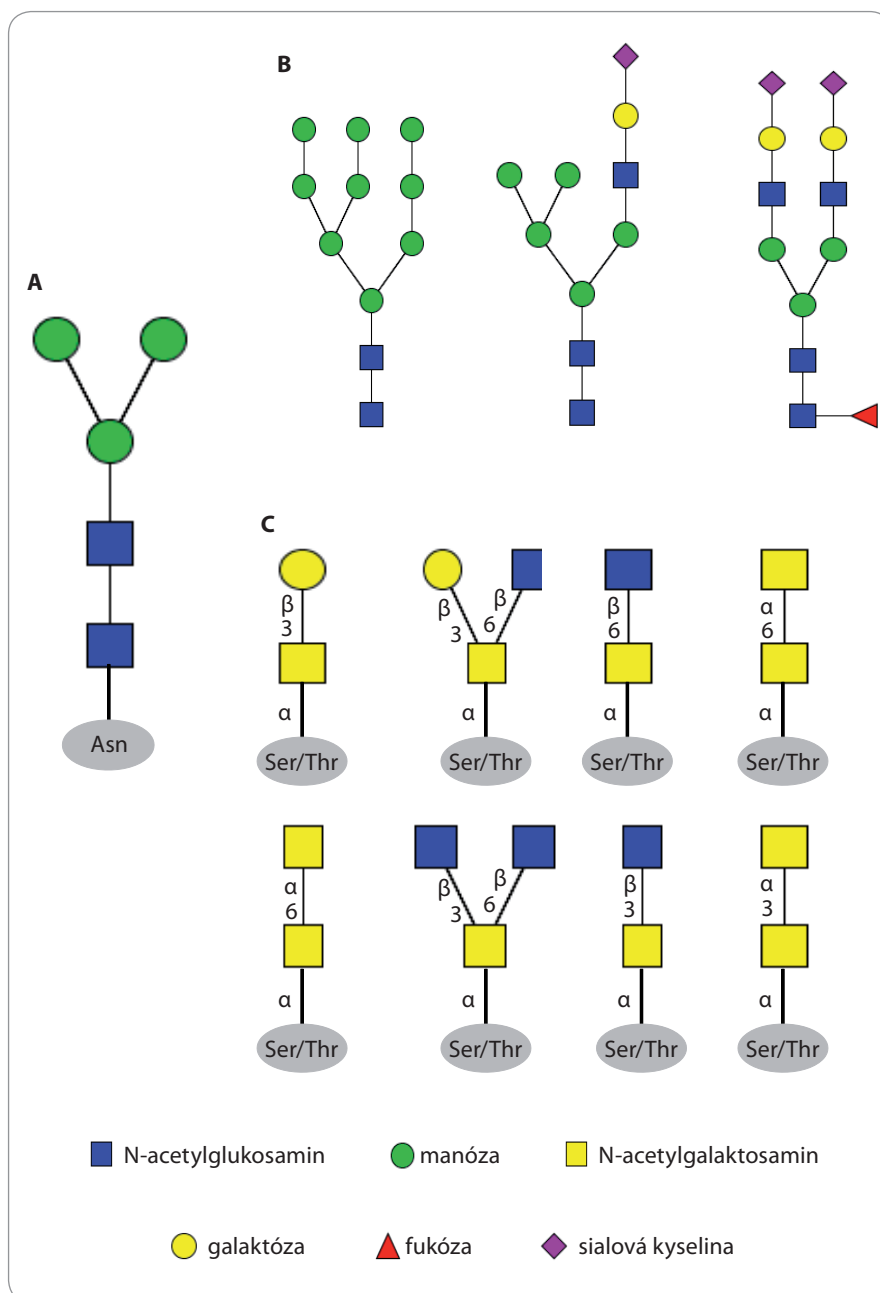
mohou být považovány povrchové i secernované molekuly různého charakteru produkované nádorovými, ale i nenádorovými buňkami jako odpověď na přítomnost nádoru. Pro klinické účely ideální marker podává informace pouze o jednom biologickém nebo patologickém procesu [3]. Biomarkery lze stanovit z krve (séra, plazmy), dalších tělesných tekutin nebo ze vzorků tkání, ale obecně jsou upřednostňovány neinva-

živní způsoby odběru biologického materiálu minimalizující zátěž pacienta [4]. Jedním z velmi nadějných odvětví pro hledání nových potenciálních biomarkerů je glykomika, která např. metodou glykanového profilování sleduje kvalitativní i kvantitativní rozdíly v glykanových strukturách mezi onkologickými pacienty a zdravou populací.

Termín glykomika vznikl z předpony glyko- užívané v chemii sacharidů (z řeckého glykys – sladký) a přípony -omics dohodou používané v názvech podobných „omových“ oborů, např. proteomika (zabývající se proteiny) [5]. Objektem zájmu glykomiky je struktura a biologická funkce glykanů – monosacharidů, jednoduchých i větvených oligosacharidů, zpravidla kovalentně navázaných na další biologické (makro) molekuly a často lokalizovaných na vnějších membránách buněk, kde představují první možnost buněčné komunikace [6]. Z doposud publikované literatury vyplývá, že rakovinné buňky vykazují abnormální glykosylace – např. hyperfukosylace, charakteristické především pro rakovinu pankreatu a rakovinu kolorekta [7–9], nebo nadměrnou sialylaci, jejíž výskyt byl popsán u rakoviny prostaty [10] a rakoviny vaječníků [11]. S ohledem na rozmanitost glykanových struktur a množství glykokonjugátů (glykolipidy, glykosfingolipidy, muciny a jiné glykoproteiny) budou popsány pouze procesy N- a O-glykosylace proteinů, protože jsou nejčastěji se vyskytujícím typem glykosylace u živých organismů.

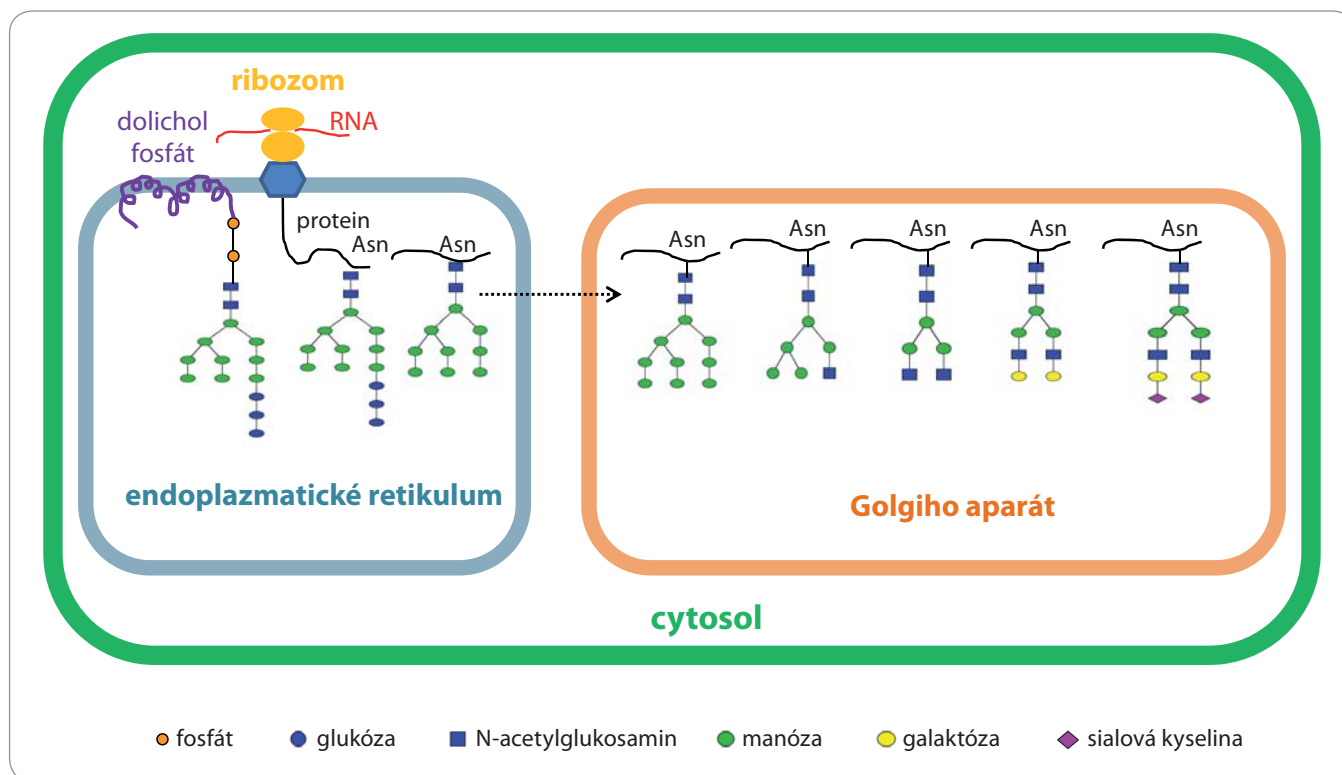
Glykosylace

Glykosylace je komplexní proces specifického navázání monosacharidové nebo oligosacharidové jednotky na protein nebo lipid za vzniku glykoproteinu anebo glykolipidu při kotranslačních či posttranslačních procesech. N-glykosylace začíná syntézou oligosacharidového prekursoru vázaného na lipid dolichol v membráně hrubého endoplazmatického retikula. Struktura prekursoru je v této fázi stejná pro všechny eukaryotické buňky – obsahuje tři glukózy (Glc), devět manóz (Man) a dva N-acetylglukosaminy (GlcNAc), a současně obsahuje centrální strukturu všech N-glykanů složenou z $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, která je někdy



Obr. 1. Typy N- a O-glykanů.

A. centrální strukturu N-glykanů. B. tři strukturní typy N-glykanů; zleva manóзовý typ, hybridní typ a komplexní typ. C. základní centrální struktury O-glykanů.



Obr. 2. Biosyntéza N-glykanů.

označována i jako trimannosyl-chitobiosové jádro charakteristické pro všechny N-glykany napříč živými organismy (obr. 1A). Molekula prekurzoru $\text{Glc}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ je následně přenesena *en bloc* z dolicholového nosiče na amidický dusík aminokyseliny asparagin (Asn) proteinu, který má být glykosylován. Tento krok je katalyzován enzymem oligosacharid-protein transferáza, která jako substrát rozpozná pouze specifický aminokyselinový motiv Asn-Xxx-Ser nebo Asn-Xxx-Thr, kde Xxx může reprezentovat jakoukoli aminokyselinu s výjimkou prolinu. Nově vzniklý protein s navázaným jedním nebo více glykany je nejprve modifikován v endoplazmatickém retikulu enzymatickým odštěpením tří terminálních glukóz a poté vstupuje do cisteren Golgiho aparátu, v nichž je glykanu dána výsledná struktura odštěpením manóz a navázáním dalších monosacharidů kaskádou enzymatických reakcí katalyzovaných glykosidázami a glykosyltransferázami (obr. 2) [12–16]. Obecně lze říci, že pro různé proteiny stejně jako pro různé typy buněk jsou tvořeny N-glykany nejrůznějších struktur. Nejčastěji pozorujeme tři typy lid-

ských N-glykanových struktur: 1. manózový typ, 2. hybridní typ a 3. komplexní typ (obr. 1B) [17].

Proces O-glykosylace probíhá v cisternách Golgiho aparátu, do kterého vstupují monosacharidy navázané na nukleotidovém přenašeči (mono- nebo difosfátu), a v této podobě jsou také substrátem pro odpovídající glykosyltransferázy (obr. 3) [18,19]. Pro O-glykany není znám žádný vazebný motiv v aminokyselinové sekvenci, dostačující je přítomnost Ser nebo Thr v primární struktuře proteinu. Je známých osm variant centrálních struktur O-glykanů (obr. 1C), nejběžnějším savčím typem jsou centrální struktury 1 a 2 mucinového typu. Muciny jsou vysokomolekulární proteiny secernované sliznicemi, které jsou současně hyperglykosylovány většinou kratšími oligosacharidy [20].

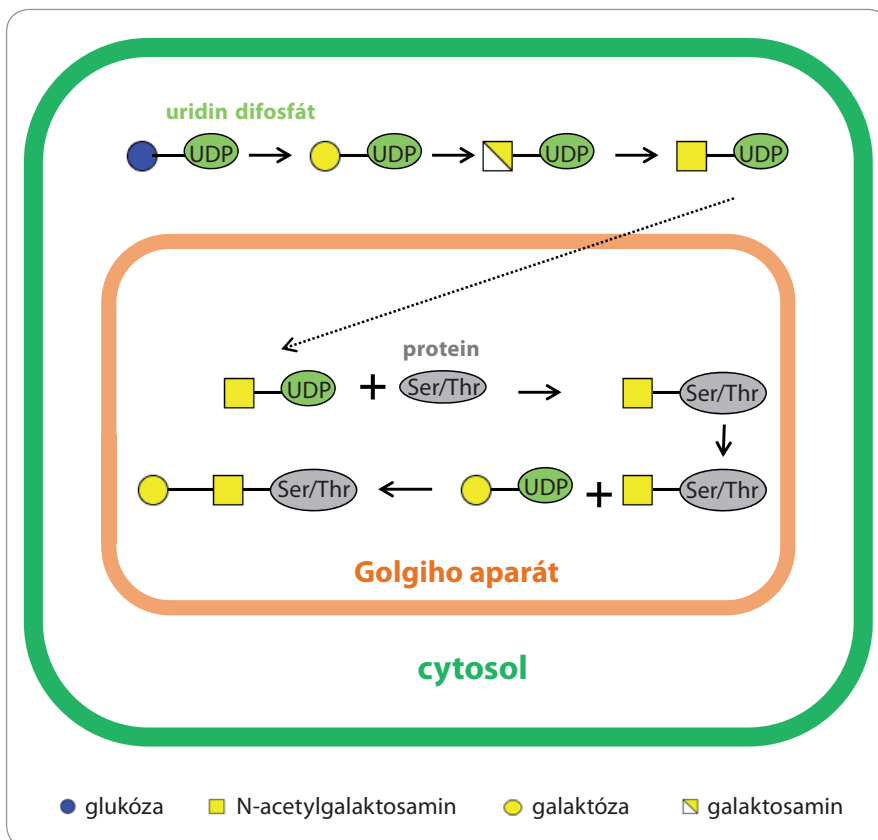
Glykosylace obecně představuje jednu z nejčastěji se vyskytujících posttranslačních modifikací, která byla zaznamenána u mnoha membránových i secernovaných proteinů. Glykosylací proteinu velmi často dochází ke změně jeho strukturních vlastností, a tedy i funkce [21,22].

Jak glykanové struktury ovlivňují nádorová onemocnění?

V posledních letech se v literatuře téma glykomiky stále více objevuje v souvislosti s nejrůznějšími typy nádorových onemocnění, u nichž byly často pozorovány změny v glykosylaci proteinů produkovaných nádorovými buňkami. Glykanový profil přímo koreluje s biologii nádoru, významnou měrou se podílí na jeho charakteru a současně se promítá např. do procesů invazivity nádoru a neoangiogeneze. Nádorové bujení aktivuje expresi abnormálních glykanů, které podporují interakce nádorových buněk s leukocyty, trombocyty i endoteliálními buňkami a usnadňují tvorbu metastáz [23].

Rakovina pankreatu

Nádorové onemocnění pankreatu drží jednu z předních příček úmrtnosti mezi nádorovými onemocněními s pětiletým přežitím 4 %. Většinu pacientů (50 %) je onemocnění diagnostikováno až ve IV. stadiu, pouze u 5 % pacientů je zachyceno už v I. stadiu. Jedním z důvodů velmi pozdní diagnostiky je absence vhodného screeningového



Obr. 3. Biosyntéza O-glykanů.

programu, který by umožnil včasný záchyt onemocnění. V současnosti je nejčastěji stanovovaným sérovým markerem nádorový antigen 19-9 (CA19-9), jehož diagnosticky vypovídající hodnota je limitována vysokým počtem falešně pozitivních stanovení. CA19-9 neumožňuje rozlišit chronickou pankreatitidu a rakovinu pankreatu, a tudíž není vhodný pro včasnou diagnostiku choroby [24,25].

Glykomická profilování sér pacientů s diagnostikovanou rakovinou pankreatu vykazovala změny ve stupni fukosylace glykanů. Bylo zjištěno, že fukosylace β -řetězce haptoglobinu je signifikantně vyšší u pacientů s rakovinou pankreatu oproti kontrolní populaci [7]. V roce 2012 byla publikována studie, v rámci níž byla analyzována tekutina pankreatických cyst identifikující více než 80 glykanových struktur, z nichž 40 bylo hyperfukosylovaných. Přítomnost fukosylovaných glykanů se tedy jeví jako slibným marker, přestože mechanismus hyperfukosylace doposud není zcela objasněn [26].

Rakovina prostaty

V řadě vyspělých zemí světa je rakovina prostaty nejčastějším mužským zhoubným onemocněním. Každý rok je po celém světě diagnostikováno více než 600 000 nových případů rakoviny prostaty, v EU potom okolo 300 000 nových případů a přibližně 90 000 mužů ročně na rakovinu prostaty umírá [27]. Přesná příčina vzniku onemocnění není jednoznačně známa, ale i zde hraje důležitou roli včasná diagnostika, která rutinně používá stanovení hladiny prostatického specifického antigenu (PSA). Přestože PSA patří mezi nejlépe definované doposud používané biomarkery rakoviny prostaty, i tady dochází k relativně vysokému podílu falešně pozitivních výsledků. Zvýšená hladina PSA v séru byla pozorována kromě rakoviny prostaty u benigní hyperplazie prostaty, zánětu prostaty, ale i po pohlavním styku [28].

Z glykanových frakcí izolovaných ze sér pacientů s rakovinou prostaty měřených na hmotnostním spektrometru bylo identifikováno celkem 50 glyka-

nových struktur. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny u 12 glykanů, mezi kterými byly i více fukosylované struktury [29].

Rakovina vaječníku

„Tichý vrah“, jak se také rakovině vaječníku přezdívá, bývá ročně diagnostikován u téměř čtvrt milionu žen na světě a ročně jí podlehnou okolo 140 000 pacientek. Prognóza tohoto onemocnění je velmi špatná, neboť je obvykle diagnostikováno až v pokročilém stadiu, kde je vysoká pravděpodobnost metastazování. Pro raná stadia jsou typické nespecifické symptomy jako úporné nadýmání, bolesti břicha, ztráta chuti k jídlu, které mohou být snadno zaměněny s jiným onemocněním. Diagnostické metody zahrnují nejčastěji vyšetření ultrazvukem a stanovení hladiny sérového mucinózního glykoproteinu – nádorového antigenu 125 (CA-125) [30]. Jedná se opět o nespecifický marker, protože zvýšenou hladinu CA-125 způsobují i onemocnění jater, adenomyóza, pankreatitida, ale současně i nádorová onemocnění žlučových cest, prsu, jater nebo tlustého střeva. Zvláště problematická je situace u raných, relativně dobře léčitelných, stadií rakoviny vaječníku, u kterých je specifita CA-125 jen okolo 50 % [31].

Podobně jako u výše zmíněných onemocnění byly publikovány práce spojující rakovinu vaječníků se změnou glykanového profilu a přítomností abnormálních glykanů. Studie z roku 2012 popisuje N-glykanový profil 20 kontrolních sér, 19 sér pacientek s pokročilou rakovinou vaječníku a 11 sér pacientek po léčbě docetaxelem a imatinib mesylátem. Trendy pozorované mezi kontrolní skupinou vzorků a skupinami před léčbou i po ní jasně potvrzují hypotézu, že změny v glykanovém profilu mohou podávat užitečné informace o progresi onemocnění i v průběhu léčby [32].

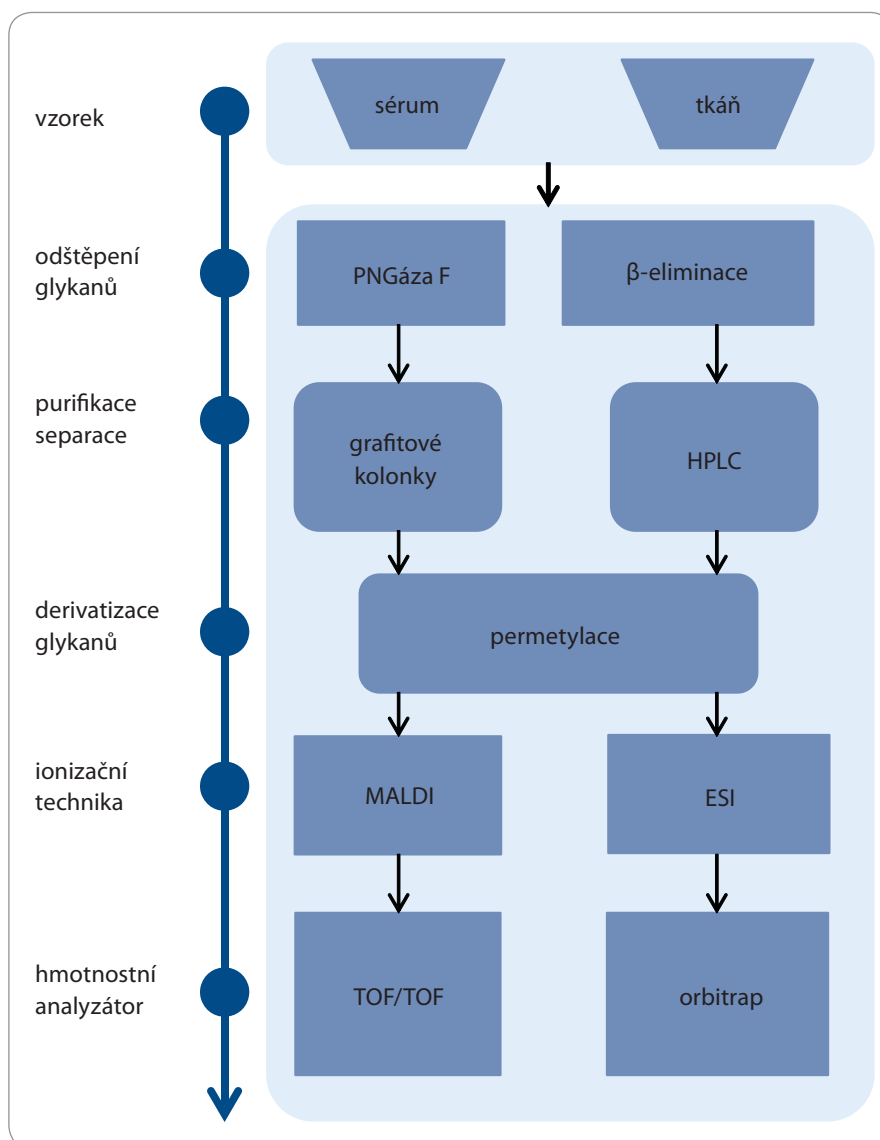
Metodika práce s glykany

Glykany mohou být izolovány z různých typů biologických vzorků zahrnujících tkáň, tělní tekutiny a také materiál získaný z buněčných linií při *in vitro* studiích. Výhodou glykanové analýzy je nízká spotřeba vzorku, kdy pro kom-

pletní glykanovou analýzu je např. dostačující 2,5–5 µl séra. Glykany mohou být z glykoproteinů odděleny enzymatickým štěpením, nejčastěji endoglykosidázou PNGázou F, která oddělí kompletní glykan štěpením kovalentní vazby mezi Asn a první GlcNAc [33]. Využívána je i metoda sekvenčního štěpení, při níž je použito postupně několik enzymů, poskytující detailnější informace o glykanových strukturách. Glykany lze uvolnit i neenzymaticky chemickou reakcí (β-eliminací), která je doprovázena kompletní degradací proteinové složky, hojně využívanou při analýze O-glykanů [34]. Po uvolnění glykanů z glykoproteinů dochází k jejich purifikaci a extrakci. Významným krokem glykanového profilování je derivatizace glykanů, nejčastěji permetylace, při níž dochází k nahrazení vodíků hydroxylových skupin metylovými skupinami. Tento krok izolované glykany stabilizuje, usnadňuje jejich ionizaci a separaci při hmotnostně spektrometrickém měření. Finálním krokem je detekce a kvantifikace glykanů, ke které se používají tři základní přístupy: 1. kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí, 2. kapilární elektroforéza s laserově indukovanou detekcí a 3. hmotnostní spektrometrie (obr. 4). Výběr vhodné techniky závisí na typu detekce a na komplexnosti vzorku. Pro následné vyhodnocení je možno použít široké spektrum statistických přístupů, např. výpočet p hodnoty a ROC analýza (receiver operating characteristic AUC) [35].

Závěr

Hledání nových nádorových biomarkerů je stále výzvou a především nutností pro včasnou diagnostiku onemocnění, možnost sledování jejího průběhu a zejména pro volbu nejvhodnější a nejúčinnější léčby na základě individuálních vlastností nádorů. Komplikacemi jsou mimo jiné komplexita biologického materiálu a velmi nízké koncentrace bílkovin secernovaných nádorem v raných stádiích, v ng/ml a nižší, do biologických tekutin (krev, sliny, moč). Glykomika představuje bezpochyby nové paradigma pro hledání nádorových biomarkerů. Je snad jen otázkou času, kdy budou nové specifické glykokonjugáty přispí-



Obr. 4. Ukázka workflow pro práci s glykany.

Obecné kroky glykanového profilování jsou znázorněny v levé části a některé typy vhodných metod v pravé části obrázku. Výběr vhodné metody vždy závisí na typu vzorku.

vat ke včasné diagnostice nádorových onemocnění.

Literatura

1. Linkos.cz [internetová stránka]. Česká onkologická společnost ČLS JEP, Česká republika; c2000–15 [aktualizováno 3. března 2015; citováno 5. března 2015]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz>.
2. Uzis.cz [internetová stránka]. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS), Česká republika, [citováno 5. března 2015]. Dostupné z: <http://uzis.cz/publikace/novotvary-2010>.
3. Gutman S, Kessler LG. The US Food and Drug Administration perspective on cancer biomarker development. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7): 565–571.
4. Mishra A, Verma M. Cancer biomarkers: are we ready for the prime time? *Cancers* 2010; 2(1): 190–208. doi: 10.3390/cancers2010190.
5. Srivastava S. Move over proteomics, here comes glycomics. *J Proteome Res* 2008; 7(5): 1799.

6. Werz DB, Ranziger R, Herget S et al. Exploring the structural diversity of mammalian carbohydrates („glycospace“) by statistical databank analysis. *ACS Chem Biol* 2007; 2(10): 685–691.
7. Lin Z, Simeone DM, Anderson MA et al. Mass spectrometric assay for analysis of haptoglobin fucosylation in pancreatic cancer. *J Proteome Res* 2011; 10(5): 2602–2611. doi: 10.1021/pr200102h.
8. Takeda Y, Shinzaki S, Okudo K et al. Fucosylated haptoglobin is a novel type of cancer biomarker linked to the prognosis after an operation in colorectal cancer. *Cancer* 2012; 118(12): 3036–3043. doi: 10.1002/cncr.26490.
9. Zhao YP, Ruan CP, Wang H et al. Identification and assessment of new biomarkers for colorectal cancer with serum N-glycan profiling. *Cancer* 2012; 118(3): 639–650. doi: 10.1002/cncr.26342.
10. Saldova R, Fan Y, Fitzpatrick JM et al. Core fucosylation and alpha2–3 sialylation in serum N-glycome is significantly increased in prostate cancer comparing to benign prostate hyperplasia. *Glycobiology* 2011; 21(2): 195–205. doi: 10.1093/glycob/cwq147.

11. Saldova R, Piccard H, Pérez-Garay M et al. Increase in sialylation and branching in the mouse serum N-glycome correlates with inflammation and ovarian tumour progression. *PLoS One* 2013; 8(8): e71159. doi: 10.1371/journal.pone.0071159.
12. Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al (eds). *Essentials of glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009: 101–114.
13. Freeze HH, Eklund EA, Ng BG et al. Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol* 2012; 11(5): 453–466. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70040-6.
14. Hennet T. Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(9): 1306–1317. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.02.001.
15. Freeze HH, Haltiwanger RS. Other classes of ER/Golgi-derived glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al (eds). *Essentials of glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009: 163–173.
16. Stanley P, Cummings RD. Structures common to different glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al (eds). *Essentials of glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009: 175–198.
17. Mechref Y, Hu Y, Garcia A et al. Defining putative glycan cancer biomarkers by MS. *Bioanalysis* 2012; 4(20): 2457–2469. doi: 10.4155/bio.12.246.
18. Cylwik B, Lipartowska K, Chrostek L et al. Congenital disorders of glycosylation. Part II. Defects of protein O-glycosylation. *Acta biochimica Polonica* 2013; 60(3): 361–368.
19. Brockhausen I, Schachter H, Stanley P. O-GalNAc glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al (eds). *Essentials of glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009: 115–127.
20. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 2002; 12(4): 43R–56R.
21. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473(1): 4–8.
22. Drake PM, Cho W, Li B et al. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clin Chem* 2010; 56(2): 223–236. doi: 10.1373/clinchem.2009.136333.
23. Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv Cancer Res* 2015; 126: 11–51. doi: 10.1016/bs.acr.2014.11.001.
24. Li DH, Xie KP, Wolff R et al. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004; 363(9414): 1049–1057.
25. Azeem K, Ševčíková J, Tomášková H et al. Karcinom pankreatu a faktory životního stylu. *Klin Onkol* 2013; 26(4): 257–262. doi: 10.14735/amko2013257.
26. Mann BF, Goetz JA, House MG et al. Glycomic and proteomic profiling of pancreatic cyst fluids identifies hyperfucosylated lactosamines on the N-linked glycans of over expressed glycoproteins. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(7): M111.015792. doi: 10.1074/mcp.M111.015792.
27. Ondrušová M, Mužík J, Kliment J et al. Incidencia a mortalita na karcinom prostaty vo vybraných krajinách strednej Európy. *Klin Onkol* 2011; 24(2): 126–132.
28. Štern P, Vranovský K, Šafářčík K. Karcinom prostaty – molekulární podstata, diagnostika a ekonomika prevence. *Klin Biochem Metab* 2008; 16(37): 19–26.
29. Kyselova Z, Mechref Y, Al Bataineh MM et al. Alterations in the serum glycome due to metastatic prostate cancer. *J Proteome Res* 2007; 6(5): 1822–1832.
30. Ayhan A, Guven S, Kucukali T. Is there a correlation between tumor marker panel and tumor size and histopathology in well stages patients with borderline ovarian tumors? *Acta Obstet Gynecol Stand* 2007; 86(4): 484–490.
31. Urban P, Bilecová-Rabajdová M, Štefeková Z et al. Přehled potenciálních onkomarkerů detekce skorejích fáz rakoviny vaječníků. *Klin Onkol* 2011; 24(2): 106–111.
32. Alley WR, Vasseur JA, Goetz JA et al. N-linked glycan structures and their expressions change in the blood sera of ovarian cancer patients. *J Proteome Res* 2012; 11(4): 2282–2300. doi: 10.1021/pr201070k.
33. Tarentino AL, Plummer TH. Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol* 1994; 230: 44–57.
34. Jensen PH, Karlsson NG, Kolarich D et al. Structural analysis of N- and O-glycans released from glycoproteins. *Nature Protocols* 2012; 7(7): 1299–1310. doi: 10.1038/nprot.2012.063.
35. Zahradníková M, Hernychová L, Vojtěšek B et al. Nové trendy ve studiu glykosylace proteinů u onkologických onemocnění. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S121–S129. doi: 10.14735/amko2014S121.

Nrf2 – dve tváre regulátora antioxidačného systému

Nrf2 – Two Faces of Antioxidant System Regulation

Pastorek M., Müller P., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Súhrn

Signálna dráha riadená komplexom transkripčného faktora Nrf2 a jeho represora Keap1 je súčasťou jedného z najdôležitejších defenzívnych mechanizmov bunky, ktorý ju ochraňuje pred stresom. Po uvoľnení proteínu Keap1 z komplexu Nrf2-Keap1 dochádza k translokácii Nrf2 do jadra, kde cez zvýšenie expície cytoprotektívnych génov pomáha bunke zvládnuť oxidačný stres vyvolaný účinkom toxických či karcinogénnych látok. Nie je preto prekvapujúce, že indukcia Nrf2 chemopreventívnymi látkami môže mať potenciál pri prevencii nádorových ochorení. Podobne ako Nrf2 ochraňuje bunky zdravého tkaniva, v neoplastických bunkách môže zmierniť účinok chemoterapeutík, a podporiť tak progresiu rakoviny. Je dokázané, že zvýšená expresia a následná nadmerná akumulácia Nrf2 je u mnohých typov nádorov asociovaná so zlou prognózou liečby a prispieva aj k fenoménu liekovej rezistencie. Poznanie „dvoch tvárí“ Nrf2 ako aj aktivácie ním riadenej signálnej dráhy je preto dôležité nielen pre základný výskum, ale má aj klinické implikácie.

Kľúčové slová

Nrf2 – Keap1 – antioxidant – lieková rezistencia – chemoprevencia

Summary

One of the most prominent defense mechanisms of cells undergoing stress is the Nrf2-Keap1 signaling pathway. After exposure to either carcinogens or toxic compounds inducing oxidative stress, attacked cells react by release of Keap1 from the Nrf2-Keap1 complex. Freeing Nrf2 from the complex allows its translocation into the nucleus, thus enabling start of the transcriptional program of cytoprotective genes. Therefore, induction of Nrf2 by chemopreventive compounds may show potential in cancer prevention. But while it protects normal cells, increased activity of Nrf2 signaling pathway also facilitates cancer progression and protects neoplastic cells from therapeutic agents. Increased expression and subsequent accumulation of Nrf2 contributes to acquired drug resistance and is often associated with worse prognosis. Knowing 'both faces' of Nrf2 signaling pathway is thus relevant not only for basic research but has also substantial clinical implications.

Key words

Nrf2 – Keap1 – antioxidant – drug resistance – chemoprevention

Práca bola podporená Európskym fondom pre regionálny rozvoj a štátnym rozpočtom Českej republiky (RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projektom MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010004).

This study was supported by European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101), MEYS – NPS I – LO1413, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and by BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Michal Pastorek, Ph.D.

Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: michal.pastorek@mou.cz

Obdržané/Submitted: 9. 4. 2015

Prijaté/Accepted: 15. 6. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152S26>

Úvod

Nrf2-Keap1 signálna dráha je hlavným regulátorom bunkovej odpovede na stres spôsobený elektrofilmi a reaktívnymi formami kyslíka (reactive oxygen species – ROS). Preto je tradične vnímaná ako dôležitý obranný mechanizmus. Aj keď je tento pohľad správny, v poslednej dobe sa objavujú dôkazy o jej zapojení do vytvárania vhodného prostredia podporujúceho prežívanie a proliferáciu nádorových buniek. Akumulácia Nrf2 pomáha nádorovým bunkám lepšie odolávať stresu vyvolanému terapiou a táto jej „druhá tvár“ sa stala predmetom záujmu výskumu, ktorého cieľom je lepšie pochopiť úlohu Nrf2 signálnej dráhy v rakovine a vytvoriť stratégie na jej inhibíciu.

Štruktúra Nrf2 a Keap1

Pre pochopenie regulácie signálnej dráhy Nrf2-Keap1 je najprv potrebné poznať štruktúru jej hlavných aktérov. Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2) je transkripčný faktor, ktorý obsahuje sedem funkčných domén, známych ako Neh1–7. Z nich je pre reguláciu Nrf2 kľúčová najmä doména Neh2. Obsahuje sedem lyzínových rezíduí, na ktoré sa viaže ubikvitín, a tiež dve väzobné miesta (ETGE a DLG), ktoré pomáhajú regulovať jeho stabilitu prostredníctvom interakcie s jeho partnerom Keap1 (Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology [ECH]-associated protein 1) [1–4]. Pre stabilitu Nrf2 je rovnako dôležitá na serín bohatá doména Neh6 [5] a domény Neh3–5 sú potrebné pre transaktivačnú aktivitu Nrf2 [5,6]. Doména Neh1, ktorá obsahuje leucínový zips, zase reguluje väzbu transkripčného faktora na DNA a dimerizáciu Nrf2 s Maf [7].

Keap1 obsahuje tri hlavné domény, riadiace jeho aktivitu: Kelch, BTB a IVR. Kelch/DGR doména sprostredkuje väzbu Keap1 s Neh2 doménou Nrf2 [2,8]. BTB doména je dôležitá pre homodimerizáciu Keap1 a väzbu s proteínom Cul3 a IVR doména s vyšším obsahom cysteínových rezíduí spája BTB doménu s C koncom Kelch/DGR domény [9].

Regulácia signálnej dráhy Nrf2-Keap1

V bežných podmienkach je Nrf2 lokalizovaný v komplexe s Keap1, ktorý jeho

hladinu udržiava na bazálnej úrovni. Prostredníctvom Kelch domén sa Keap1 viaže na Nrf2 v dvoch miestach Neh2 domény – prvá väzba na ETGE miesto má vyššiu afinitu a zabezpečuje naviazanie Keap1 na Nrf2 a následná väzba s nižšou afinitou na miesto DLG reguluje správnu orientáciu oboch proteínov. Po naviazaní oboch väzieb sa sedem ubikvitín akceptujúcich lyzínov dostane do pozície, v ktorej dochádza k ich polyubikvitinácii, a oba proteíny tak môžu byť degradované v 26S podjednotke proteazómu [10,11]. V celom procese hrá dôležitú úlohu aj USP15 (ubiquitin-specific peptidase 15) – deubikvitinačný enzým, ktorý stabilizuje Keap1 a posilňuje jeho E3 ligázovú aktivitu, čo nakoniec umožňuje väzbu Nrf2 [12].

Ak je bunka vystavená pôsobeniu xenobiôtik alebo oxidačnému stresu, dochádza k modifikácii cysteínov, ktoré sa nachádzajú v reakčnom mieste Keap1. Jeho schopnosť udržať si správnu terciárnu štruktúru je tým znížená, čo zabráni jeho väzbe na Nrf2 a jeho následnej polyubikvitinácii a degradácii. Podľa inej teórie následkom modifikácie tiolov dochádza k disociácii Cul3 ligázy od Keap1 [13]. Spoločným aspektom oboch modelov je znemožnenie interakcie Keap1 a Nrf2, ktorý môže byť po oddelení z komplexu aktivovaný a translokovaný do jadra. Tam s Maf proteínmi vytvorí transkripčný komplex rozpoznávajúci ARE (antioxidant response element) miesta v promótoroch a riadi expresiu génov, ako sú *NAD(P)H chinón oxidoreduktáza 1*, *hém oxygenáza 1*, *glutatión S transferáza* či *glutamát-cystein ligáza* (obr. 1) [14].

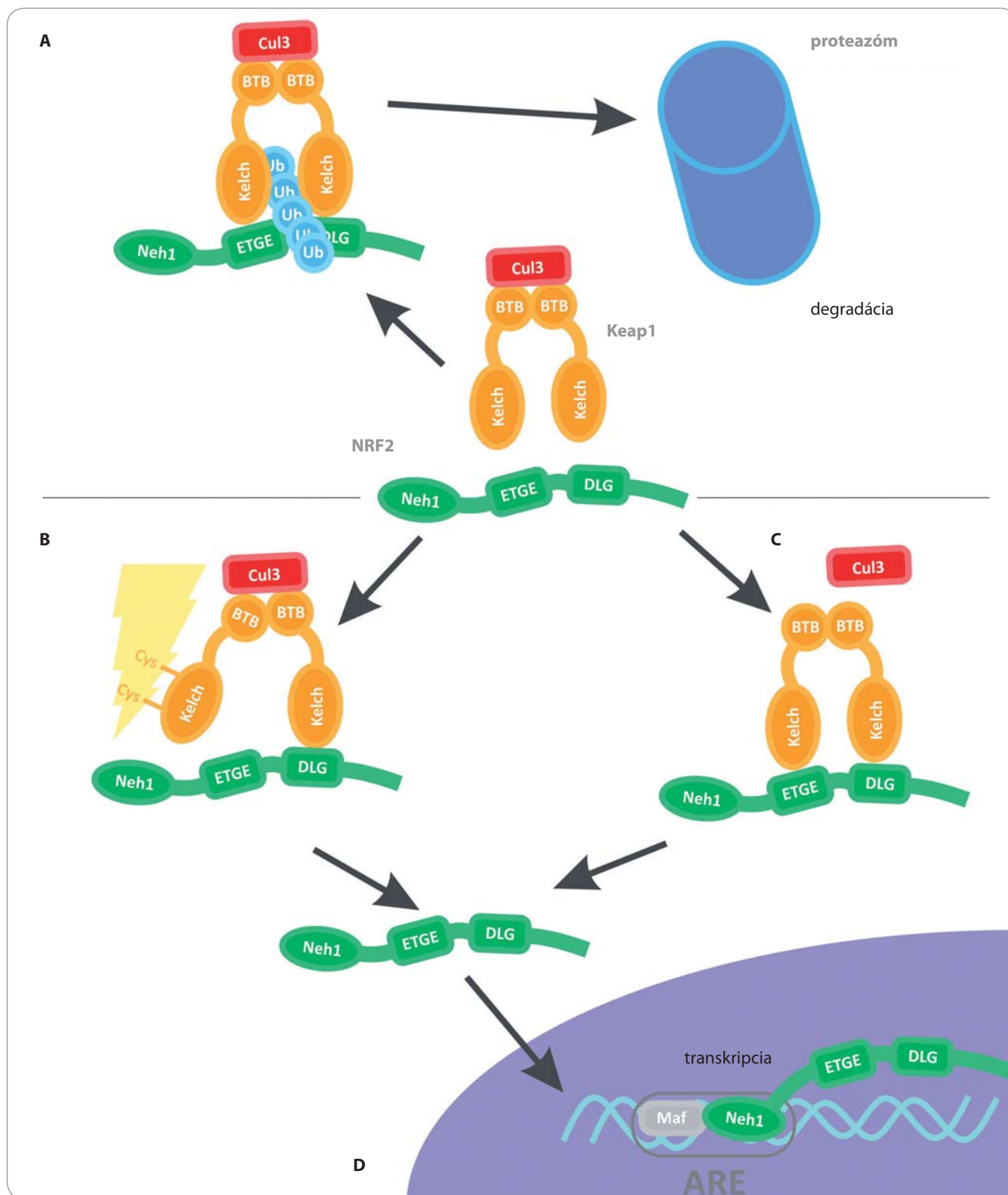
Nrf2 ako nádorový supresor

Hlavnou funkciou Nrf2 je aktivácia antioxidačnej odpovede pomocou transaktívacie širokého spektra génov (napr. gén kódujúci hém-oxygenázu, gény riadiace syntézu glutatiónu). Vďaka rýchlej odpovedi na prítomnosť xenobiôtik alebo oxidačného stresu je táto signálna dráha tradične vnímaná ako jeden z hlavných obranných mechanizmov bunky a dôležitý regulátor jej prežívania. Je dokázané, že aktivácia Nrf2 hrá dôležitú úlohu pri ochrane pred diabetom, starnutím, neurodegeneračnými a kardiovaskulárnymi

ochoreniami a v neposlednom rade aj pred nádorovými ochoreniami [15,16]. Niekoľko štúdií na myšiach s vyradením génu pre Nrf2 – *NFE2L2* – ukázalo, že v porovnaní s kontrolnými myšami jeho neprítomnosť zvyšuje po chemickej indukcií pravdepodobnosť výskytu rakoviny žalúdka, kože, čriev alebo močového mechúra [17]. Takisto bolo dokázané, že jedinci so špecifickým SNP v promótorovej oblasti *NFE2L2* génu majú väčšie riziko výskytu nemalobunkového karcinómu pľúc spôsobené zrejme signifikantne zníženou hladinou *NFE2L2* mRNA [18,19]. Ochranný potenciál tejto dráhy pravdepodobne spočíva v jej schopnosti redukovať množstvo ROS a s tým súvisiaceho poškodenia DNA [20].

Nrf2 ako onkoproteín

Napriek pozitívnej asociácii antioxidačnej odpovede riadenej Nrf2 signálnou dráhou so zníženým rizikom vzniku nádorových ochorení môže mať jej dlhodobá aktivácia negatívny efekt. Konštitutívne zvýšená hladina Nrf2 bola detekovaná v nádoroch hlavy a krku, vaječníkov, prsníkov a pľúc a bola dokázaná aj jej spojitosť so zrýchlenou nádorovou progresiou [21–26]. Zhoršená prognóza liečby nádorov so zvýšenou hladinou Nrf2 je dôsledkom jej schopnosti podporovať proliferáciu a zvyšovať odolnosť na chemo- a rádioterapiu [21,25,27]. Tento jav je podporený viacerými štúdiami, podľa ktorých Nrf2 prispieva k vlastnej aj získanej chemorezistencii pravdepodobne skrz zvýšenie odolnosti na stres [21,25,26,28,29]. Keďže viacero Nrf2 indukovaných génov kóduje cytoprotektívne proteíny, akými sú *NAD(P)H chinón oxidoreduktáza 1*, *hém oxygenáza 1*, glutatión, glutatión-S-transferáza, potenciálnym mechanizmom môže byť zvýšená obrana bunky proti poškodeniu spôsobeného ROS, keďže ROS sú čiastočne generované pôsobením anti-neoplastických látok. Naviac proteíny ako GSH (redukováná forma glutatiónu), ktoré obsahujú reaktívne tiolové skupiny, sa môžu viazať na elektrofilné medziprodukty metabolizmu antineoplastických látok a alkylačných činidiel a tak ich inaktivovať. Nádorové bunky so zvýšenou hladinou Nrf2 sú menej citlivé na často používané chemoterapeutiká,



Obr. 1. Regulácia signálnej dráhy Nrf2-Keap1.

Za bazálnych podmienok (A) väzba Keap1 na ETGE a DLG domény Nrf2 zabezpečí orientáciu oboch proteínov vhodnú k ubiquitinácii a po nej ich následne nasmeruje do proteazómu, kde sú potom degradované. Po modifikácii cysteínov spôsobenej oxidatívnym stresom alebo prítomnosťou xenobiotík (B) je Keap1 neschopný väzby na Nrf2, disociácia Cul3 z BTB domén Keap1 zase zabráni ubiquitinácii Nrf2-Keap1 komplexu (C). V oboch prípadoch je Nrf2 uvoľnený a translokovaný do jadra, kde spolu s Maf proteínmi vytvorí transkripčný komplex a riadi expresiu génov zapojených do odpovede na oxidatívny stres (D).

ako napr. cisplatinu, 5-fluorouracil, či doxorubicín. Po inhibícii exprese Nrf2 pomocou siRNA sa ich rezistencia zase znížila [21,22,23,28,30–32]. Znížená alebo zvýšená expresia Nrf2 je v priamej korelácii s citlivosťou nádorových buniek na terapiu, čo je dôkazom jej dôležitosti vo vytvorení chemorezistencie. V nedávnej štúdii bola tiež ukázaná spojitosť medzi zvýšenou hladinou Nrf2 v nádorových bunkách pľúcneho karcinómu A549 s ich schopnosťou proliferácie prostredníctvom aktivácie exprese génov zodpovedných za regeneráciu NADPH (dihydropyrimidin-adenine dinucleotide phosphate) [33]. Pomocou microarray analýzy bolo navyše identifikovaných viacero génov kontrolovaných Nrf2, ktoré sa zúčastňujú biosyntézy purínov – stavebných kameňov RNA a DNA a tiež proteínov zapojených v metabolizme glukózy [34]. Uvedené skutočnosti potvrdzujú hypotézu o onkogénnom potenciáli Nrf2, ktorý aktivuje viacero mechanizmov podporujúcich nádorový progresiu a prežívanie.

Deregulácia signálnej dráhy Nrf2

Doposiaľ bolo popísaných niekoľko mechanizmov, ktorými nádorové bunky konstitutívne aktivujú signálnu dráhu Nrf2. Napríklad epigenetické utlmenie exprese pomocou metylácie špecifických CpG miest v promótorovej oblasti Keap1 vedie k nedostatočnej represii Nrf2 vo viacerých typoch nádorov [26,35]. Modifikácia exprese Keap1 je klinicky signifikantná, v pľúcnych karcinómoch a malígnych gliómoch bola asociovaná so zhoršenou prognózou liečby [35]. Zvýšenie hladiny Nrf2 môže byť indukované aj sprostredkovane aktiváciou onkoproteínov ako B-Raf, c-Myc, K-Ras [21,28,30,36–39], posttranslačnými modifikáciami cysteínov v Keap1, alebo nahromadením proteínov schopných rozrušiť komplex Nrf2-Keap1 [13,40–45].

Komunikácia Nrf2 s inými signálnymi dráhami

So zvýšenou aktivitou signálnej dráhy Nrf2 môže úzko súvisieť aj jej interakcia s inými signálnymi dráhami, ktoré sú počas malígnej transformácie často deregulované. Proteín p53 negatívne re-

guluje transkripciu cieľových génov Nrf2 ako napr. *GST1*, *NQO1* a *x-ct* [46]. Po kotransfekcii niekoľkých bunkových línií s vektormi obsahujúcimi kombináciu Nrf2 a p53 bola oproti transfekcii samotným Nrf2 pozorovaná znížená expresia jeho viacerých cieľových génov. Silná indukcia p53 tak môže zatiaľ nevysvetleným mechanizmom znížiť účinnosť antioxidačnej odpovede nádorových buniek a podporiť tak bunkovú smrť [34]. Na druhej strane je zaujímavé, že indukcia p21^{WAF1}, terčového proteínu p53, pomáha Nrf2 stabilizovať [47]. Deje sa tak pomocou väzby p21^{WAF1} na Nrf2, ktorá zabraňuje jeho naviazaniu na Keap1 a následnej ubikvitinácii Nrf2-Keap1 komplexu. Pri absencii p21^{WAF1} je bazálna a aj indukovateľná expresia génov regulovaných Nrf2 znížená.

Prostredníctvom interakcie proteínov Keap1 a p62 je signálna dráha Nrf2 veľmi úzko prepojená s procesom bunkovej autofágie. Priamym následkom nadmernej ektoptickej exprese p62 alebo blokovania autofagického „toku“ je zníženie hladiny Keap1 prostredníctvom jeho väzby na p62, ktorý ho nasmeruje do autofagozómov. Tam dochádza k jeho degradácii, čo vedie k zvýšeniu stability Nrf2 a teda aj k vyššej expresii ním riadených génov [48–50]. Zvýšenie stability Nrf2 týmto spôsobom sa nazýva nekanonická aktivácia Nrf2, pretože jej mechanizmus nie je závislý od modifikácie cysteínov na Keap1, ale od exprese p62. V myšiach, ktoré mali narušený proces autofágie bola zaznamenaná zvýšená akumulácia Nrf2, čo sa prejavilo poškodením pečene [50]. Naopak, použitie siRNA pre p62 zvýšilo hladinu a stabilitu Keap1 a nepriamo tak znížilo hladinu Nrf2 a expresiu jej cieľových génov [49,51]. Tieto experimenty potvrdzujú úzke spojenie aktivácie Nrf2 dráhy s procesom autofágie a dávajú nový pohľad na funkčné prepojenie jednotlivých mechanizmov, ktoré napomáhajú nádorovej bunke k prežitiu.

Inhibícia a modulácia Nrf2

Napriek negatívnej korelácii aktivity Nrf2 s úspešnosťou liečby je vývoj špecifických inhibítorov Nrf2 problematický, najmä kvôli jeho štruktúrnej podobnosti s inými transkripčnými faktormi

z bZip rodiny. Z dostupných možností vychádzajúcich zo súčasných poznatkov sa tak ponúka využitie Nrf2 siRNA [52] či PI3K inhibítorov [33] a v neposlednom rade i prírodných látok so známou schopnosťou modulácie Nrf2 dráhy [53]. Nádejou by mohla byť aj alternatívna terapia lentivírusovými vektormi, ktoré obsahujú gén konvertujúci neškodné predliečivo na toxickú látku. Pri zaradení tohto génu za ARE miesta s vysokou väzbovou aktivitou Nrf2 by tak dochádzalo k efektívnemu zničeniu nielen nádorových buniek, ale aj okolitého nádorového mikroprostredia [54,55]. V budúcnosti by sa tiež dali využiť vedomosti o interakcii Nrf2 s inými signálnymi dráhami a využiť potenciál iných, lepšie modulovateľných cieľov. V tomto bode je zaujímavé spomenúť DMF (dimetyl fumarát), ktorý sa v klinickej praxi používa pri liečbe psoriázy, roztrúsenej sklerózy a iných autoimunitných ochorení [56–61]. Mechanizmus jeho účinku nebol doposiaľ úplne vysvetlený, no bolo potvrdené, že sa viaže na redukovanú formu glutatiónu a jeho metabolit monometyl fumarát je potentným aktivátorom Nrf2 signálnej dráhy [62,63]. Uvažuje sa dokonca aj o jeho využití pri liečbe nádorových ochorení. V literatúre bola popísaná jeho schopnosť inhibovať rast a metastázovanie na myšom modeli melanómu a bunkách derivovaných z pacientov s glioblastómom [64–66]. Tento fenomén je nesporne zaujímavý, keďže súčasťou účinku DMF je aktivácia Nrf2 dráhy, ktorá je u nádorov spájaná práve so zvýšenou proliferáciou a zrýchlenou progresiou. Poznatky získané s DMF naznačujú, že výsledok aktivácie Nrf2 dráhy je závislý aj od kontextu iných dejov a zasluhuje si ďalšie skúmanie.

Zhrnutie

Niekoľko štúdií uvedených v tomto prehľadnom článku potvrdilo schopnosť Nrf2 signálnej dráhy chrániť bunky zdravého tkaniva pred xenobiotikami alebo oxidačným stresom, ktorý môže potenciálne viesť k malígnej transformácii. Na druhej strane bola pozorovaná korelácia zvýšenia hladiny Nrf2 so zhoršenou prognózou liečby u viacerých typov nádorových ochorení. Otázkou zostáva, či sa aktivácia Nrf2 podieľa na vzniku ná-

dorového ochorenia, alebo vzniká len sekundárne ako súčasť „malígneho fenotypu“. Za aktiváciu Nrf2 v nádoroch by tiež mohla byť zodpovedná jej interakcia s inými signálnymi dráhami, ktoré sú v nádoroch často deregulované. Potlačenie nadmernej aktivácie tejto signálnej dráhy by tak mohlo byť sprostredkované moduláciou signálnych dráh, ktoré s ňou priamo interagujú, alebo pomocou špecifických inhibítorov Nrf2. Tie sa však zatiaľ nachádzajú len vo fáze vývoja. Odpovede by mohla priniesť podrobnejšia analýza DMF vo vzťahu k nádorovým ochoreniam, ktorý sa v klinickej praxi zväčša používa pri liečbe autoimunitných ochorení. Napriek jeho vlastnosti aktivátora Nrf2 dráhy bola na experimentálnych modeloch pozorovaná jeho schopnosť inhibovať rast nádoru. Možné využitie DMF v onkologickej liečbe poukazuje na to, že modulácia Nrf2 signálnej dráhy je zaujímavá nielen z hľadiska výskumu, ale lepšie poznanie jej chemopreventívnych účinkov a fenoménu liekovej rezistencie má aj klinický potenciál.

Literatúra

- Zhang DD, Lo SC, Cross JV et al. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* 2004; 24(24): 10941–10953. doi: 10.1128/MCB.24.24.10941-10953.2004.
- McMahon M, Thomas N, Itoh K et al. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 domain and the redox-insensitive Neh6 domain. *J Biol Chem* 2004; 279(30): 31556–31567.
- Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F et al. Two site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem* 2006; 387(10–11): 1311–1320.
- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 2004; 24(16): 7130–7139.
- Moi P, Chan K, Asunis I et al. Isolation of NFE2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(21): 9926–9930.
- Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ et al. The carboxyterminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 2005; 25(24): 10895–10906.
- Katoh Y, Itoh K, Yoshida E et al. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* 2001; 6(10): 857–868.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999; 13(1): 76–86.
- Lo SC, Li X, Henzl MT et al. Structure of the Keap1-Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J* 2006; 25(15): 3605–3617.
- McMahon M, Thomas N, Itoh K et al. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin mediated ubiquitylation of proteins by a 'tethering' mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem* 2006; 281(34): 24756–24768.
- Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A et al. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol* 2007; 27(21): 7511–7521.
- Villeneuve NF, Tian W, Wu T et al. USP15 negatively regulates Nrf2 through deubiquitination of Keap1. *Mol Cell* 2013; 51(1): 68–79. doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.022.
- Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 2011; 16(2): 123–140. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x.
- Kansanen E, Jyrkkanen HK, Levenon AL. Activation of stress signalling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(6): 973–982. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.038.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 89–116.
- Lau A, Villeneuve NF, Sun Z et al. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* 2008; 58(5–6): 262–270. doi: 10.1016/j.phrs.2008.09.003.
- Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98(6): 3410–3415.
- Yamamoto T, Yoh K, Kobayashi A et al. Identification of polymorphisms in the promoter region of the human Nrf2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321(1): 72–79.
- Suzuki T, Shibata T, Takaya K et al. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol* 2013; 33(12): 2402–2412. doi: 10.1128/MCB.00065-13.
- Morito N, Yoh K, Itoh K et al. Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals by affecting intracellular glutathione levels. *Oncogene* 2003; 22(58): 9275–9281.
- Shibata T, Ohta T, Tong KI et al. Cancer related mutations in Nrf2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(36): 13568–13573. doi: 10.1073/pnas.0806268105.
- Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF et al. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 2008; 29(6): 1235–1243. doi: 10.1093/carcin/bgn095.
- Jiang T, Chen N, Zhao F et al. High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Res* 2010; 70(13): 5486–5496. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0713.
- Kim YR, Oh JE, Kim MS et al. Oncogenic Nrf2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol* 2010; 220(4): 446–451. doi: 10.1002/path.2653.
- Solis LM, Behrens C, Dong W et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3743–3753. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3352.
- Zhang P, Singh A, Yegnasubramanian S et al. Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(2): 336–346. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0589.
- Sasaki H, Suzuki A, Shitara M et al. Genotype analysis of the Nrf2 gene mutation in lung cancer. *Int J Mol Med* 2012; 31(5): 1135–1138. doi: 10.3892/ijmm.2013.1324.
- Singh A, Misra V, Thimmulappa RK et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small cell lung cancer. *PLoS Med* 2006; 3(10): e420.
- Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y et al. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2012; 103(4): 760–766. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x.
- Ohta T, Iijima K, Miyamoto M et al. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res* 2008; 68(5): 1303–1309. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5003.
- Homma S, Ishii Y, Morishima Y et al. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(10): 3423–3432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2822.
- Lister A, Nedjadi T, Kitteringham NR et al. Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Mol Cancer* 2011; 10: 37. doi: 10.1186/1476-4598-10-37.
- Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 2012; 22(1): 66–79. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.016.
- Jaramillo MC, Zhang DD. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* 2013; 27(20): 2179–2191. doi: 10.1101/gad.225680.113.
- Muscarella LA, Parrella P, D'Alessandro V et al. Frequent epigenetic inactivation of KEAP1 gene in non-small cell lung cancer. *Epigenetics* 2011; 6(6): 710–719.
- Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* 2006; 21(5): 689–700.
- Nioi P, Nguyen T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362(4): 816–821.
- Ooi A, Dykema K, Ansari A et al. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2013; 73(7): 2044–2051. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3227.
- Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2013; 45(8): 860–867. doi: 10.1038/ng.2699.
- Sporn MB, Libby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the liberty of context. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(8): 564–571. doi: 10.1038/nrc3278.
- DeNicola GM, Karreth FA, Humpston TJ et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011; 475(7354): 106–109. doi: 10.1038/nature10189.
- Hanada N, Takahata T, Zhou Q et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 66. doi: 10.1186/1471-2407-12-66.
- Adam J, Hatipoglu E, O'Flaherty L et al. Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 524–537. doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.006.
- Ooi A, Wong JC, Pettillo D et al. An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 511–523. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.024.
- Ma Q, He X. Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of nrf2. *Pharmacol Rev* 2012; 64(4): 1055–1081. doi: 10.1124/pr.110.004333.
- Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D et al. p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J Biol Chem* 2006; 281(52): 39776–39784.
- Chen W, Sun Z, Wang XJ et al. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell* 2009; 34(6): 663–673. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.029.
- Komatsu, Kurokawa H, Waguri S et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 2010; 12(3): 213–223. doi: 10.1038/ncb2021.
- Lau A, Wang XJ, Zhao F et al. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol* 2010; 30(13): 3275–3285. doi: 10.1128/MCB.00248-10.
- Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M et al. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox

- homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(34): 13561–13566. doi: 10.1073/pnas.1121572109.
51. Copple IM, Lister A, Obeng AD et al. Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway. *J Biol Chem* 2010; 285(22): 16782–16788. doi: 10.1074/jbc.M109.096545.
52. Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa RK et al. RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res* 2008; 68(19): 7975–7984. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1401.
53. Ren D, Villeneuve NF, Jiang T et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(4): 1433–1438. doi: 10.1073/pnas.1014275108.
54. Hurttila H, Koponen JK, Kansanen E et al. Oxidative stress-inducible lentiviral vectors for gene therapy. *Gene Ther* 2008; 15(18): 1271–1279. doi: 10.1038/gt.2008.75.
55. Leinonen HM, Ruotsalainen AK, Määttä AM. Oxidative stress-regulated lentiviral TK/GCV gene therapy for lung cancer treatment. *Cancer Res* 2012; 72(23): 6227–6235. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1166.
56. Nicholas JA, Boster AL, Imitola J et al. Design of oral agents for the management of multiple sclerosis: benefit and risk assessment for dimethyl fumarate. *Drug Des Devel Ther* 2014; 8: 897–908. doi: 10.2147/DDDT.S50962.
57. Bompreszi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. *Ther Adv Neurol Disord* 2015; 8(1): 20–30. doi: 10.1177/1756285614564152.
58. Gill AJ, Kolson DL. Dimethyl fumarate modulation of immune and antioxidant responses: application to HIV therapy. *Crit Rev Immunol* 2013; 33(4): 307–359.
59. Oh CJ, Kim JY, Choi YK et al. Dimethylfumarate attenuates renal fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor- β /Smad signaling. *PLoS One* 2012; 7(10): e45870. doi: 10.1371/journal.pone.0045870.
60. Ashrafi H, Czibik G, Bellahcene M et al. Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Cell Metab* 2012; 15(3): 361–371. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.017.
61. Belge K, Brück J, Ghoreschi K. Advances in treating psoriasis. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 4. doi: 10.12703/P6-4.
62. Brennan MS, Matos MF, Bing Li et al. Dimethyl fumarate and monoethyl fumarate exhibit differential effects on KEAP1, NRF2 activation, and glutathione depletion in vitro. *PLoS One* 2015; 10(3): e0120254. doi: 10.1371/journal.pone.0120254.
63. Takaya K, Suzuki T, Motohashi H et al. Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med* 2012; 53(4): 817–827. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.023.
64. Odom RY, Dansby MY, Rollins-Hairston AM et al. Phytochemical induction of cell cycle arrest by glutathione oxidation and reversal by N-acetylcysteine in human colon carcinoma cells. *Nutr Cancer* 2009; 61(3): 332–329. doi: 10.1080/01635580802549982.
65. Loewe R, Valero T, Kremling S et al. Dimethylfumarate impairs melanoma growth and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66(24): 11888–11896.
66. Ghods AJ, Glick R, Braun D et al. Beneficial actions of the anti-inflammatory dimethyl fumarate in glioblastomas. *Surg Neurol Int* 2013; 4: 160. doi: 10.4103/2152-7806.123656.

Polo-like kináza 1 jako cíl protinádorové terapie

Polo-like Kinase 1 as a Target for Anti-tumor Therapy

Procházková I., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Jednotlivé proteiny z rodiny polo-like kináz (Plk) plní rozdílné, avšak kritické funkce při regulaci buněčného cyklu a koordinují buněčnou odpověď na poškození DNA. Nejvíce prostudovaným z pěti členů této rodiny je protein Plk1. Jedná se o serin/treonin kinázu, která hraje klíčovou roli v mnoha fázích mitózy, a s její deregulací se setkáváme u různých typů nádorů, kde je její zvýšená hladina většinou asociovaná s horší prognózou. Z pohledu léčby je také zajímavý vztah Plk1 a proteinu p53. Nejen z těchto důvodů se Plk1 stala jedním z atraktivních cílů pro vývoj protinádorových léčiv. Nejnadějněji se nyní jeví inhibitor ATP-vazebné oblasti Plk1 volasertib (BI 6727), který v doposud provedených klinických studiích prodloužil přežití pacientů s akutní myeloidní leukémií a nyní je testován v klinické studii fáze III. Ve fázi preklinického testování se nachází také několik inhibitorů polo-box domény (druhého možného místa inhibice polo-like kináz), které by měly zajistit větší specifitu vůči Plk1.

Klíčová slova

polo-like kináza 1 – nádorový supresor p53 – ATP-kompetitivní inhibitory – polo-box doména – klinické studie

Summary

Individual proteins from polo-like kinase (Plk) family fulfil different but critical functions in regulating cell cycle and coordinate cell response to DNA-damage. The most studied one from this five-member family is Plk1. It is a serine/threonine kinase that plays a pivotal role in many aspects of mitosis and its deregulation is common in various tumor types where the elevated level is mostly associated with worse prognosis. From the therapeutical point of view, intertwined relationship between Plk1 and p53 protein is very interesting and will be discussed. Not only for these reasons, Plk1 has become an attractive target for anti-tumor drug development. The most promising seems to be ATP-binding site inhibitor Volasertib (BI 6727) which provided a survival benefit for patients with acute myeloid leukemia and is now tested in phase III clinical trial. A new generation of Plk1 inhibitors that target the second druggable domain of Plk1, the polo-box domain, is currently being tested preclinically and are believed to improve Plk1 specificity.

Key words

polo-like kinase 1 – tumor suppressor protein p53 – ATP-competitive inhibitors – polo-box domain – drug evaluation studies

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projektem MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010004).

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), MEYS – NPS I – LO1413, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: vojtesek@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 9. 4. 2015

Přijato/Accepted: 19. 6. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152532>

Rodina proteinů polo-like kináz

Proteiny z rodiny polo-like kináz (Plk), jež čítají celkem pět členů, jsou významné regulátory mitózy, meiózy i cytokineze, zkrátka procesu buněčného dělení. Všechny tyto serin/treonin kinázy obsahují zakonzervovanou kinázovou katalytickou doménu na N-konci a jednu či více C-koncových „polo-box“ domén, jež se uplatňují při vazbě substrátu. Sekvenční podobnost jednotlivých členů vůči Plk1 je 38 % (Plk2, Plk3), resp. 26 % (Plk4, Plk5). Nejvíce prostudovaným členem rodiny je Plk1, a proto jejím fyziologickým funkcím budeme věnovat zvláštní prostor níže a úvodem stručně představíme ostatní členy rodiny Plk.

Plk2 je, na rozdíl od Plk1, které můžeme přisuzovat spíše roli onkoproteinu, považována za nádorový supresor. Některé studie naznačují vliv na inhibici růstu nádorů v souvislosti s tím, že aktivace Plk2 je nutná pro mitózu [1], konkrétně pro duplikaci centrozomu [2]. Plk2 má také potenciální roli v signalizaci v kontrolním bodě replikace skrze

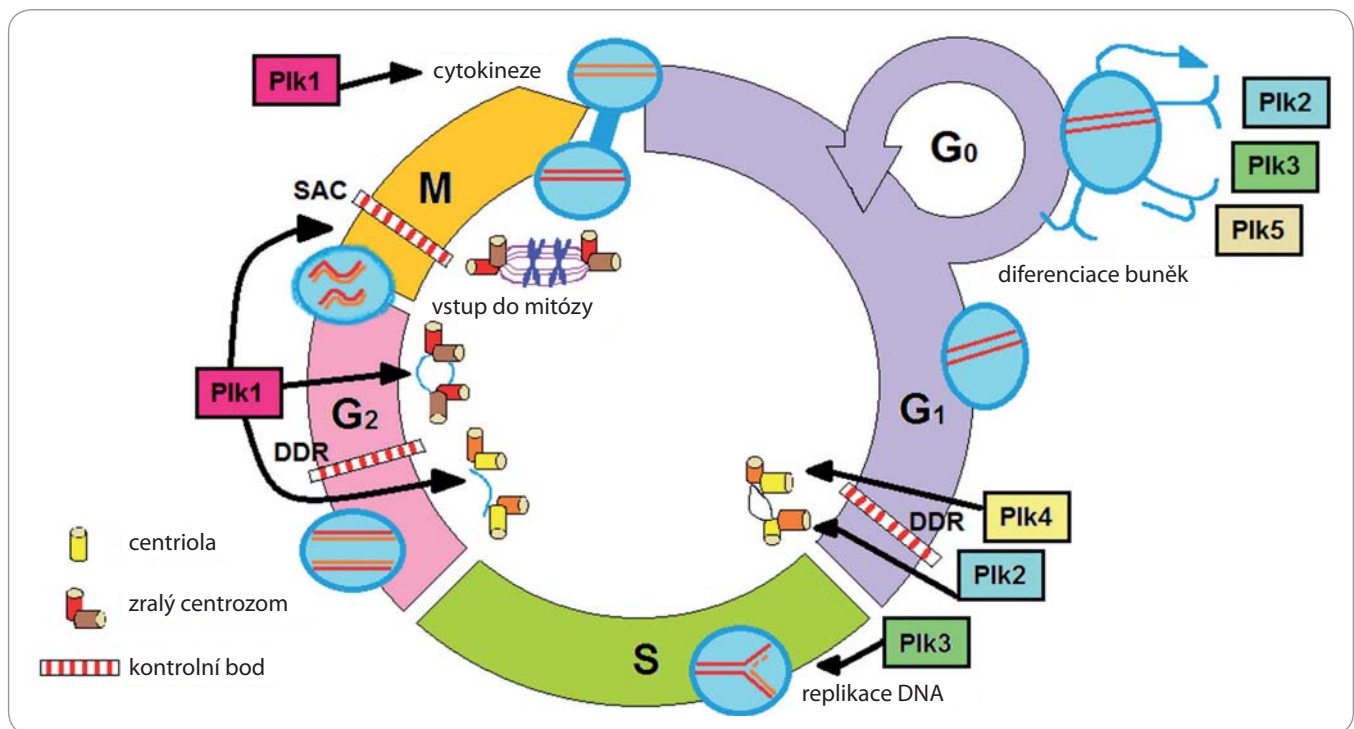
interakce s checkpoint kinázou I i II a proteinem p53. Bylo také ukázáno, že Plk2 deficientní lidské nádorové buňky jsou citlivé na replikační stres [3]. Identifikace jasné role Plk2 jako nádorového supresoru je komplikována zajímavou skutečností, že ztráta exprese Plk2 vede ke zvýšené hladině Plk3, která je sama o sobě také považována za nádorový supresor [4].

Hladina Plk3 zůstává v průběhu buněčného cyklu poměrně stálá, ale její kinázová aktivita vrcholí v pozdní S fázi a ve fázi G2 [5]. Obecně můžeme říci, že její role je protichůdná k pro-proliferativní roli Plk1. Role Plk3 jako nádorového supresoru spočívá mimo jiné ve fosforylaci serinu 20 proteinu p53, což brání jeho interakci s ubikvitin ligázou MDM2, čímž dochází ke stabilizaci p53 a k zabránění jeho degradace [6]. Dalším substrátem Plk3 je také nádorový supresor PTEN, jehož fosforylace též vede k jeho stabilizaci [7]. Srovnání profilů genové exprese Plk3 ukazuje na jeho sníženou hladinu v nádorech [8] a naopak jeho overexpresi v savčích buňkách vede

k zástavě růstu a indukcii kondenzace chromatinu a apoptóze.

Expresi proteinu Plk4 (označovan i jako SAK) vrcholí v průběhu mitózy a jeho funkce je nezbytná pro duplikaci centrozomu. Plk4 opět interaguje s proteiny regulujícími proliferaci, např. p53 [9] a Cdc25C [10]. Co se týče vztahu tohoto proteinu k nádorové transformaci, aberantní exprese byla detekována v nádorech kolorekta [11]. Na buněčných liniích nádoru prsu bylo rovněž ukázáno, že deplece Plk4 snižuje jejich proliferaci ve srovnání s buňkami normální tkáně [12]. Byla také vyvinuta řada inhibitorů Plk4, které ukázaly protinádorový efekt na buněčných a *in vivo* modelech nádoru prsu [13].

Posledním, nejpozději objeveným členem rodiny polo-like kináz je Plk5, jejíž role je spíše podobná Plk2 a Plk3 než Plk1 a Plk4, i když obsahuje nefunkční zkrácenou kinázovou doménu [14]. Overexpresi Plk5 vede k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi a také k apoptóze, podobně jako je tomu u Plk3. Je exprimována hlavně v diferencovaných tká-



Obr. 1. Fyziologické funkce Plk v buňce.

Plk1–4 jsou zapojeny např. v procesech duplikace centrioly (Plk2 a Plk4), replikace DNA (Plk3), zrání a oddělení centrozomů (Plk1), vstup do mitózy (Plk1), tvorba vřeténka, segregace chromozomů a cytokineze (Plk1).

DDR – odpověď na poškození DNA, SAC – kontrolní bod sestavení vřeténka

Upraveno dle [15].

ních, jako např. mozeček, a její exprese je epigeneticky umlčena u glioblastomů [15,16]. Komplexní a podrobnější informace o jednotlivých členech proteinů rodiny Plk lze najít v přehledovém článku De Cárcer et al [15].

Fyziologické funkce Plk1

Plk1 je jeden z klíčových proteinů podílejících se na progresi buněčného cyklu (obr. 1). Buněčný cyklus je série velmi přísně řízených procesů vrcholící rozdělením mateřské buňky na dvě dceřiné. Přechod mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu (G1 – gap 1, S – synthesis, G2 – gap 2 a M – mitosis) je regulován fosforylacemi a ubikvitinacemi proteinů, které jsou řízeny cykliny a cyclin-dependentními kinázami. Exprese *Plk1* je přímo spojena s jednotlivými fázemi cyklu, přičemž hladina proteinu se začíná zvyšovat v S fázi, vrcholí při přechodu G2–M, ustálí se v průběhu mitózy a ostře klesá po ukončení M fáze [17]. Konkrétní zapojení Plk1 do M fáze spočívá ve fosforylaci (aktivaci) komplexu cyclin B1/Cdk1, který je hlavním regulátorem vstupu buňky do M fáze [18–21]. Plk1 se také podílí na procesu tvorby centrozomů a skládání mitotického vřeténka fosforylací Ninein-like proteinu (NLP), což je protein asociovaný v interfázi s centrozomy [22]. Takto fosforylovaný NLP umožňuje buňce přepnout z interfáze do mitózy tím, že NLP disociuje z centrozomu a umožní jeho „dozrání“ [22]. Další substrát fosforylovaný Plk1 je protein p150^{Glued}, který je důležitý pro „destrukci“ jaderného obalu, k níž dochází v průběhu mitózy na konci profáze [23]. Plk1 se také podílí na správném přichycení mikrotubulů kinetochoru fosforylací klíčových proteinů CLIP-170 [24] a Sgt1 [25] – tento proces umožňuje rovnoměrnou segregaci chromozomů. Plk1 též iniciuje uvolnění z mitózy aktivací anafázi podporujícího komplexu, čímž hraje významnou roli při cytokinezi [26].

Funkce Plk1 nejsou omezeny pouze na buněčnou proliferaci, ale tato kináza se uplatňuje i při stresové signalizaci, konkrétně při odpovědi buňky na poškození DNA [27,28]. V nádorových buňkách vede snížení hladiny Plk1 k nahromadění poškozené DNA a následné

apoptóze, což ale neplatí u buněk normálních bez přítomnosti replikačního stresu [29].

Jelikož je Plk1 důležitá kináza při mitotickém dělení buněk, není překvapením, že tomuto faktu odpovídá i její distribuce v tkáních. V průběhu embryogeneze je Plk1 exprimována ve vysoce proliferujících tkáních a stejně tak je tomu i u dospělého člověka, kde můžeme Plk1 nalézt ve varlatech, slezině a kostní dřeni, nikoli však v ostatních neproliferujících tkáních, včetně slinivky, srdce, kůže mozku a ledvin [17,30]. U mnoha nádorových onemocnění je ovšem exprese Plk1 zvýšená ve srovnání s fyziologickým stavem, jak o tom bude pojednáno v následující kapitole.

Ve srovnání s Plk1 je tkáňová distribuce Plk2 a Plk3 širší a není tak úzce spojena s vysoce proliferujícími tkáněmi [31]. Jak již bylo uvedeno výše, hladina Plk5 je u proliferujících buněk dokonce snížena. Rozdílná tkáňově specifická exprese Plk je důležitým faktorem pro možnou budoucí klinickou aplikaci vyvíjených inhibitorů Plk1. Podrobnější informace o fyziologických funkcích Plk1 lze nalézt v přehledových článcích zahraničních autorů [32–34].

Plk1 v nádorové transformaci

Na rozdíl od normálních buněk, kde se Plk1 uplatňuje především v průběhu mitózy, u buněk nádorových dochází k přemístění Plk1 do jádra dříve než při přechodu G2–M, a dokonce zde může být detekován i v G1–S fázi, což svědčí o specifické funkci Plk1 u nádorových buněk v interfázi (období buněčného cyklu mezi dvěma M fázemi). Některé studie naznačují, že se může také uplatňovat v S fázi, kde fosforyluje proteiny nezbytné pro replikaci DNA [35–38].

Expresí Plk1 souvisí s růstem a progresí rozličných typů nádorů. Její zvýšenou hladinu můžeme najít u nemalobuněčného karcinomu plic, kde nepřímo koreluje s přežitím pacientů a je silným negativním prognostickým faktorem [39]. Stejná je situace u nádorů hlavy a krku [40,41] i jícnu [42]. Zvýšená hladina Plk1 se vyskytuje také u nádorů prsu [43–45], jater [46], slinivky [47,48], prostaty [49], stejně tak jako u kolorektálního karcinomu [11,50], nádorů en-

dometria [51] a vaječníků [52,53], kde byla prokázána korelace zvyšující se exprese Plk1 s „grade“ či „stage“ nádoru. Na druhou stranu spojitost zvýšené exprese Plk1 a prognózy nebyla prokázána u nádorů prostaty, slinivky a prsu [40,45,47,49].

Asi není třeba nějak zvlášť představovat a vyzdvihovat protein a nádorový supresor p53, který je jednou z centrálních molekul onkogeneze, a ztráta či změna jeho funkce (ať už mutacemi v genu *TP53* nebo inaktivací jeho signální dráhy) je přítomna u většiny nádorů [54–56]. Jako „strážce genomu“ [57] je aktivován obecně buněčným stresem a zasahuje např. do procesů opravy DNA, zastavení buněčného cyklu, apoptózy a senescence. Jeho aktivita a hladina v buňce je regulována celou řadou proteinů a posttranslačními modifikacemi [58,59]. Jednou z cest k úspěšnější léčbě onkologických pacientů by mohlo být obecně obnovení funkce proteinu p53 u nádorových buněk [56,60].

V současnosti existuje mnoho důkazů o tom, že Plk1 a signální dráha p53 se navzájem ovlivňují. Dráha p53 tlumí aktivitu promotoru genu *Plk1* hned několika způsoby. Jeden z nich má na svědomí protein p21^{WAF1}, mediátor signální dráhy p53, jenž inhibuje expresi Plk1 cílením na represorové elementy v promotoru *Plk1* [61]. Dále např. p53 negativně reguluje expresi proteinu FoxM1, což je onkogenní transkripční faktor, který stimuluje expresi Plk1 [61–64] a je jí samotnou pozitivně regulován prostřednictvím fosforylací [65]. Bylo ukázáno, že protein p53 reguluje expresi *Plk1* také přímo, a to tím, že se váže na promotor *Plk1* na dvou různých místech (p53 response element 1 a 2) [66].

Jelikož mutovaný p53 není schopen zabránit expresi *Plk1*, byla publikována studie ukazující na významnou korelaci pozitivního imunohistochemického barvení Plk1 u pacientek s primárními nádory prsu s přítomností nefunkčního mutovaného proteinu p53. Tyto pacientky vykazovaly také významně horší přežití oproti pacientkám pouze s pozitivním barvením Plk1 nebo pouze s mutací p53 [45].

Jak bylo popsáno výše, regulace Plk1 a p53 je vzájemná. To znamená, že Plk1

se nenechá jen pasivně řídit dráhou proteinu p53, nýbrž také negativně reguluje p53, a to jak přímo, tak pomocí nepřímých mechanismů. U buněčné linie plicního karcinomu H1299 bylo prokázáno, že se Plk1 fyzicky váže na DNA-vazebnou doménu proteinu p53, čímž dochází k inhibici funkce tohoto proteinu [67]. Tato negativní regulace by mohla být fundamentálním mechanismem pro roli Plk1 v onkogenezi. Jelikož se mnoho bodových mutací vyskytuje právě v DNA-vazebné doméně p53, bude zajímavé zjistit, jestli některá z těchto mutací brání v interakci s Plk1, a tudíž vede k deregulaci inhibice proteinu p53. Nepřímým mechanismem inaktivace proteinu p53 pomocí Plk1 je fosforylace proteinů, které jsou odpovědné za degradaci p53. Jedním z nich je protein MDM2, který svojí E3 ubikvitin ligázovou aktivitou právě negativně reguluje aktivitu proteinu p53 [68]. Plk1 fosforyluje MDM2 na serinu 260, čímž dochází ke stimulaci této degradace [69]. Plk1 fosforyluje také topoizomerázu I-vázající protein (Topors), jež vykazuje jak ubikvitin, tak SUMO-1 E3 ligázovou aktivitu a váže se rovněž na p53. Fosforylace serinu 718 na proteinu Topors vede k potlačení sumoylace a naopak k posílení ubikvitinace proteinu p53 a jeho následné degradaci [70]. Konečně posledním nepřímým mechanismem regulace p53 kinázou Plk1, o němž se zmíníme, je i fosforylace serinu 435 proteinu GTSE1 (G2 a S-phase-expressed 1 protein), která také vede k degradaci p53 [71].

Dříve bylo ukázáno, že u nádorových buněk s nefunkčním proteinem p53 vede snížená hladina Plk1 k větší cytotoxicitě v porovnání s normálními buňkami [29,72–75]. Ve studii provedené na buněčné linii kolorektálního karcinomu HCT116 *TP53*^{-/-} vedla inhibice Plk1 k výraznému snížení tvorby nádorů na zvířecích modelech [76]. Obdobný závěr, tedy větší citlivost k inhibici Plk1 u nádorových buněk s defektním proteinem p53 (v porovnání s nemutovaným proteinem p53), lze vyvodit také ze studií dalších inhibitorů Plk1 [72,77]. Skutečnost, že nádorové buňky s nefunkčním proteinem p53 by byly více náchylné k inhibici Plk1 než

buňky zdravé, by mohla představovat významné terapeutické okno. Na druhou stranu byly publikovány práce testující různé inhibitory Plk1, které ukazují, že inhibitory Plk1 cílí na všechny rychle proliferující buňky bez rozdílu (rakovinné a normální) [78–81]. Tento fakt by mohl vysvětlit silné vedlejší účinky pozorované při aplikaci inhibitorů Plk1 v rámci klinických studií [82–84]. Bylo také ukázáno, že citlivost k inhibici Plk1 se neliší na základě statutu proteinu p53 [85–88], jinými slovy, že ztráta funkce proteinu p53 není přímo spojena s vyšší citlivostí k inhibici Plk1 [89]. Je jasné, že tato výše uvedená kontroverzní pozorování bude nutné vysvětlit a bude zajímavé sledovat výsledky těchto studií.

Inhibitory Plk1

Jednou z hlavních funkcí Plk1 je regulace tvorby mitotického vřeténka, inhibice Plk1 proto vede k závažným defektům při jeho tvorbě, jejichž výsledkem je zástava mitózy, a k indukci apoptózy [90,91]. Díky této centrální roli v regulaci buněčného cyklu je Plk1 považována za vhodný cíl protinádorové terapie [74,91–97]. Hluboká kavita ATP-vazebné domény kináz je obecným cílem návrhu ATP kompetitivních inhibitorů. Na druhou stranu základní problém při návrhu takových inhibitorů je vysoká strukturní zakonzervovanost těchto ATP-vazebných oblastí, což má za následek sníženou specifitu a vyšší pravděpodobnost nežádoucích efektů. Přesto bylo vyvinuto několik inhibitorů Plk1 cílených na ATP-vazebnou doménu. Přehled všech inhibitorů Plk1, které uvedeme v textu, je znázorněn v obr. 2.

Za takový „prototyp“ je považován inhibitor společnosti Boehringer Ingelheim s názvem **BI 2536** (derivát dihydropteridinonu), který posloužil k mnoha studiím osvětlujícím roli Plk1 u nádorových buněk a k objasnění konsekvencí a terapeutického potenciálu inhibice Plk1 [83,98]. Ukázalo se, že způsobuje mitotické abnormality a apoptózu u mnoha buněčných nádorových linií [79,98] a u vysokého procenta buněk dochází k tvorbě monopolárních vřetének. Tento inhibitor prošel klinickými studiemi fáze I a II, ale nebyla u něj prokázána dostatečná protinádorová

aktivita [83,99–101]. Z velké části je to přisuzováno jeho slabým farmakokinetickým vlastnostem, stejně tak jako aktivitě proti Plk3 (která je považována za nádorový supresor) a s tím spojeným nejednoznačným efektem na buněčnou proliferaci.

V další generaci byl proto vyvinut inhibitor **BI 6727 – volasertib** s jednoznačně vylepšenými farmakokinetickými vlastnostmi [102]. I když velmi silně inhibuje Plk1, stále vykazuje i nezanedbatelnou aktivitu vůči Plk2 a Plk3 (IC₅₀ = 0,87, 5 a 56 nM). BI 6727 je velmi účinný u několika typů nádorů včetně melanomu, rakoviny střeva a hematopoetických malignit. Prošel několika klinickými studiemi fáze I a II [103,104] a u pacientů s akutní myeloidní leukemií probíhá nyní klinická studie fáze III [105].

Inhibitor společnosti Glaxo Smith Kline **GSK461364** je derivát thiofenu, který vykazuje více než 1 000krát větší selektivitu pro inhibici Plk1 oproti Plk2 a Plk3. Stejně tak jako BI2536 je účinný u mnoha nádorových buněčných linií, větší citlivost byla navíc prokázána u linií s nefunkčním proteinem p53 [77]. Inhibitor byl testován v I. fázi klinické studie u pacientů se solidními nádory a non-Hodgkinovým lymfomem [106].

Poslední ATP-kompetitivní inhibitor Plk1, o němž se zmíníme, je **NMS-P937** [107]. Jedná se o sloučeninu s jádrem pyrazolochinazolinu, která indukuje zástavu buněčného cyklu v G2–M fázi a vykazuje antiproliferační aktivitu u více než stovky hematologických a solidních nádorů [108]. Výhodou je orální podání a inhibitor byl testován v klinické studii fáze I u pacientů s pokročilými/metastatickými solidními tumory [109].

Jak bylo naznačeno výše, většina ATP-kompetitivních inhibitorů vykazuje aktivitu také proti Plk2 a Plk3, což není překvapivé vzhledem k vysoké sekvenční homologii povrchu ATP-vázající kavity (až 90 %) [110]. Druhou skupinou Plk1 inhibitorů jsou tudíž takové, jež cílí na tzv. polo-box doménu (PBD), která se nachází v C-koncové části a obsahuje specifickou vazebnou oblast pro interakce se substrátem, zajišťuje danou subcelulární lokalizaci Plk1 (centrozomy, kinetochor, vřeténko, Golgiho aparát atd.) a podílí se také na regulaci samotné ki-

názové aktivity [111,112]. Blokování PBD domény specifické pro Plk by mělo zaručit větší specifitu takových inhibitorů.

První objevenou nepeptidovou sloučeninou kompetující o vazbu na PBD Plk1 byl **poloxin** [113]. Jeho základní strukturou je thymochinon, což je biologicky aktivní sloučenina obsažená v oleji z černuchy seté (*Nigella sativa*, lidově černý kmín), který je znám pro své protizánětlivé, antioxidační a anti-neoplastické vlastnosti [114,115]. Poloxin indukuje fragmentaci centrozomu, a tím zastavuje mitózu. Dále silně potlačuje proliferaci u nádorových linií, což následně vede k apoptóze [78]. Ačkoli objevení poloxinu byl důležitý posun v návrhu PBD Plk1 inhibitorů a přispěl k pochopení funkcí Plk1, ukázal se nakonec jako nespecifický a málo účinný [116].

Další inhibitor PBD domény byl objeven screeningem knihovny přírodních látek. **Purpurogallin** je extrahován z hálek dubů a u HeLa buněk zabráňuje přemístění Plk1 k centrozomům, čímž dochází k zastavení mitotického dělení [80]. Je známo, že purpurogallin inhibuje i aktivitu proteinů, které neobsahují PBD, např. tyrozin kináz a HIV-1 integrázy, chemická podstata účinku této látky proto musí být dále zkoumána [117–119].

Jako zajímavé se dále jeví inhibitory PBD ve formě peptidů, které blokuji PBD na principu protein-proteinových interakcí. Takové peptidy jsou nejčastěji odvozeny ze substrátů Plk1 interagujících s PBD (např. CDC25C nebo PBIP) [120,121].

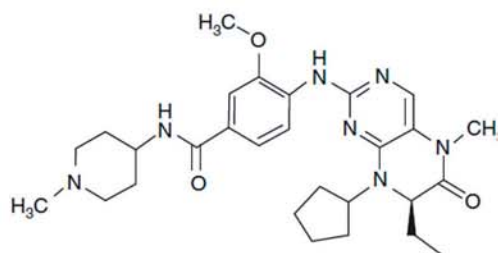
Závěrem tohoto odstavce je třeba říci, že vývoj inhibitorů Plk1 je v současnosti skutečně rychlý, a není proto v možnostech tohoto sdělení podat vyčerpávající a aktuální výčet informací. Rozsáhlejší přehled lze najít např. v přehledových článcích Klause Strebhardta [122,123].

Závěrem

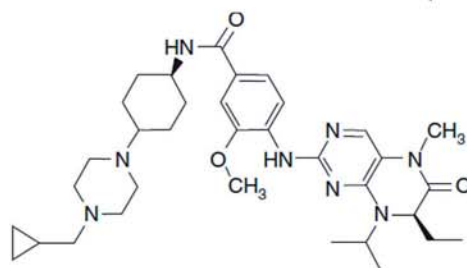
Není pochyb o tom, že Plk1 hraje významnou roli při buněčném dělení. Její deregulace souvisí s nádorovou transformací buněk, a stala se proto atraktivním cílem pro vývoj protinádorových léčiv. Jelikož ostatní členové rodiny Plk (kromě Plk4) vykonávají spíše tumor supreso-

ATP-kompletující faktory

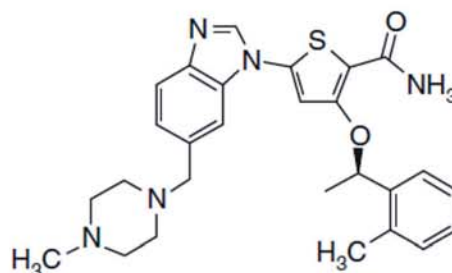
BI 2536



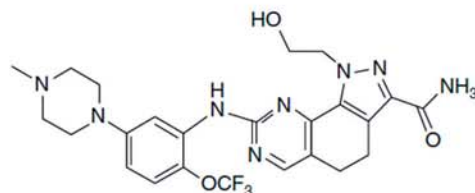
BI 6727



GSK461364

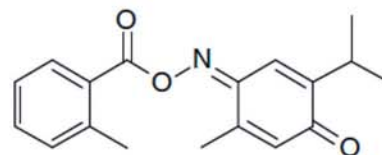


NMS-P937

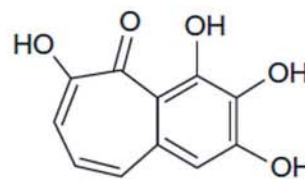


inhibitory polo-box domény

poloxin



purpurogallin



Obr. 2. Přehled a chemická struktura inhibitorů Plk1 prezentovaných v textu.

rové funkce, bude nezbytné zajistit specifitu inhibice vůči Plk1. To, stejně jako zabránění inhibice ostatních kináz, by mohly zaručit nově vyvíjené a testované inhibitory cílící na specifickou polo-box doménu. Bude ale důležité zároveň zajistit srovnatelnou účinnost s inhibitory ATP-vázající domény, které už byly úspěšně testovány i v klinických studiích. Pro implementaci těchto inhibitorů zase bude nezbytné monitorovat časnou odpověď buněk. Pro tyto účely se jistě stane cennou vyvinutá metoda ELISA, která umožňuje kvantifikaci aktivity Plk1 v malých objemech buněčných lysátů [124].

I přes značný pokrok v osvětlení funkcí Plk1 v kancerogenezi a efektů provázejících její inhibici zbývá spousta otázek týkajících se především konkrétního mechanismu účinku inhibitorů, spojitosti statutu proteinu p53 a odpovědi na inhibici Plk1, stejně jako srovnání cytotoxicity inhibitorů Plk1 s ostatními užívanými anti-tubulinovými léčivy, jež budou muset být v budoucnu zodpovězeny.

Literatura

- Burns TF, Fei P, Scata KA et al. Silencing of the novel p53 target gene *Snk/Plk2* leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23(16): 5556–5571.
- Warnke S, Kemmler S, Hames RS et al. Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol CB* 2004; 14(13): 1200–1207.
- Matthew EM, Yen TJ, Dicker DT et al. Replication stress, defective S-phase checkpoint and increased death in Plk2-deficient human cancer cells. *Cell Cycle Georget Tex* 2007; 6(20): 2571–2578.
- Syed N, Smith P, Sullivan A et al. Transcriptional silencing of polo-like kinase 2 (*SNK/PLK2*) is a frequent event in B-cell malignancies. *Blood* 2006; 107(1): 250–256.
- Wang Q, Xie S, Chen J et al. Cell cycle arrest and apoptosis induced by human polo-like kinase 3 is mediated through perturbation of microtubule integrity. *Mol Cell Biol* 2002; 22(10): 3450–3459.
- Xie S, Wu H, Wang Q et al. Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *J Biol Chem* 2001; 276(46): 43305–43312.
- Xu D, Yao Y, Jiang X et al. Regulation of PTEN stability and activity by Plk3. *J Biol Chem* 2010; 285(51): 39935–39942. doi: 10.1074/jbc.M110.166462.
- Winkles JA, Alberts GF. Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. *Oncogene* 2005; 24(2): 260–266.
- Swallow CJ, Ko MA, Siddiqui NU et al. Sak/Plk4 and mitotic fidelity. *Oncogene* 2005; 24(2): 306–312.
- Bonni S, Ganuelas ML, Petrinc S et al. Human Plk4 phosphorylates Cdc25C. *Cell Cycle Georget Tex* 2008; 7(4): 545–547.
- Macmillan JC, Hudson JW, Bull S et al. Comparative expression of the mitotic regulators SAK and PLK in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(9): 729–740.
- Mason J, Wei S, Luo X et al. Inhibition of polo-like kinase 4 as an anti-cancer strategy. *Cancer Res* 2011; 71 (Suppl 8): abstr. LB-215.
- Laufer R, Forrest B, Li S-W et al. The discovery of PLK4 inhibitors: (E)-3-((1H-Indazol-6-yl)methylene)indolin-2-ones as novel antiproliferative agents. *J Med Chem* 2013; 56(15): 6069–6087. doi: 10.1021/jm400380m.
- Andrýsik Z, Bernstein WZ, Deng L et al. The novel mouse polo-like kinase 5 responds to DNA damage and localizes in the nucleolus. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(9): 2931–2943. doi: 10.1093/nar/gkq011.
- De Cárcer G, Manning G, Malumbres M. From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle Georget Tex* 2011; 10(14): 2255–2262.
- de Cárcer G, Escobar B, Higuero AM et al. Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression. *Mol Cell Biol* 2011; 31(6): 1225–1239. doi: 10.1128/MCB.00607-10.
- Golsteyn RM, Schultz SJ, Bartek J et al. Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila* polo and *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5. *J Cell Sci* 1994; 107(6): 1509–1517.
- Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Shinya N et al. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 2001; 410(6825): 215–220.
- Kumagai A, Dunphy WG. Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* 1996; 273(5280): 1377–1380.
- Abrieu A, Brassac T, Galas S et al. The Polo-like kinase Plk1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 1998; 111(12): 1751–1757.
- Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* 2002; 3(4): 341–348.
- Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U et al. Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell* 2003; 5(1): 113–125.
- Li H, Liu XS, Yang X et al. Polo-like kinase 1 phosphorylation of p150Glued facilitates nuclear envelope breakdown during prophase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(33): 14633–14638. doi: 10.1073/pnas.1006615107.
- Li H, Liu XS, Yang X et al. Phosphorylation of CLIP-170 by Plk1 and CK2 promotes timely formation of kinetochore-microtubule attachments. *EMBO J* 2010; 29(17): 2953–2965. doi: 10.1038/emboj.2010.174.
- Liu XS, Song B, Tang J et al. Plk1 phosphorylates Sgt1 at the kinetochores to promote timely kinetochore-microtubule attachment. *Mol Cell Biol* 2012; 32(19): 4053–4067. doi: 10.1128/MCB.00516-12.
- Hansen DV, Loktev AV, Ban KH et al. Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* 2004; 15(12): 5623–5634.
- Yoo HY, Kumagai A, Shevchenko A et al. Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of claspins by the polo-like kinase. *Cell* 2004; 117(5): 575–588.
- Mameli I, van Vugt MA, Smits VA et al. Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of Claspins during checkpoint recovery. *Curr Biol CB* 2006; 16(19): 1950–1955.
- Liu X, Lei M, Erikson RL. Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion. *Mol Cell Biol* 2006; 26(6): 2093–2108.
- Clay FJ, McEwen SJ, Bertoncello I et al. Identification and cloning of a protein kinase-encoding mouse gene, Plk, related to the polo gene of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(11): 4882–4886.
- Yim H, Erikson RL. Plk1-targeted therapies in TP53- or RAS-mutated cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2014; 761: 31–39. doi: 10.1016/j.mrrev.2014.02.005.
- Archambault V, Lépine G, Kachaner D. Understanding the polo kinase machine. *Oncogene*. In press 2015. doi: 10.1038/ncr.2014.451.
- Hyun SY, Hwang HI, Jang YJ. Polo-like kinase-1 in DNA damage response. *BMB Rep* 2014; 47(5): 249–255.
- Song B, Liu XS, Liu X. Polo-like kinase 1 (Plk1): an Unexpected Player in DNA Replication. *Cell Div* 2012; 7: 3. doi: 10.1186/1747-1028-7-3.
- Yim H, Erikson RL. Polo-like kinase 1 depletion induces DNA damage in early S prior to caspase activation. *Mol Cell Biol* 2009; 29(10): 2609–2621. doi: 10.1128/MCB.01277-08.
- Li H, Wang Y, Liu X. Plk1-dependent phosphorylation regulates functions of DNA topoisomerase II alpha in cell cycle progression. *J Biol Chem* 2008; 283(10): 6209–6221. doi: 10.1074/jbc.M709007200.
- Shen M, Cai Y, Yang Y et al. Centrosomal protein FOR20 is essential for S-phase progression by recruiting Plk1 to centrosomes. *Cell Res* 2013; 23(11): 1284–1295. doi: 10.1038/cr.2013.127.
- Tsvetkov L, Stern DF. Interaction of chromatin-associated Plk1 and Mcm7. *J Biol Chem* 2005; 280(12): 11943–11947.
- Wolf G, Elez R, Doerner A et al. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1997; 14(5): 543–549.
- Knecht R, Oberhauser C, Strebhardt K. PLK (polo-like kinase), a new prognostic marker for oropharyngeal carcinomas. *Int J Cancer J Int Cancer* 2000; 89(6): 535–536.
- Knecht R, Elez R, Oechler M et al. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59(12): 2794–2797.
- Tokumitsu Y, Mori M, Tanaka S et al. Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 15(4): 687–692.
- Weichert W, Kristiansen G, Winzer KJ et al. Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. *Virchows Arch* 2005; 446(4): 442–450.
- Wolf G, Hildenbrand R, Schwar C et al. Polo-like kinase: a novel marker of proliferation: correlation with estrogen-receptor expression in human breast cancer. *Pathol Res Pract* 2000; 196(11): 753–759.
- King SI, Purdie CA, Bray SE et al. Immunohistochemical detection of polo-like kinase-1 (PLK1) in primary breast cancer is associated with TP53 mutation and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res BCR* 2012; 14(2): R40.
- Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Baltim Md* 2010; 51(3): 857–868. doi: 10.1002/hep.23467.
- Weichert W, Schmidt M, Jacob J et al. Overexpression of polo-like kinase 1 is a common and early event in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2005; 5(2–3): 259–265.
- Gray PJ Jr, Bearss DJ, Han H et al. Identification of human polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(5): 641–646.
- Weichert W, Schmidt M, Gekeler V et al. Polo-like kinase 1 is overexpressed in prostate cancer and linked to higher tumor grades. *Prostate* 2004; 60(3): 240–245.
- Weichert W, Kristiansen G, Schmidt M et al. Polo-like kinase 1 expression is a prognostic factor in human colon cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11(36): 5644–5650.
- Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K et al. Polo-like kinase (PLK) expression in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2001; 169(1): 41–49.
- Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K et al. Expression of polo-like kinase in ovarian cancer is associated with histological grade and clinical stage. *Cancer Lett* 2001; 164(1): 41–49.
- Weichert W, Denkert C, Schmidt M et al. Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 90(4): 815–821.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342(6250): 705–708.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408(6810): 307–310.

56. Brown CJ, Lain S, Verma CS et al. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(12): 862–873. doi: 10.1038/nrc2763.
57. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381): 15–16.
58. Junttila MR, Evan GI. p53 – a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(11): 821–829. doi: 10.1038/nrc2728.
59. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(10): 793–805.
60. Cheok CF, Verma CS, Baselga J et al. Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(1): 25–37. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.174.
61. Zhu H, Chang BD, Uchiumi T et al. Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase II alpha genes by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* 2002; 1(1): 59–66.
62. Pandit B, Halasi M, Gartel AL. p53 negatively regulates expression of FoxM1. *Cell Cycle* 2009; 8(20): 3425–3427.
63. Barsotti AM, Prives C. Pro-proliferative FoxM1 is a target of p53-mediated repression. *Oncogene* 2009; 28(48): 4295–4305. doi: 10.1038/onc.2009.282.
64. Wang IC, Chen YJ, Hughes D et al. Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 2005; 25(24): 10875–10894.
65. Fu Z, Malureanu L, Huang J et al. Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat Cell Biol* 2008; 10(9): 1076–1082. doi: 10.1038/ncb1767.
66. McKenzie L, King S, Marcar L et al. p53-dependent repression of polo-like kinase-1 (PLK1). *Cell Cycle* 2010; 9(20): 4200–4212.
67. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H et al. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem* 2004; 279(24): 25549–25561.
68. Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell* 2009; 137(4): 609–622. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.050.
69. Dias SS, Hogan C, Ochocka AM et al. Polo-like kinase-1 phosphorylates MDM2 at Ser260 and stimulates MDM2-mediated p53 turnover. *FEBS Lett* 2009; 583(22): 3543–3548. doi: 10.1016/j.febslet.2009.09.057.
70. Yang X, Li H, Zhou Z et al. Plk1-mediated phosphorylation of topors regulates p53 stability. *J Biol Chem* 2009; 284(28): 18588–18592. doi: 10.1074/jbc.C109.001560.
71. Liu XS, Li H, Song B et al. Polo-like kinase 1 phosphorylation of G2 and S-phase-expressed 1 protein is essential for p53 inactivation during G2 checkpoint recovery. *EMBO Rep* 2010; 11(8): 626–632. doi: 10.1038/embor.2010.90.
72. Guan R, Tapang P, Levenson JD et al. Small interfering RNA-mediated polo-like kinase 1 depletion preferentially reduces the survival of p53-defective, oncogenic transformed cells and inhibits tumor growth in animals. *Cancer Res* 2005; 65(7): 2698–2704.
73. Lansing TJ, McConnell RT, Duckett DR et al. In vitro biological activity of a novel small-molecule inhibitor of polo-like kinase 1. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(2): 450–459.
74. Spänkuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M et al. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(24): 1863–1877.
75. Raab M, Kappel S, Krämer A et al. Toxicity modelling of Plk1-targeted therapies in genetically engineered mice and cultured primary mammalian cells. *Nat Commun* 2011; 2: 395. doi: 10.1038/ncomms1395.
76. Sur S, Pagliarini R, Bunz F et al. A panel of isogenic human cancer cells suggests a therapeutic approach for cancers with inactivated p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(10): 3964–3969. doi: 10.1073/pnas.0813333106.
77. Degenhardt Y, Greshock J, Laquerre S et al. Sensitivity of cancer cells to Plk1 inhibitor GSK461364A is associated with loss of p53 function and chromosome instability. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(7): 2079–2089. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0095.
78. Yuan J, Sanhaji M, Krämer A et al. Polo-box domain inhibitor poloxin activates the spindle assembly checkpoint and inhibits tumor growth in vivo. *Am J Pathol* 2011; 179(4): 2091–2099. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.031.
79. Steegmaier M, Hoffmann M, Baum A et al. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol* 2007; 17(4): 316–322.
80. Watanabe N, Sekine T, Takagi M et al. Deficiency in chromosome congression by the inhibition of Plk1 polo box domain-dependent recognition. *J Biol Chem* 2009; 284(4): 2344–2353. doi: 10.1074/jbc.M805308200.
81. Lu B, Mahmud H, Maass AH et al. The Plk1 inhibitor BI 2536 temporarily arrests primary cardiac fibroblasts in mitosis and generates aneuploidy in vitro. *PLoS One* 2010; 5(9): e12963. doi: 10.1371/journal.pone.0012963.
82. Mross K, Ditttrich C, Aulitzky WE et al. A randomised phase II trial of the Polo-like kinase inhibitor BI 2536 in chemo-naïve patients with unresectable exocrine adenocarcinoma of the pancreas – a study within the Central European Society Anticancer Drug Research (CESAR) collaborative network. *Br J Cancer* 2012; 107(2): 280–286. doi: 10.1038/bjc.2012.257.
83. Sebastian M, Reck M, Waller CF et al. The efficacy and safety of BI 2536, a novel Plk-1 inhibitor, in patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer who had relapsed after, or failed, chemotherapy: results from an open-label, randomized phase II clinical trial. *J Thorac Oncol* 2010; 5(7): 1060–1067. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181d95dd4.
84. Frost A, Mross K, Steinbild S et al. Phase I study of the Plk1 inhibitor BI 2536 administered intravenously on three consecutive days in advanced solid tumours. *Curr Oncol* 2012; 19(1): e28–e35. doi: 10.3747/co.19.866.
85. Sanhaji M, Kreis NN, Zimmer B et al. p53 is not directly relevant to the response of polo-like kinase 1 inhibitors. *Cell Cycle* 2012; 11(3): 543–553. doi: 10.4161/cc.11.3.19076.
86. Sanhaji M, Louwen F, Zimmer B et al. Polo-like kinase 1 inhibitors, mitotic stress and the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* 2013; 12(9): 1340–1351. doi: 10.4161/cc.24573.
87. Khan SH, Wahl GM. p53 and pRb prevent rereplication in response to microtubule inhibitors by mediating a reversible G1 arrest. *Cancer Res* 1998; 58(3): 396–401.
88. Stewart ZA, Mays D, Pietsenpol JA. Defective G1-S cell cycle checkpoint function sensitizes cells to microtubule inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59(15): 3831–3837.
89. Louwen F, Yuan J. Battle of the eternal rivals: restoring functional p53 and inhibiting polo-like kinase 1 as cancer therapy. *Oncotarget* 2013; 4(7): 958–971.
90. Kappel S, Matthess Y, Kaufmann M et al. Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression. *Nat Protoc* 2007; 2(12): 3257–3269.
91. Matthess Y, Kappel S, Spänkuch B et al. Conditional inhibition of cancer cell proliferation by tetracycline-responsive, H1 promoter-driven silencing of PLK1. *Oncogene* 2005; 24(18): 2973–2980.
92. Lane HA, Nigg EA. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* 1996; 135(6 Pt 2): 1701–1713.
93. Cogswell JP, Brown CE, Bisij JE et al. Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function. *Cell Growth Differ* 2000; 11(12): 615–623.
94. Spänkuch-Schmitt B, Wolf G, Solbach C et al. Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells. *Oncogene* 2002; 21(20): 3162–3171.
95. Yuan J, Krämer A, Eckardt F et al. Efficient internalization of the polo-box of polo-like kinase 1 fused to an Antennapedia peptide results in inhibition of cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2002; 62(15): 4186–4190.
96. Spänkuch B, Matthess Y, Knecht R et al. Cancer inhibition in nude mice after systemic application of U6 promoter-driven short hairpin RNAs against PLK1. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(11): 862–872.
97. Kappel S, Matthess Y, Zimmer B et al. Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi-cassettes. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(16): 4527–4536.
98. Lénárt P, Petronczki M, Steegmaier M et al. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol* 2007; 17(4): 304–315.
99. Hofheinz RD, Al-Batran SE, Hochhaus A et al. An open-label, phase I study of the polo-like kinase-1 inhibitor, BI 2536, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010; 16(18): 4666–4674. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0318.
100. Mross K, Frost A, Steinbild S et al. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of BI 2536, a novel polo-like kinase 1 inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2008; 26(34): 5511–5517. doi: 10.1200/JCO.2008.16.1547.
101. Schöffski P, Blay JY, De Greve J et al. Multicentric parallel phase II trial of the polo-like kinase 1 inhibitor BI 2536 in patients with advanced head and neck cancer, breast cancer, ovarian cancer, soft tissue sarcoma and melanoma. The first protocol of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Network Of Core Institutes (NOCI). *Eur J Cancer* 2010; 46(12): 2206–2215. doi: 10.1016/j.ejca.2010.03.039.
102. Rudolph D, Steegmaier M, Hoffmann M et al. BI 6727, a polo-like kinase inhibitor with improved pharmacokinetic profile and broad antitumor activity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2009; 15(9): 3094–3102. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2445.
103. Maertens J, Lubbert M, Fiedler W et al. Phase I/II study of volasertib (BI 6727), an intravenous polo-like kinase (Plk) inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia (AML): results from the randomized phase II part for volasertib in combination with low-dose cytarabine (LDAC) versus LDAC monotherapy in patients with previously untreated AML ineligible for intensive treatment. *Blood (ASH Annu Meet Abstr)* 2012; 120(21): abstr. 411.
104. Stadler WM, Vaughn DJ, Sonpavde G et al. An open-label, single-arm, phase 2 trial of the polo-like kinase inhibitor volasertib (BI 6727) in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer. *Cancer* 2014; 120(7): 976–982. doi: 10.1002/cncr.28519.
105. ClinicalTrials.gov [homepage on the Internet]. A service of the U.S. National Institutes of Health; c2000–15 [updated 2015 March 8; cited 2015 April 15]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01721876?term=NCT01721876&rank=1>.
106. Olmos D, Barker D, Sharma R et al. Phase I study of GSK461364, a specific and competitive polo-like kinase 1 inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2011; 17(10): 3420–3430. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2946.
107. Beria I, Bossi RT, Brasca MG et al. NMS-P937, a 4,5-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-h]quinazoline derivative as potent and selective polo-like kinase 1 inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(10): 2969–2974. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.03.054.
108. Valsasina B, Beria I, Alli C et al. NMS-P937, an orally available, specific small-molecule polo-like kinase 1 inhibitor with antitumor activity in solid and hematologic malignancies. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(4): 1006–1016. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0765.
109. ClinicalTrials.gov [homepage on the Internet]. A service of the U.S. National Institutes of Health; c2000–15 [updated 2012 September 6; cited 2015 April 15]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01014429?term=NMS-1286937&rank=1>.

110. Johnson EF, Stewart KD, Woods KW et al. Pharmacological and functional comparison of the polo-like kinase family: insight into inhibitor and substrate specificity. *Biochemistry* 2007; 46(33): 9551–9563.
111. Elia AE, Cantley LC, Yaffe MB. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 2003; 299(5610): 1228–1231.
112. Elia AEH, Rellos P, Haire LF et al. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* 2003; 115(1): 83–95.
113. Reindl W, Yuan J, Krämer A et al. Inhibition of polo-like kinase 1 by blocking polo-box domain-dependent protein-protein interactions. *Chem Biol* 2008; 15(5): 459–466. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.03.013.
114. Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(8): 1249–1253.
115. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D et al. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67(16): 7782–7788.
116. Craig SN, Wyatt MD, McInnes C. Current assessment of polo-like kinases as anti-tumor drug targets. *Expert Opin Drug Discov* 2014; 9(7): 773–789. doi: 10.1517/17460441.2014.918100.
117. Abou-Karam M, Shier WT. Inhibition of oncogene product enzyme activity as an approach to cancer chemoprevention. Tyrosine-specific protein kinase inhibition by purpurogallin from *Quercus sp. nutgall*. *Phytother Res PTR* 1999; 13(4): 337–340.
118. Farnet CM, Wang B, Hansen M et al. Human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: new aromatic hydroxylated inhibitors and studies of the inhibition mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(9): 2245–2253.
119. Inamori Y, Muro C, Sajima E et al. Biological activity of purpurogallin. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61(5): 890–892.
120. Yun SM, Moulaei T, Lim D et al. Structural and functional analyses of minimal phosphopeptides targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(8): 876–882. doi: 10.1038/nsmb.1628.
121. McInnes C, Estes K, Baxter M et al. Targeting subcellular localization through the polo-box domain: non-ATP competitive inhibitors recapitulate a PLK1 phenotype. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(8): 1683–1692. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0006-T.
122. Strebhardt K, Becker S, Matthes Y. Thoughts on the current assessment of polo-like kinase inhibitor drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2015; 10(1): 1–8. doi: 10.1517/17460441.2015.962510.
123. Strebhardt K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(8): 643–660. doi: 10.1038/nrd3184.
124. Park JE, Li L, Park J et al. Direct quantification of polo-like kinase 1 activity in cells and tissues using a highly sensitive and specific ELISA assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(6): 1725–1730. doi: 10.1073/pnas.0812135106.

PDLIM2 a jeho role v onkogenezi – tumor supresor nebo onkoprotein?

PDLIM2 and Its Role in Oncogenesis – Tumor Suppressor or Oncoprotein?

Maryáš J.¹, Bouchal P.^{1,2}

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Ústav biochemie, PřF MU, Brno

Souhrn

PDZ a LIM domény obsahující protein 2 (PDLIM2), jinak také *Mystique* či *SLIM*, je nejnovějším členem tzv. s aktininy asociované LIM proteinové rodiny proteinů, jejíž členové jsou zásadním způsobem zapojeni do regulace celé škály biologických procesů včetně organizace buněčného cytoskeletu, buněčné diferenciace či onkogeneze. Samotný PDLIM2 je cytoskeletálně i nukleárně lokalizovaný protein kódovaný genem *Mystique* lokalizovaném na chromozomu 8p21, který reguluje stabilitu a aktivitu nejrůznějších transkripčních faktorů, např. NF-κB či STAT. Deregulace PDLIM2 souvisí s celou řadou patologických stavů včetně onkogeneze, přičemž hladiny tohoto proteinu mohou korelovat jak se vznikem, tak se supresí nádorů. Hladiny PDLIM2 jsou epigeneticky potlačeny u celé řady nádorů a to v důsledku hypermetylace promotoru genu *Mystique*, která brání jeho transkripci. Reaktivace PDLIM2 je schopna potlačit tumorigenicitu a navodit smrt nádorových buněk *in vitro* i *in vivo*, což indikuje potenciální tumor supresivní roli tohoto proteinu. Na druhou stranu u nádorových buněčných linií odvozených od metastazujících nádorů bylo detekováno výrazné zvýšení mRNA i proteinových hladin PDLIM2 a bylo zjištěno, že PDLIM2 je asociován s progresí nádorů a vznikem metastáz, což spíše nahrává pro-onkogenní funkci tohoto proteinu. Hlavním cílem této práce je detailněji shrnout dosavadní poznatky o roli PDLIM2 v průběhu vzniku a vývoje nádorů, dále vyzdvihnout jeho potenciální využití v klinické praxi, především jako možného terapeutického cíle a také nabídnout možná vysvětlení dosud zjištěných rozdílných funkcí tohoto proteinu v onkogenezi.

Klíčová slova

PDLIM2 protein – COP9 signalozom (CSN) – onkogeneze – 5-aza-2'-deoxycytidin – nádory – metastáze

Summary

PDZ and LIM domain containing protein 2 (PDLIM2), also known as *Mystique* or *SLIM*, is a member of the actinin – associated LIM family of proteins that play essential roles in cytoskeleton organization, cell differentiation and have been associated with oncogenesis. PDLIM2 is cytoskeletal and nuclear protein encoded by the *Mystique* gene localized on chromosome 8p21. PDLIM2 regulates stability and activity of several transcription factors, e.g. NF-κB or STAT, and its deregulation is associated with several malignancies. PDLIM2 expression has been connected with both tumor suppression and tumorigenesis. PDLIM2 levels are epigenetically suppressed in different cancers due to *Mystique* promoter hypermethylation that blocks its transcription. PDLIM2 re-expression is able to inhibit tumorigenicity and induces tumor cell death both *in vitro* and *in vivo*, which suggest potential tumor suppressor role of PDLIM2. On the other hand, PDLIM2 is highly expressed in cancer cell lines derived from metastatic cancer and its expression is associated with tumor progression and metastasis formation, indicating pro-oncogenic role of PDLIM2. The aim of this review is to summarize current knowledge on the role of PDLIM2 in tumor formation and development, focusing on its prospective role as therapeutic target and offering potential explanations of its different functions in oncogenesis that were identified so far.

Key words

PDLIM2 protein – COP9 signalosome (CSN) – oncogenesis – 5-aza-2'-deoxycytidine – cancer – metastasis

Práce byla podpořena Grantovou agenturou ČR (projekt č. 14-19250S), Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101), stipendijním programem Brno Ph.D. talent – financuje statutární město Brno, projektem MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010004).

This study was supported by Czech Science Foundation (project No. 14-19250S), European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (OP VaVpl – RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101), Brno Ph.D. Talent Scholarship programme – Funded by the Brno City Municipality, by the project MEYS – NPS I – LO1413, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: bouchal@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 27. 3. 2015

Přijato/Accepted: 29. 6. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152540>

Úvod

PDZ a LIM domény obsahující protein 2 (PDLIM2), známý také jako *Mystique* či SLIM [1], je člen tzv. s aktininy asociované LIM proteinové rodiny (ALP), zahrnující proteiny s N-terminální PDZ doménou a C-terminálně lokalizovanou LIM doménou (obr. 1) [2]. Všichni členové ALP proteinové rodiny jsou schopni interagovat s aktinovým cytoskeletem pomocí jejich konzervované 80–100 aminokyselin dlouhé PDZ domény, jež zprostředkovává specifické protein-proteinové interakce, hraje významnou roli v sestavování proteinových komplexů asociovaných s plazmatickou membránou [3] a také v normálním buněčném vývoji [2]. LIM doména členů ALP proteinové rodiny stejně jako PDZ doména zprostředkovává protein-proteinové interakce, mimoto však vykazuje také E3 ubiquitin ligázovou aktivitu [4]. Interakce LIM domény jsou mnohem variabilnější než v případě domény PDZ [1]. LIM doména je tvořena sekvencí aminokyselin bohatou na cystein, která vytváří dva motivy zinkového prstu a účastní se např. interakcí v signálních drahách zapojených do buněčné diferenciace či souvisejících s onkogenezí [3]. Obecně PDZ a LIM domény obsahující proteiny jsou zapojeny do regulace celé škály biologických procesů včetně organizace buněčného cytoskeletu, buněčné diferenciace, vývoje orgánů, neurální signalizace či onkogeneze [5].

Protein PDLIM2, nejnovější člen ALP proteinové rodiny, je cytoskeletálně i nukleárně lokalizovaný protein regulující stabilitu nejrůznějších transkripčních faktorů v hematopoetických a epitelálních buňkách, např. transkripčních faktorů NF- κ B či STAT zapojených mimo

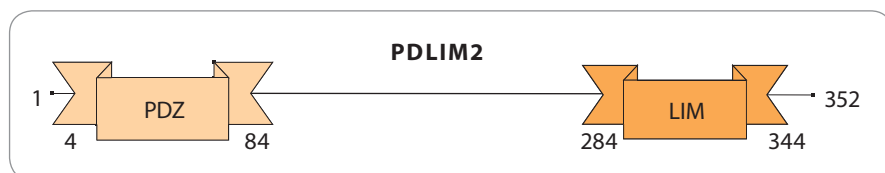
jiné do regulace imunitní odpovědi [6]. PDLIM2 byl prvně identifikován v epitelálních buňkách sítnice [2], hladiny tohoto proteinu však byly detekovány v celé řadě dalších buněčných linií včetně fibroblastů transformovaných overexpresí IGF-1R (receptor proinzulinu podobný růstový faktor 1), dále T lymfocytů, makrofágů, dendritických buněk či epitelálních nádorových buněk, u kterých reguluje buněčnou adhezi a migraci [7]. Protein PDLIM2 je kódován genem *Mystique* lokalizovaným na chromozomu 8p21 [3], tedy v oblasti, která je velmi často poškozena u celé řady nádorů [8]. Na úrovni cDNA byly detekovány 3 izoformy (*Mystique 1–3*), na úrovni proteinu však převládá izoforma 2 tvořená 352 aminokyselinami s relativní molekulovou hmotností 37,5 kDa (obr. 1) [3]. Bylo také zjištěno, že exprese *Mystique* a hladiny proteinu PDLIM2 jsou asociovány jak s nádorovou supresí, tak s tumorigenezí [3,4,6]. Dosavadní poznatky o funkci PDLIM2 v onkogenezi nádorů včetně jeho potenciálního využití v klinické praxi budou rozebrány v následujících částech tohoto článku.

PDLIM2 jako nádorový supresor

Jak již bylo uvedeno, exprese genu *Mystique* a hladiny proteinu PDLIM2 byly za fyziologických podmínek detekovány v celé řadě buněk a tkání [2] a jejich deregulace souvisí s celou řadou patologických stavů včetně onkogeneze, přičemž bylo zjištěno, že hladiny proteinu PDLIM2 korelují jak se vznikem, tak se supresí nádorů [3,4,6]. Tumor supresivní funkce tohoto proteinu byly dosud popsány v souvislosti s T buněčným lymfomem dospělých (ATL) [9–12], karcinomem kolorekta [4,13] či s nádory prsu [14,15].

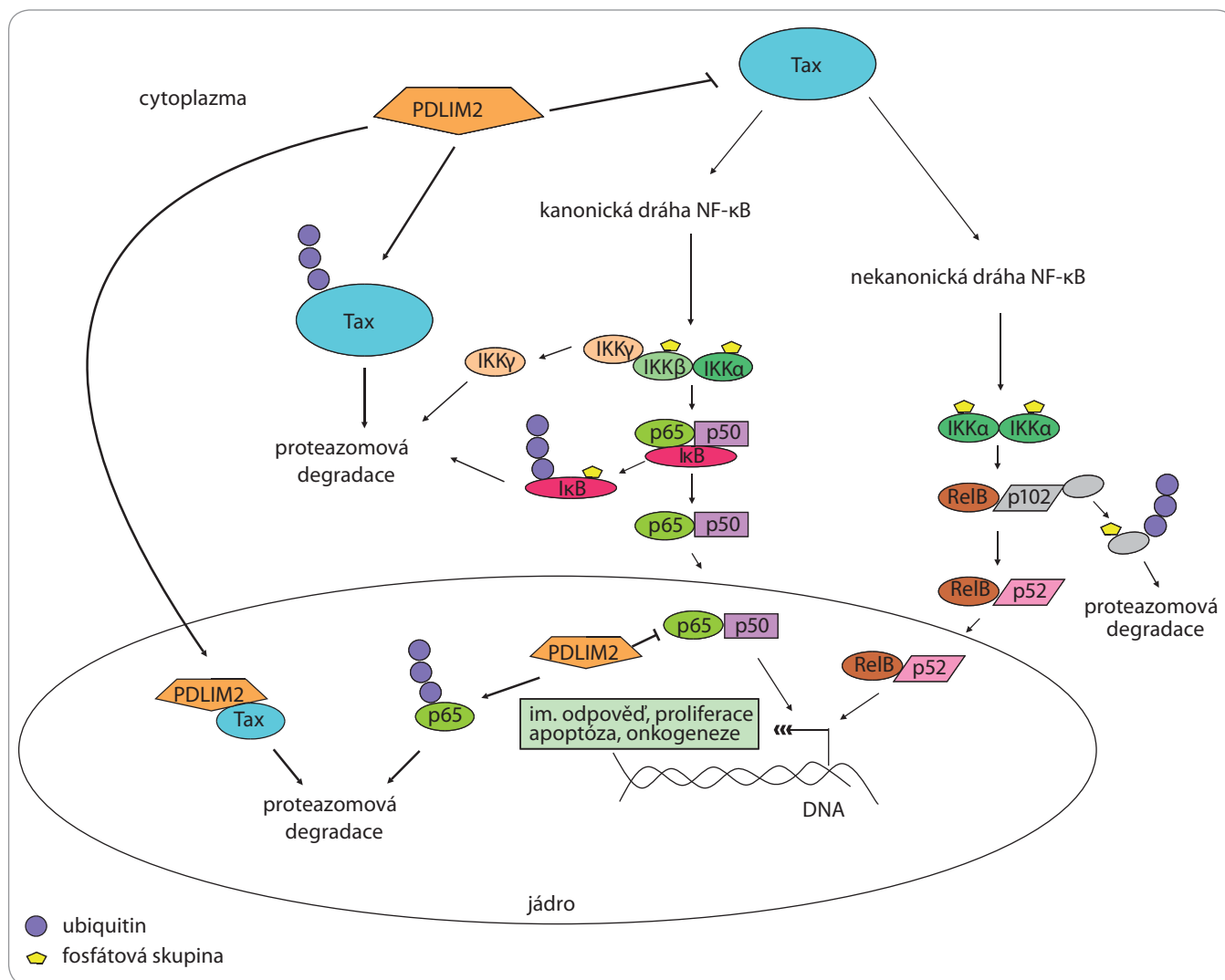
PDLIM2 a jeho tumor supresivní role v T buněčném lymfomu dospělých

T buněčný lymfom dospělých je vysoce agresivní T buněčná malignita vyvolaná infekcí T buněk onkogenním retrovirem HTLV-1 (lidský T lymfotropický virus 1) [9]. Detailní mechanismus vedoucí ke vzniku ATL není dosud zcela objasněn, je však zřejmé, že zásadní roli v tomto procesu hraje virový onkoprotein Tax [10]. Tento 40 kDa velký protein, jenž je zásadní pro virovou replikaci [11], vykazuje vlastnosti onkoproteinu, neboť je schopen deregulovat buněčné transkripční faktory regulující buněčný růst a dělení, a to především NF- κ B [12]. NF- κ B je pětičlenná rodina transkripčních faktorů vytvářejících homo- a heterodimery, které jsou zadržovány v cytoplazmě pomocí inhibičních proteinů κ B (I κ B) a tím udržovány v inaktivním stavu (regulovány) [16]. Do rodiny NF- κ B patří proteiny RELA, RELB, c-Rel, jež jsou syntetizovány ve funkční formě schopné aktivovat transkripci cílových genů a také proteiny NF- κ B1 a NF- κ B2, jež jsou syntetizovány jako prekurzory neschopné vazby na DNA a jsou aktivovány proteolytickým odštěpením C-koncové domény za vzniku zralých proteinů p50 a p52 [16]. Transkripční faktory NF- κ B mohou být aktivovány celou řadou stimulů, např. pro-zánětlivých cytokinů, a hrají zásadní roli v regulaci zánětlivé imunitní odpovědi, apoptóze, proliferaci a celé řadě dalších buněčných dějů [17]. Deregulace, resp. zvýšená aktivita těchto transkripčních faktorů je průvodním znakem řady chorob včetně tumorigeneze [18]. Existuje několik mechanismů vedoucích k aktivaci transkripčních faktorů NF- κ B, z nichž nejlépe popsán a také nejčastější jsou kanonická (klasická) a nekanonická dráha [16,17]. Kanonická dráha je obvykle spouštěna jako odpověď na virovou či mikrobiální infekci a expozici prozánětlivých cytokinů a zahrnuje především proteiny RELA, c-Rel a p50 [17]. Přítomnost prozánětlivých faktorů vede k aktivaci kinázy TAK1, která dále aktivuje I κ B kinázový komplex, ten fosforyluje I κ B, navozuje tak jejich ubiquitinaci a proteazomovou degradaci, čímž dochází k uvolnění a translokaci komplexu RELA – p50 do jádra a aktivaci transkripce cílových genů zapojených do re-



Obr. 1. Domény PDLIM2.

Protein PDLIM2 je členem ALP proteinové rodiny, zahrnující proteiny s N-terminální PDZ doménou a C-terminálně lokalizovanou LIM doménou [2]. PDZ doména zprostředkovává protein-proteinové interakce a představuje prvních 84 AK na N-konci PDLIM2 [3]. LIM doména je pak lokalizována mezi AK 284–344 PDLIM2 a mimo zprostředkování protein-proteinových interakcí vykazuje také E3 ubiquitin ligázovou aktivitu [4].



Obr. 2. PDLIM2 a jeho vztah k virovému onkoproteinu Tax a drahám NF-κB.

PDLIM2 funguje jako silný supresor virového onkoproteinu Tax [12]. Tento onkoprotein je schopen deregulovat buněčné transkripční faktory, především kanonickou a nekanonickou NF-κB dráhu [12], které hrají zásadní roli v regulaci celé řady dalších buněčných dějů včetně zánětlivé imunitní odpovědi, apoptózy [17] či onkogeneze [18]. PDLIM2 funguje jako supresor Tax a reguluje jeho funkce dvěma hlavními způsoby: v cytoplazmě funguje jako E3 ubiquitin ligáza proteinu Tax, navozující jeho poly-ubikvitinaci a proteazomovou degradaci [10], kromě toho však také přímo interaguje s Tax a transportuje jej z cytoplazmy do jádra, kde opět navozuje jeho degradaci [10]. V jádře funguje PDLIM2 také jako E3 ubiquitin ligáza proteinu p65, hlavního transkripčního faktoru kanonické NF-κB dráhy a navozuje tak jeho ubikvitinaci a proteazomovou degradaci [9].

gulace zánětlivé imunitní odpovědi, proliferace či migrace [17,18]. Nekanonická dráha je nejčastěji spouštěna různými ligandy TNF cytokinové rodiny (např. TNF-β) [17]. Tyto ligandy aktivují NF-κB indukovanou kinázu, jež následně spouští sled reakcí analogických s kanonickou dráhou, přičemž konečným produktem alternativní dráhy je aktivní heterodimer p52 – RELB, který aktivuje transkripci genů důležitých pro vývoj adaptivní imunitní odpovědi a regulaci apoptózy [17,18]. Onkoprotein Tax zpro-

středkovává aktivaci kanonické i nekanonické NF-κB dráhy, což hraje zásadní roli v maligní transformaci T buněk infikovaných HTLV-1 [19]. Zásadní jsou především geny aktivované nekanonickou dráhou [20], což potvrzují i studie provedené u jiných typů nádorů [21]. Bylo prokázáno, že protein PDLIM2 funguje jako silný supresor onkoproteinu Tax a tento supresivní efekt PDLIM2 vede k potlačení Tax indukované buněčné transformace a onkogeneze *in vitro* i *in vivo* [12]. PDLIM2 reguluje funkce proteinu Tax

dvěma způsoby – jednak funguje jako E3 ubikvitin ligáza proteinu Tax, navozuje tedy jeho poly-ubikvitinaci a následnou proteazomovou degradaci (obr. 2) [10], kromě toho však PDLIM2 také přímo interaguje s Tax a transportuje jej z cytoplazmy do nesolubilních jaderných kompartmentů, kde opět dochází k degradaci Tax (obr. 2) [10], což má za následek inhibici drah NF-κB a již zmínované potlačení buněčné transformace a onkogeneze [12]. PDLIM2 je také schopen přímo inhibovat kanonickou

NF- κ B dráhu, neboť jako E3 ubikvitin ligáza proteinu p65, hlavního transkripčního faktoru kanonické NF- κ B dráhy, navozuje jeho ubikvitinaci a proteazomovou degradaci (obr. 2) [9]. Studie nicméně odhalily, že protein PDLIM2 je u HTLV-1 transformovaných buněčných linií reprimován a výrazné snížení hladin PDLIM2 bylo také detekováno u primárních buněk pacientů s ATL ve srovnání s kontrolními zdravými buňkami [10]. Ukazuje se, že represe PDLIM2 je důležitý mechanismus HTLV-1 zprostředkované tumorigeneze [10]. Bylo prokázáno, že represe PDLIM2 souvisí se zvýšenou aktivitou DNA metyltransferáz (DNMT), konkrétně DNMT1 a DNMT3b, která vede k hypermetylaci promotorové oblasti genu *Mystique* a potlačení jeho transkripce [10]. Studie dále odhalují, že reaktivace hladin PDLIM2 pomocí hypometylačního agens 5-aza-2'-deoxycytidinu (5-aza-dC) je schopna navodit smrt HTLV-1 transformovaných T buněk [10]. 5-aza-dC účinkuje jako inhibitor DNA metyltransferáz a v roce 2006 byl schválen americkou FDA (Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu léčiv) pro léčbu myelodysplastického syndromu [22]. Schopnost 5-aza-dC v závislosti na dávce reaktivovat PDLIM2 a navodit smrt HTLV-1 transfekovaných T buněk naznačuje potenciální terapeutickou strategii pro ATL [10]. Je nutno říci, že 5-aza-dC reaktivuje i jiné geny, avšak samotná reaktivace PDLIM2 po transfekci specifickým plazmidem je schopna navodit smrt HTLV-1 transfekovaných T lymfocytů, což potvrzuje tumor supresivní roli PDLIM2 v onkogenezi ATL [12].

PDLIM2 a jeho tumor supresivní role v kolorektálním karcinomu

Jednou z hlavních predispozic pro vznik a vývoj kolorektálního karcinomu (colorectal cancer – CRC) jsou tzv. IBD (inflammatory bowel disease), tedy chronická zánětlivá onemocnění zahrnující např. Crohnovu chorobu či ulcerózní kolitidu [4]. Deregulace již zmínovaných transkripčních faktorů NF- κ B, jakož i transkripčních faktorů rodiny STAT, hraje zásadní roli při vývoji IBD a s nimi asociovaných nádorů [4,23]. Za fyziologických podmínek je aktivita NF- κ B i STAT velmi přísně regulována, přičemž

hlavním regulačním mechanismem je degradace těchto transkripčních faktorů zprostředkovaná proteinem PDLIM2 [4]. PDLIM2 funguje jako E3 ubikvitin ligáza proteinu p65 (obr. 2), nejvýznamnějšího a nejčastěji se vyskytujícího transkripčního faktoru rodiny NF- κ B, a také jako E3 ubikvitin ligáza proteinů STAT1, STAT3 či STAT4 [4,13,24]. PDLIM2 tedy navozuje ubikvitinaci a následnou degradaci těchto proteinů a reguluje tak jejich aktivitu [4,13,24]. Některé dosud provedené studie odhalily sníženou expresi PDLIM2 na úrovni mRNA i proteinu u nejrozličnějších buněčných linií odvozených od CRC (HCT 116, SNU-1040, DLD-1, SW-480, FET, HT-29) [4]. Bylo zjištěno, že u kolorektálních nádorových linií dochází k epigenetickému potlačení hladin PDLIM2 hypermetylací promotoru genu *Mystique*, jež je zprostředkována DNA metyltransferázami DNMT1 a DNMT3b [4], podobně jako je tomu v případě ATL [9–12]. Působení hypometylačního 5-aza-dC na CRC buněčné linie vede k reaktivaci PDLIM2 a je schopno indukovat smrt těchto buněk *in vitro* i *in vivo*, což naznačuje potenciální terapeutickou strategii pro CRC [4]. Nedávné studie ovšem odhalují, že k represí PDLIM2 dochází také na posttranskripční úrovni pomocí mikroRNA (miRNA), které se váží na 3' nepřekládanou oblast PDLIM2 mRNA a blokují tak její translaci [13]. Konkrétně jde o miR-221 a miR-222, přičemž bylo zjištěno, že hladiny těchto mikroRNA jsou u CRC zvýšeny ve srovnání s nenádorovou tkání [13]. Výsledky těchto studií podporují domněnky, že represe PDLIM2 je zásadní mechanismus napomáhající vzniku CRC a PDLIM2 je tedy důležitý supresor a potenciální terapeutický cíl v onkogenezi CRC [4].

PDLIM2 a jeho tumor supresivní role u nádorů prsu

Tumor supresivní role proteinu PDLIM2 byla popsána také u buněk odvozených od karcinomu prsu [14,15]. Bylo popsáno, že exprese PDLIM2 je epigeneticky reprimována u estrogen receptor (ER) pozitivních (MCF-7) i negativních (MDA-MB-231) buněčných linií nádorů prsu ve srovnání s nenádorovými liniemi MCF-10A (ER nega-

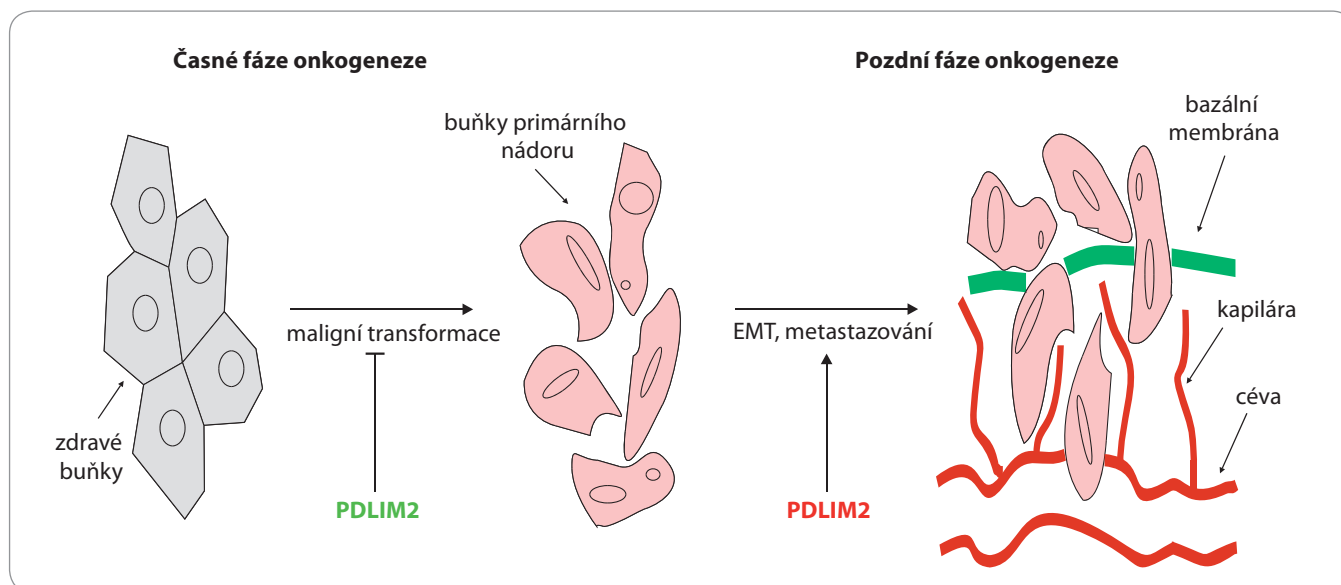
tivní) a HMT-3522 S1 (ER pozitivní) [14]. Suprese PDLIM2 souvisí s konstitutivní aktivitou NF- κ B [14], která hraje významnou roli v onkogenezi nádorů prsu [25]. Reaktivace hladin PDLIM2 pomocí 5-aza-dC vede, stejně jako v případě ATL či CRC, k inhibici NF- κ B a potlačení tumorigenicity MCF-7 a MDA-MB-231 *in vitro* i *in vivo* [14]. Jak již bylo uvedeno, 5-aza-dC je schopen reaktivovat řadu genů, avšak samotné zvýšení hladin PDLIM2 u buněk MCF-7 a MDA-MB-231 stabilně transfekovaných specifickým plazmidem bylo schopno potlačit jejich tumorigenní vlastnosti, což naznačuje potenciální využití PDLIM2 v terapii nádorů prsu [14]. V nedávné době bylo také zjištěno, že exprese genu *Mystique*, kódujícího protein PDLIM2, je řízena biologicky aktivní formou vitamínu D₃ [15]. Vitamin D₃ je pleiotropní hormon účinkující na řadu tkání a zprostředkovávající nejrozličnější biologické odpovědi, mimo jiné vykazuje i protinádorovou aktivitu [26]. Ukazuje se, že protinádorové vlastnosti vitamínu D₃ zprostředkovává protein PDLIM2 [15]. Vitamin D₃ je schopen přímo aktivovat transkripci genu *Mystique*, popřípadě potlačit hypermetylací promotoru tohoto genu a tím zvyšovat hladiny PDLIM2 v buňkách [15]. Schopnost vitamínu D₃ reaktivovat hladiny PDLIM2 a potlačit tak vlastnosti nádorových buněčných linií karcinomu prsu naznačují další z možných terapeutických strategií u tohoto typu nádorů [15].

PDLIM2 jako onkoprotein

Kromě studií striktně charakterizujících PDLIM2 jako nádorový supresor existují také studie považující PDLIM2 za onkoprotein, resp. protein s možnou duální funkcí v onkogenezi nádorů [3,6,7]. Jedná se o studie provedené u prostatických a prsních nádorových buněčných linií [3,6,7] a jejich závěry jsou podrobněji rozebrány níže.

PDLIM2 jako onkoprotein u nádorů prostaty

Navzdory tomu, že je represe PDLIM2 asociovaná s tumorigenezí a PDLIM2 je považován za potenciální nádorový supresor, byly u prostatických nádorových buněčných linií odvozených od metastazujících nádorů detekovány výrazně zvýšené



Obr. 3. Duální role PDLIM2 v onkogenezi.

V počátečních fázích onkogeneze je PDLIM2 schopen reprimovat maligní transformaci buněk a růst nádorů, v pozdějších fázích onkogeneze pak bylo prokázáno, že zvýšení hladin PDLIM2 je asociováno s epiteliálně mezenchymální tranzicí (EMT), progresí nádoru a tvorbou metastáz [7], což naznačuje duální roli PDLIM2 v onkogenezi nádorů.

hladiny tohoto proteinu ve srovnání s liniemi odvozenými od nádorů nemetastazujících [7]. Bylo také zjištěno, že hladiny PDLIM2 jsou výrazně vyšší u androgen nezávislých prostatických nádorových linií DU 145 a PC-3 ve srovnání s androgen závislými liniemi PPC-1 a Alva-31 [3]. Stabilní potlačení hladin PDLIM2 v buňkách DU 145 pak vedlo k výraznému snížení jejich migračních vlastností a také k zastavení a reverzi epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT) [7], tedy sledu molekulárních a buněčných dějů hrajících velmi významnou roli v progresi a metastazování nádorů [27]. Bylo publikováno, že potlačení hladin PDLIM2 nemá vliv na bazální aktivitu NF- κ B [7], což je ovšem v rozporu s výsledky studií považujících PDLIM2 za nádorový supresor, které deklarují ústřední roli PDLIM2 v regulaci aktivity NF- κ B [4,14]. Vyšlo najevo, že PDLIM2 je schopen aktivovat COP9 signalozom (CSN), evolučně konzervovaný proteinový komplex složený z osmi podjednotek (CSN1–8) [28]. Tento proteinový komplex reguluje ubikvitin konjugací dráhy a tím ovlivňuje degradaci buněčných proteinů (zvýšená degradace p53, SMAD4/7, p27^{Kip1}, stabilizace a aktivace c-myc, c-jun a dalších) a regulaci celé řady signálních drah a procesů včetně buněčného cyklu či tumorigeneze [29]. PDLIM2 přímo in-

teraguje a tím aktivuje funkčně nejvýznamnější podjednotku COP9 signalozomu, podjednotku 5 (CSN5) neboli Jab1 [7]. Zvýšené hladiny CSN5 a s tím související zvýšená aktivita COP9 jsou spojovány se vznikem a progresí různých typů nádorů, a regulace hladin CSN5 by tak mohla být potenciálním cílem v terapii nádorů [30]. Všechna tato uvedená zjištění naznačují pro-tumorigenní funkci PDLIM2 [3]. V souvislosti s již výše deklarovanou tumor supresivní funkcí PDLIM2 se však dá předpokládat, že vztah tohoto proteinu k onkogenezi nádorů je komplikovanější a PDLIM2 by mohl fungovat jako protein s duální funkcí (obr. 3) [7]. Zdá se, že v počátečních fázích tumorigeneze je represe PDLIM2 asociována s transformací buněk a růstem nádorů, v pozdějších fázích je však patrně PDLIM2 reaktivován a jeho přítomnost je asociována s EMT, progresí nádoru a tvorbou metastáz [7]. Reaktivace PDLIM2 je tedy pravděpodobně schopna potlačit tumorigenezi pouze v počátečním stadiu vzniku nádoru, v pozdějších fázích má ale efekt přesně opačný.

PDLIM2 jako onkoprotein ve vztahu k nádorům prsu

Již jsme se zmínili, že hladiny PDLIM2 jsou epigeneticky reprimovány u estrogen

receptor (ER) pozitivních (MCF-7) i negativních (MDA-MB-231) buněčných linií nádorů prsu ve srovnání s ER pozitivními i negativními nenádorovými liniemi MCF-10A a HMT-3522 S1 [14]. V určitém rozporu s tímto tvrzením jsou však výsledky deklarující výrazné zvýšení hladin PDLIM2 v nádorových buněčných liniích odvozených od metastatických nádorů, včetně MDA-MB-231, ve srovnání s liniemi odvozenými od nádorů nemetastatických [6]. Bylo zjištěno, že hladiny PDLIM2 u linie MDA-MB-231 (post EMT – bazální subtyp) jsou srovnatelné s hladinami detekovanými u MCF-10A a jsou výrazně vyšší ve srovnání s ER pozitivní linií MCF-7 (luminální subtyp), a zdá se tedy, že reflektují diferenciační status prsních nádorových buněk [6]. Stabilní suprese PDLIM2 v buňkách MDA-MB-231 i MCF-7 vedla, podobně jako u prostatických nádorových linií, k potlačení jejich migračních schopností, reverzi EMT a aktivaci COP9 signalozomu a opět neměla vliv na bazální aktivitu NF- κ B [3,6]. Výsledky těchto studií jsou nicméně znovu v určitém rozporu s výsledky studie Qu et al [14] a také Vanoirbeek [15], jež deklarují, že zvýšení (reaktivace) hladin PDLIM2 v buněčných liniích MCF-7 a MDA-MB-231 zprostředkovaná 5-aza-dC (event. vitamínem D₃)

potlačuje tumorigenicitu těchto linií, tedy i jejich migrační schopnosti, a inhibuje aktivitu NF- κ B [14,15]. Možným vysvětlením nesouladu ve výsledcích těchto studií by mohl být fakt, že jak 5-aza-dC, tak vitamin D₃ reaktivují i jiné geny než *Mystique* [12,14] a právě produkci těchto genů by event. mohly přispívat k potlačení tumorigenicity nádorových buněk či inhibici NF- κ B. Rozpory ve výsledcích dosud provedených studií u prsních nádorových buněk opět nahrávají hypotéze o duální funkci PDLIM2 v onkogenezi nádorů (obr. 3) [6,7]. U normálních epiteliálních buněk je PDLIM2 zřejmě důležitý pro udržení jejich fenotypu [6], což je v souladu s přítomností vysokých hladin tohoto proteinu v nenádorových epiteliálních prsních buňkách MCF-10A či HMT-3522 S1 [14]. Je pravděpodobné, že represe PDLIM2 v těchto buňkách vede k jejich maligní transformaci a následná reaktivace PDLIM2 v transformovaných buňkách pak aktivuje EMT, vede k progresi nádorů a přispívá k tvorbě metastáz (obr. 3). Zdá se také, že u buněk sekundárních nádorů (metastáz) dochází k opětovné represi PDLIM2, která aktivuje tzv. mezenchymálně epiteliální tranzici, tedy děj opačný k EMT, a indukuje proliferaci těchto buněk a růst metastáz [7].

Závěr

Na první pohled rozporuplné výsledky dosud provedených studií, považujících PDLIM2 někdy za nádorový supresor, jindy pak za potenciální onkoprotein, naznačují možnou duální funkci proteinu PDLIM2 v onkogenezi nádorů. V počátečních fázích vzniku nádorů působí pravděpodobně jako nádorový supresor, neboť je reprimován a reaktivace hladin PDLIM2 vede k inhibici maligní transformace buněk, v pozdějších fázích onkogeneze však zvýšení hladin PDLIM2 koreluje s progresí a metastazováním nádorů [6,7]. Prohloubení znalostí o funkci PDLIM2 v onkogenezi by tak mohlo vést k nalezení „windows of opportunity“, ve kterých by reaktivace PDLIM2 byla schopna potlačit tumorigenezi a navodit smrt nádorových buněk. Výsledky dosud publikovaných studií také naznačují možnou hormonální

regulaci hladin PDLIM2, resp. exprese genu *Mystique*. Již byl popsán přímý efekt vitaminu D₃, jenž se váže na vitamin D₃ rozpoznávající oblast promotoru genu *Mystique* a aktivuje tak jeho transkripci [15]. Jelikož byl rovněž popsán funkční antagonismus mezi jednotlivými hormonálními receptory [31], je možné, že aktivované androgenní či estrogeny receptory mohou určitým způsobem ovlivňovat (blokovat) expresi *Mystique*, a tedy i hladiny PDLIM2. Bylo totiž zjištěno, že androgen nezávislé prostatické nádorové linie a ER negativní prsní nádorové linie vykazují vyšší mRNA i proteinové hladiny PDLIM2 ve srovnání s androgen závislými či ER pozitivními liniemi [3,6]. Přímý efekt androgenů či estrogenů na expresi *Mystique* nebyl dosud prozkoumán, ačkoli by si více pozornosti jistě zasloužil. Hlubší studium zasluhuje také vztah mezi PDLIM2 a COP9 signalozomem, potažmo podjednotkou 5 (CSN5) tohoto proteinového komplexu. Ukazuje se totiž, že aktivace COP9, resp. CSN5 hraje důležitou roli v progresi různých typů nádorů a regulace této aktivity, např. prostřednictvím PDLIM2, by mohla být potenciálním cílem v terapii nádorů [30]. Detailnější popis vyžaduje jistě také vztah PDLIM2 k drahám NF- κ B, které hrají významnou roli při vzniku a progresi celé řady nádorů [18]. Lze tedy říci, že PDLIM2 je velmi zajímavý protein s komplexní, avšak dosud ne zcela objasněnou funkcí v onkogenezi nádorů, jehož represe v určitých fázích vzniku a vývoje nádorů by mohla být účinnou terapeutickou strategií např. u ATL, CRC či nádorů prsu.

Literatura

1. Healy NC, O'Connor R. Sequestration of PDLIM2 in the cytoplasm of monocytic/macrophage cells is associated with adhesion and increased nuclear activity of NF- κ B. *J Leukoc Biol* 2009; 85(3): 481–490. doi: 10.1189/jlb.0408238.
2. Torrado M, Senatorov VV, Trivedi R et al. Pdlim2, a novel PDZ-LIM domain protein, interacts with alpha-actinins and filamin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(11): 3955–3963.
3. Loughran G, Healy NC, Kiely PA et al. *Mystique* is a new insulin-like growth factor-I-regulated PDZ-LIM domain protein that promotes cell attachment and migration and suppresses Anchorage-independent growth. *Mol Biol Cell* 2005; 16(4): 1811–1822.
4. Qu Z, Yan P, Fu J et al. DNA methylation-dependent repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2 in colon cancer and its role as a potential therapeutic target. *Cancer Res* 2010; 70(5): 1766–1772. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3263.

5. te Velthuis AJ, Bagowski CP. PDZ and LIM domain-encoding genes: molecular interactions and their role in development. *Scientific World Journal* 2007; 7: 1470–1492.
6. Deevi RK, Cox OT, O'Connor R. Essential function for PDLIM2 in cell polarization in three-dimensional cultures by feedback regulation of the β 1-integrin-RhoA signaling axis. *Neoplasia* 2014; 16(5): 422–431. doi: 10.1016/j.neo.2014.04.006.
7. Bowe RA, Cox OT, Aylón V et al. PDLIM2 regulates transcription factor activity in epithelial-to-mesenchymal transition via the COP9 signalosome. *Mol Biol Cell* 2014; 25(1): 184–195. doi: 10.1091/mbc.E13-06-0306.
8. Macartney-Coxson DP, Hood KA, Shi HJ et al. Metastatic susceptibility locus, an 8p hot-spot for tumour progression disrupted in colorectal liver metastases: 13 candidate genes examined at the DNA, mRNA and protein level. *BMC Cancer* 2008; 8: 187. doi: 10.1186/1471-2407-8-187.
9. Zhao T, Yasunaga J, Satou Y et al. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. *Blood* 2009; 113(12): 2755–2764. doi: 10.1182/blood-2008-06-161729.
10. Yan P, Qu Z, Ishikawa C et al. Human T-cell leukemia virus type I-mediated repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2 involves DNA methylation but independent of the viral oncoprotein tax. *Neoplasia* 2009; 11(10): 1036–1041.
11. Fu J, Yan P, Li S et al. Molecular determinants of PDLIM2 in suppressing HTLV-I Tax-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 2010; 29(49): 6499–6507. doi: 10.1038/onc.2010.374.
12. Yan P, Fu J, Qu Z et al. PDLIM2 suppresses human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal degradation. *Blood* 2009; 113(18): 4370–4380. doi: 10.1182/blood-2008-10-185660.
13. Liu S, Sun X, Wang M et al. A microRNA 221- and 222-mediated feedback loop maintains constitutive activation of NF- κ B and STAT3 in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 2014; 147(4): 847–859. doi: 10.1053/j.gastro.2014.06.006.
14. Qu Z, Fu J, Yan P et al. Epigenetic repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2: implications for the biology and treatment of breast cancer. *J Biol Chem* 2010; 285(16): 11786–11792. doi: 10.1074/jbc.M109.086561.
15. Vanoirbeek E, Eelen G, Verlinden L et al. PDLIM2 expression is driven by vitamin D and is involved in the pro-adhesion, and anti-migration and -invasion activity of vitamin D. *Oncogene* 2014; 33(15): 1904–1911. doi: 10.1038/onc.2013.123.
16. Basak S, Kim H, Kearns JD et al. A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* 2007; 128(2): 369–381.
17. Hayden MS, Ghosh S et al. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008; 132(3): 344–362. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020.
18. Pikarsky E, Porat RM, Stein I et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; 431(7007): 461–466.
19. Yamaoka S, Inoue H, Sakurai M et al. Constitutive activation of NF-kappa B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *EMBO J* 1996; 15(4): 873–887.
20. Higuchi M, Tsubata C, Kondo R et al. Cooperation of NF-kappaB2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2-independent growth transformation. of a T-cell line. *J Virol* 2007; 81(21): 11900–11907.
21. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007; 12(2): 131–144.
22. Jabbour E, Issa JP, Garcia-Manero G et al. Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer* 2008; 112(11): 2341–2351. doi: 10.1002/cncr.23463.

23. Qu Z, Fu J, Ma H et al. PDLIM2 restricts Th1 and Th17 differentiation and prevents autoimmune disease. *Cell Biosci* 2012; 2(1): 23. doi: 10.1186/2045-3701-2-23.
24. Guo H, Mi Z, Bowles DE et al. Osteopontin and protein kinase C regulate PDLIM2 activation and STAT1 ubiquitination in LPS-treated murine macrophages. *J Biol Chem* 2010; 285(48): 37787–37796. doi: 10.1074/jbc.M110.161869.
25. Biswas DK, Shi Q, Baily S et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(27): 10137–10142.
26. Lopes N, Sousa B, Martins D et al. Alterations in vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer* 2010; 10: 483. doi: 10.1186/1471-2407-10-483.
27. Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *Int J Dev Biol* 2009; 53(8–10): 1541–1547. doi: 10.1387/ijdb.072410mn.
28. Lee MH, Zhao R, Phan L et al. Roles of COP9 signalosome in cancer. *Cell Cycle* 2011; 10(18): 3057–3066.
29. Adler AS, Littlepage LE, Lin M et al. CSN5 isopeptidase activity links COP9 signalosome activation to breast cancer progression. *Cancer Res* 2008; 68(2): 506–515. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3060.
30. Shackelford TJ, Claret FX. JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer. *Cell Div* 2010; 5(26). doi: 10.1186/1747-1028-5-26.
31. Lisse TS, Hewison M, Adams JS. Hormone response element binding proteins: novel regulators of vitamin D and estrogen signaling. *Steroids* 2011; 76(4): 331–339. doi: 10.1016/j.steroids.2011.01.002.

Profil aktivace receptorových tyrozinkináz a mitogenem aktivovaných proteinkináz v terapii Maffucciho syndromu

Profile of Activation of Tyrosine Kinases and MAP Kinases in Therapy of Maffucci Syndrome

Melichárková K.¹, Neradil J.^{2,3}, Múdry P.¹, Zitterbart K.^{1,3}, Obermannová R.^{3,5}, Skotáková J.⁴, Veselská R.^{1,2}, Štěrbá J.^{1,3}

¹ Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

² Laboratoř nádorové biologie, Ústav experimentální biologie, PřF MU, Brno

³ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴ Klinika dětské radiologie LF MU a FN Brno

⁵ Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Maffucciho syndrom je vzácné kongenitální nehereditární onemocnění charakterizované přítomností mnohočetných hemangiomů a enchondromů s tendencí k malignímu zvratu. Kauzální terapie neexistuje a léčba je zaměřena na řešení komplikací. Stanovení vhodného postupu je komplikované a často je nutná multioborová spolupráce v péči o tyto pacienty. **Případ:** Autoři prezentují případ 20leté pacientky s Maffucciho syndromem. V průběhu života se u ní objevily mnohočetné enchondromy i progredující hemangiomy, které postupem času působily řadu komplikací jako např. omezení hybnosti, poruchy růstu, bolesti, fluidothorax nebo ascites. Byl vyšetřen profil fosforylace vybraných tyrozinových kináz a MAP kináz z progredujících ložisek hemangiomů, což vedlo ke změně léčebné strategie reflektující výsledky vyšetření. Personalizovaná léčba nasazená na základě profilu fosforylace kináz vedla ke klinicky významné léčebné odpovědi trvající šest měsíců.

Klíčová slova

enchondromatóza – hemangiom – protein-tyrozinkinázy – MAP kinázový signální systém – individualizovaná medicína – Maffucciho syndrom

Summary

Background: Maffucci syndrome is a rare congenital non-hereditary disease characterized by multiple hemangiomas and enchondromas, which may progress into malignancy. The causal therapy does not exist, and therapy is aimed at complications. The determination of appropriate therapy is complicated, and a multidisciplinary approach is often essential. **Case:** Authors are presenting the case of a 20-year-old patient with Maffucci syndrome. During her life, multiple enchondromas and progressing hemangiomas have been revealed and they have caused many complications, such as limited movement, growth failure, pain, fluidothorax and ascites. A profile of phosphorylation of selected tyrosine kinases and MAP kinases from progressing hemangioma was performed and with consideration of the result, it led to change of treatment strategy with encouraging clinical response lasting for six months.

Key words

enchondromatosis – hemangioma – receptor protein-tyrosine kinases – MAP kinases signaling system – individualized medicine – Maffucci syndrome

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101, projektem CEB, OPVK CZ.1.07/2.3.00/20.0183 a projektem MUNI/A/1552/2014.

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101, by the project CEB, OPVK CZ.1.07/2.3.00/20.0183 and by the project MUNI/A/1552/2014.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Kristýna Melichárková

Klinika dětské onkologie

LF MU a FN Brno

Černopolní 9

613 00 Brno

e-mail:

kristyna.melicharkova@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 18. 4. 2015

Přijato/Accepted: 26. 6. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152547>

Úvod

Maffucciho syndrom je vzácné kongenitální nehereditární onemocnění, které patří spolu s Ollierovou chorobou mezi enchondromatózy. Toto onemocnění je charakterizováno přítomností četných hemangiomů a enchondromů, které mají tendenci k malignímu zvratu až u 40 % pacientů [1]. Standardní léčebná doporučení, která by ovlivňovala přirozený průběh vzniku a progresu mnohočetných enchondromů a hemangiomů, nejsou k dispozici a doporučuje se jen symptomatická a podpůrná léčba [2,3].

Případ

Dvacetiletá mladá žena byla sledována již od kojeneckého věku pro přítomnost mnohočetných enchondromů na končetinách, genua vara a poruchu kostního růstu s těžkou růstovou retardací. Její stav vyžadoval opakované korekční ortopedické výkony. Ve dvou letech věku

se u ní objevil myelodysplastický syndrom, který se následně rozvinul do RAEB (refractory anemia with excess blasts) s nutností terapie dle protokolu pro akutní myeloidní leukemii zahrnující i alogenní transplantaci kostní dřeně.

Ve věku šesti let se u ní začaly objevovat postupně progredující hemangiomy na rukou (obr. 1), proto bylo při podezření na Maffucciho syndrom provedeno celkové přešetření. Výsledky potvrdily přítomnost chondromu/enchondromu pravé sfenoidální kosti o velikosti $3,4 \times 2,5 \times 1,7$ cm. V rámci základní nemoci docházelo k postupné progresi histologicky vřetenobuněčných hemangiomů na pažích a vzniku nových lézí na nohou i v parenchymových orgánech, proto bylo tři roky po transplantaci kostní dřeně doporučeno zahájit léčbu níže dávkovanou chemoterapií. Byla zvolena terapie vincristin $1,5 \text{ mg/m}^2/\text{týden}$ + cyklofosamid

$300 \text{ mg/m}^2/\text{à 3 týdny}$, avšak vzhledem ke špatné toleranci již vysoce předlžené pacientky bylo nutné tuto léčbu po šesti měsících přerušit.

Stav se postupně dále zhoršoval, objevilo se nové ložisko hemangiomu na játrech $4,8 \times 3,8 \text{ cm}$ a další ložiska na hrudníku a horních končetinách. Proběhl pokus o ovlivnění těchto ložisek kortikoterapií, a to metylprednisolonem $30 \text{ mg/kg/den D1, D3 a D5, } 20 \text{ mg/kg/den D6}$ a v dávce 10 mg/kg/den D7 a dále navázáno prednizonem $4 \text{ mg/kg/den po 2 týdny}$ [4]. Výsledkem této terapie byla v nejlepším případě smíšená odpověď. V průběhu léčby proběhly pokusy o ovlivnění ložisek zářením, laserem i chirurgickými korekcemi.

Od 18 let se pacientka potýkala s opakovaným chylózním fluidothoraxem a přítomností chylózní ascitické tekutiny v důsledku aktivity hemangiomů. Tento stav vyžadoval opakované punkce



Obr. 1. Fotografie levé ruky (zdroj: archiv KDO) a RTG snímek levé ruky (zdroj: archiv KDR).

ascitu, v průměru 2 l ascitické tekutiny každé dva týdny. Byl nasazen bevacizumab 10 mg/kg/à 2 týdny, po osmi měsících terapie bylo dosaženo pouze stacionárního stavu s pokračující potřebou punkcí ascitu i fluidothoraxu. V této době byla změněna léčba na sirolimus 1 mg/den a paclitaxel 12,5 mg/m²/à 1 týden [5]. Tato terapie byla podávána šest měsíců s nutností redukce paclitaxelu na 50 % dávky pro hematologickou toxicitu. Výsledek byl pouze stacionární stav.

Nově byl vyšetřen profil fosforylace receptorových tyrozinkináz (RTK) a MAP kináz (mitogen-activated protein kinases) z ložiska na patě a dle těchto výsledků byla terapie upravena na sunitinib 12,5 mg/den a taxol 5,5 mg/týden. Mimo těchto léků měla dívka v dlouhodobé medikaci také β -blokátory z kardiologické indikace, u nichž některé práce poukazují na jejich anti-neoplastický potenciál [6]. Po nasazení této personalizované terapie došlo postupně k prodlužování intervalů pro evakuace ascitu či chylothoraxu, s periodou čtyř měsíců bez potřeby evakuace, což mělo významný dopad na kvalitu života pacientky. Po čtyřech měsících od poslední evakuace ascitu se i přes nasazenou léčbu obnovila potřeba evakuace chylothoraxu s potřebou opakovaných chirurgických intervencí a tedy i s přerušováním, až vysazením antineoplastické medikace na dobu téměř tří měsíců. V průběhu významně redukované či vysazené antineoplastické léčby progredovala potřeba chirurgické derivace chylu charakteru jahodového mléka. Pacientka zemřela náhlou smrtí na akutní krvácení do dutiny břišní v důsledku spontánní ruptury jaterního hemangioendotheliomu tři měsíce po deeskalaci antineoplastické terapie, devět měsíců po zahájení personalizované terapie.

Metodika a výsledky

Pro detekci fosforylace RTK byl použit Human Phospho-RTK Array Kit (R&D Systems) umožňující současné stanovení fosforylace 49 kináz z 16 receptorových rodin, přičemž u člověka bylo zatím popsáno 58 RTK rozdělených do 20 rodin v závislosti na podobnosti proteinové struktury receptorů [7]. Princip metody

detekce spočívá v nanesení proteiny lyzátu na nitrocelulózovou membránu, na níž jsou ve dvojicích bodů imobilizovány specifické protilátky proti dané kináze. Fosforylované i nefosforylované formy proteinu se na protilátku naváží v ekvimolárním poměru a v následujícím kroku jsou pouze fosforylované formy proteinu označeny protilátkou proti fosforylovanému tyrozinu konjugovanou s peroxidázou. Po aplikaci chemiluminiscenčního substrátu na membránu lze luminiscenci detekovat na filmu nebo pomocí chemiluminiscenčního skeneru.

Fosforylační status MAP kináz a vybraných serin/treoninových kináz a dalších signálních molekul byl analyzován pomocí Human Phospho-MAPK Array Kit (R&D Systems) umožňující současné stanovení fosforylace 26 kináz včetně zástupců tří hlavních rodin (ERK, JNK a p38). Princip metody je podobný jako v předchozím v případě, s tou výjimkou, že pro odlišení fosforylovaných a nefosforylovaných forem kináz je použito specifických protilátek přímo proti fosforylovaným formám kináz konjugovaných s biotinem. Na biotin se následně naváže streptavidin konjugovaný s peroxidázou, jež aktivuje chemiluminiscenční substrát.

Zmražený vzorek tkáně byl rozdělen na dvě části a lyzáty pro obě analýzy byly připraveny dle pokynů výrobce, následně bylo použito 300 μ g celkového proteinu pro každou z analýz. Míra fosforylace jednotlivých proteinů byla densitometricky kvantifikována softwarem ImageJ, z duplikátů byl vypočítán průměr a od něj odečtena hodnota pozadí. Data byla normalizována vztahem k maximální hodnotě dosažené na každé z použitých membrán.

Fosforylace RTK byla výrazná především u receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), inzulinového receptoru (InsR) a obou variant receptoru pro růstový faktor krevních destiček (platelet derived growth factor – PDGFR α a PRGFR β) (graf 1A, C).

V rámci analýzy fosforylace MAP kináz byla zaznamenána vysoká míra fosforylace ERK1 a ERK2 a částečně i kinázy p38 γ . Dále byla aktivována kináza Akt-2, jež patří do rodiny nejvýznamnějších

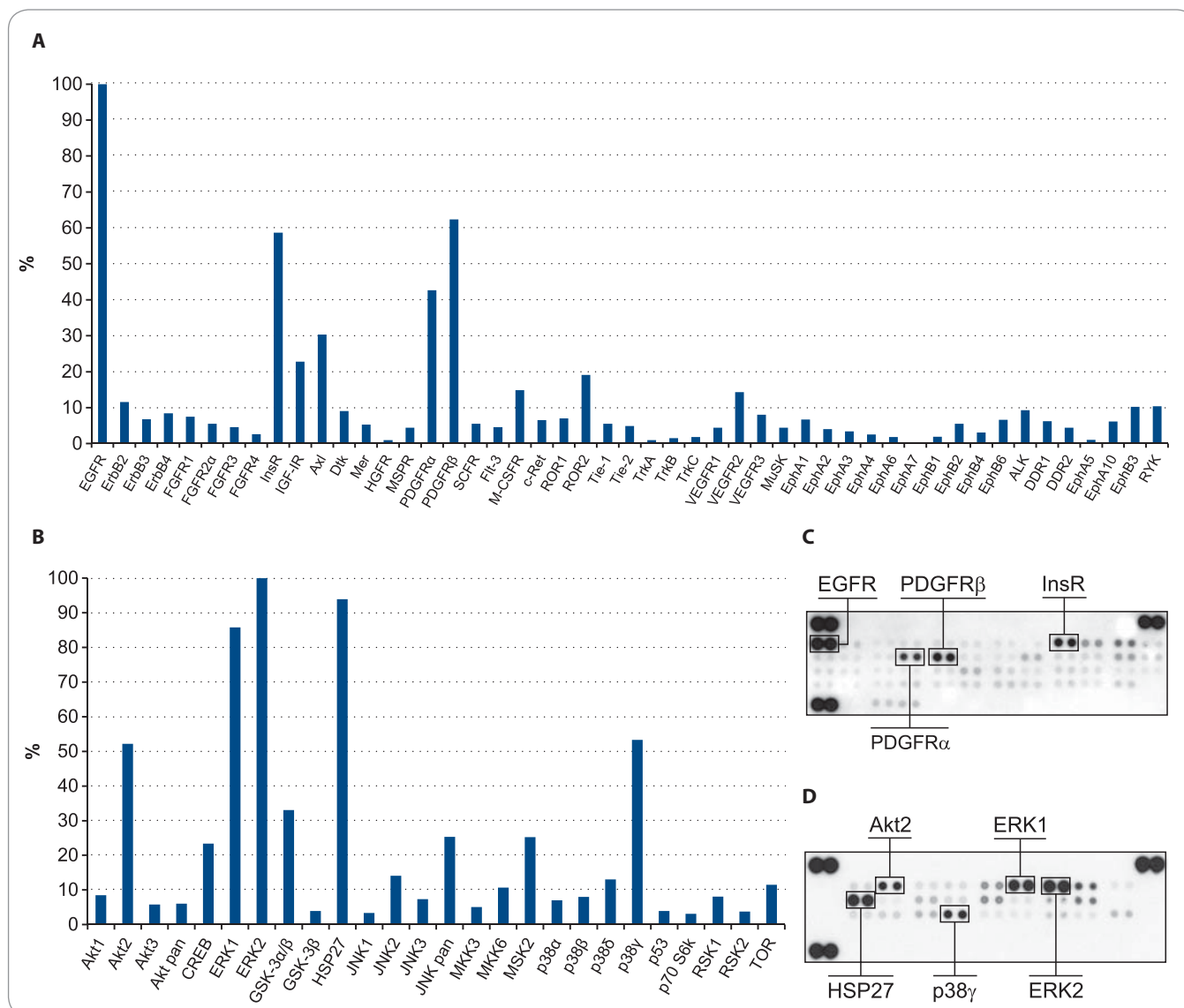
signálních molekul serin/treoninových kináz Akt. Jedním z nejvíce fosforylovaných proteinů, jenž může být fosforylačním cílem v případě aktivace kináz rodiny p38 [8], byl HSP27 (graf 1B, D).

Diskuze

Maffucciho syndrom patří mezi velmi vzácná onemocnění a manifestuje se v 78 % před začátkem puberty [9]. Je charakterizován přítomností enchondromů, mnohočetných hemangiomů a vzácně také lymfangiomů. Standardní terapie neexistuje a výběr vhodné strategie může být velmi svízelný. Enchondromy vznikají nejčastěji v oblasti dlouhých kostí dolních končetin, nohy a ruky [9]. V případě, že omezují funkčnost končetiny, ovlivňují normální růst nebo působí bolest, je přistoupeno k chirurgickému řešení. Hemangiomy jsou benigní cévní tumory, které mohou vznikat prakticky kdekoli v těle, v rámci tohoto onemocnění mohou postupně progredovat a výrazně omezovat kvalitu života postiženého jedince. V literatuře jsou popsány případy, u nichž bylo úspěšně využito antiangiogenní terapie k ovlivnění hemangiomů u těchto pacientů [5].

V případě této pacientky bylo těžké vybrat vhodnou léčebnou strategii, mimo jiné především z důvodu komorbidit a rozsahu jejího onemocnění. Bylo vyzkoušeno několik, dříve v literatuře popsaných, léčebných modalit, avšak výsledky léčby byly dosti nepřesvědčivé. V rámci snahy nalézt vhodný terapeutický cíl na úrovni proteinů, který by odrážel skutečnou aktivitu v patologických buňkách, byl vyšetřen profil fosforylace RTK a navazujících signálních drah. Tato diagnostická metoda se jeví jako slibný prostředek, který by mohl umožnit podávání cílené biologické léčby pacientům s prokázanou aktivací signální dráhy na úrovni proteinů. Tento postup by v konečném důsledku mohl zlepšit výsledky léčby, snížit množství komplikací a celkově snížit náklady na léčbu vlastního onemocnění, které mohou být při empirickém podávání takovýchto léků dosti vysoké.

Na základě výsledků naší analýzy byl do léčebného schématu přidán sunitinib v kombinaci s paclitaxelem. Sunitinib je multikinázový inhibitor, který cílí pře-



Graf 1. Profil fosforylace receptorových tyrozinkináz (RTK), MAP kináz a vybraných cytoplazmatických proteinů ve vzorku heman-giomu odebraného pacientce s Maffucciho syndromem.

A. Denzitometrická analýza fosforylace RTK. B. Denzitometrická analýza fosforylace MAPK a vybraných cytoplazmatických proteinů. C. Proteinová array s označenými RTK, jež vykazují nejvyšší hodnotu hustoty. D. Proteinová array s označenými MAPK a vybranými cytoplazmatickými proteiny, jež vykazují nejvyšší hodnotu hustoty.

devším proti receptoru pro růstový faktor krevních destiček (PDGFR) a proti receptoru pro cévní endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor – VEGFR), čímž ovlivňuje angiogenezi a buněčnou proliferaci. FDA (Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu léčiv) jej oficiálně schválila k léčbě GIST, renálního karcinomu a neuroendokrinních tumorů pankreatu, avšak pro silný antiangiogenní potenciál byl výhodný i pro naše účely. Paclitaxel je alkaloid, který blokuje depolymerizaci mikrotubulů dělicího vře-

ténka a je používán pro léčbu řady malignit. Při metronomickém dávkování a v kombinaci s dalšími léky prokázal významný antiangiogenní potenciál [10]. Prezentovaná kazuistika dokumentuje obtížnost péče o pacienty s Maffucciho syndromem, kdy interpretace klinického průběhu posledních týdnů a vysvětlení úmrtí pacientky zůstává spekulativní.

Závěr

Terapie vzácných onemocnění je ne-nesnadná. Neexistují ověřené postupy a vět-

šina poznatků o takových stavech je známa pouze z kazuistik. Velké randomi-zované klinické studie fáze III zde nikdy nebudou k dispozici, přestože je systém registrací a úhrad zdravotních pojiš-ťoven vyžaduje i v těchto případech. Vyšetření signálních drah aktivovaných RTK by mohlo do budoucna přispět k sestavování individualizované léčby tam, kde standardní léčba není známa anebo není dostatečně účinná, jako jsou vzácná, refrakterní nebo některá pokro-čilá nádorová onemocnění dětského

věku. Vytváření a následná realizace personalizovaných léčebných postupů vyžadují komplexní, multioborovou spolupráci a pečlivé vyvažování rizik a event. přínosů takových postupů.

Literatura

1. Verdegaal SH, Bovee JV, Pansuriya TC et al. Incidence, predictive factors, and prognosis of chondrosarcoma in patients with Ollier disease and Maffucci syndrome: an international multicenter study of 161 patients. *Oncologist* 2011; 16(12): 1771–1779. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0200.
2. Lissa F, Argente J, Antunes G et al. Maffucci syndrome and soft tissue sarcoma: a case report. *Int Semin Surg Oncol* 2009; 6(1): 2. doi: 10.1186/1477-7800-6-2.
3. Lin PP, Moussallem CD, Deavers MT. Secondary chondrosarcoma. *J Am Acad Orthop Surg* 2010; 18(10): 608–615.
4. Park EA, Seo JW, Lee SW et al. Infantile hemangioendothelioma treated with high dose methylprednisolone pulse therapy. *J Korean Med Sci* 2001; 16(1): 127–129.
5. Riou S, Morelon E, Guibaud L et al. Efficacy of rapamycin for refractory hemangioendotheliomas in Maffucci's syndrome. *J Clin Oncol* 2012; 30(23): e213–e215. doi: 10.1200/JCO.2012.41.7287.
6. Pasquier E, Street J, Pouchy C et al. β -blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Br J Cancer* 2013; 108(12): 2485–2494. doi: 10.1038/bjc.2013.205.
7. Lewis RJ, Ketcham AS. Maffucci's syndrome: functional and neoplastic significance. Case report and review of the literature. *J Bone Joint Surg Am* 1973; 55(7): 1465–1479.
8. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010; 141(7): 1117–1134.
9. Dorion S, Landry J. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stress Chaperones* 2002; 7(2): 200–206.
10. Pasquier E, Tuset MP, Street J et al. Concentration- and schedule-dependent effects of chemotherapy on the angiogenic potential and drug sensitivity of vascular endothelial cells. *Angiogenesis* 2013; 16(2): 373–386. doi: 10.1007/s10456-012-9321-x.

Rekombinantní protilátky a jejich využití v protinádorové terapii

Recombinant Antibodies and Their Employment in Cancer Therapy

Růčková E., Müller P., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Vývoj rekombinantních terapeutických protilátek je v poslední době jednou z nejrychleji se rozvíjejících disciplín aplikovaného biomedicínského výzkumu. Rekombinantní monoklonální protilátky nalézají stále větší uplatnění v biologické terapii řady závažných lidských chorob a jsou v současné době nenahraditelnou součástí komplexní protinádorové terapie. Terapeutické protilátky využívané v klinické praxi prošly značným vývojem. Z prvních protilátek produkovaných v myších, které jako vedlejší účinek indukovaly silnou imunitní odpověď, byly metodami rekombinantní DNA a genové manipulace vyvinuty plně lidské protilátky s výrazně omezenými vedlejšími účinky a zároveň se zvýšenou specifitou a efektivitou. V této práci jsou shrnuty základní poznatky o terapeutických monoklonálních protilátkách, jejich historický vývoj a přehled metodických přístupů vedoucích k vývoji účinnějších, ale také bezpečnějších protilátek.

Klíčová slova

protinádorová léčiva – imunoglobuliny – humanizované monoklonální protilátky – terapeutické protilátky – rekombinantní protilátky

Summary

Development of recombinant therapeutic antibodies is recently one of the fastest growing disciplines of applied biomedical research. Recombinant monoclonal antibodies are increasingly applied in biological therapy of many serious human diseases and are currently an irreplaceable part of a comprehensive cancer therapy. First mouse therapeutic antibodies had only limited applicability due to the strong immune response; however, technological advances enabled engineering of antibodies with increased specificity and efficacy, and on the other hand with reduced adverse effects due to lower antigenicity. This review provides a summary of knowledge about recombinant therapeutic antibodies, their mechanism of action and approaches how to improve their efficacy.

Key words

antineoplastic agents – immunoglobulins – humanized monoclonal antibodies – therapeutic antibodies – recombinant antibodies

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projektem MŠMT – NPU I – LO1413 a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), MEYS – NPS I – LO1413 and MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: vojtesek@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 20. 4. 2015
Přijato/Accepted: 26. 6. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152552>

Úvod

O využití monoklonálních protilátek k léčbě nádorových onemocnění se začalo uvažovat teprve nedávno, přesto patří v dnešní době mezi úspěšné strategie léčby onkologických onemocnění (hematologických malignit i solidních nádorů). Mechanismus jejich působení je založen na specifické vazbě na povrchové antigeny nádorových buněk. Byla popsána řada molekul, které jsou u nádorových buněk mutované nebo nadměrně či aberantně exprimovány a následně byly identifikovány jako potenciální cíle terapeutických protilátek. Tyto antigeny se dělí na antigeny speci-

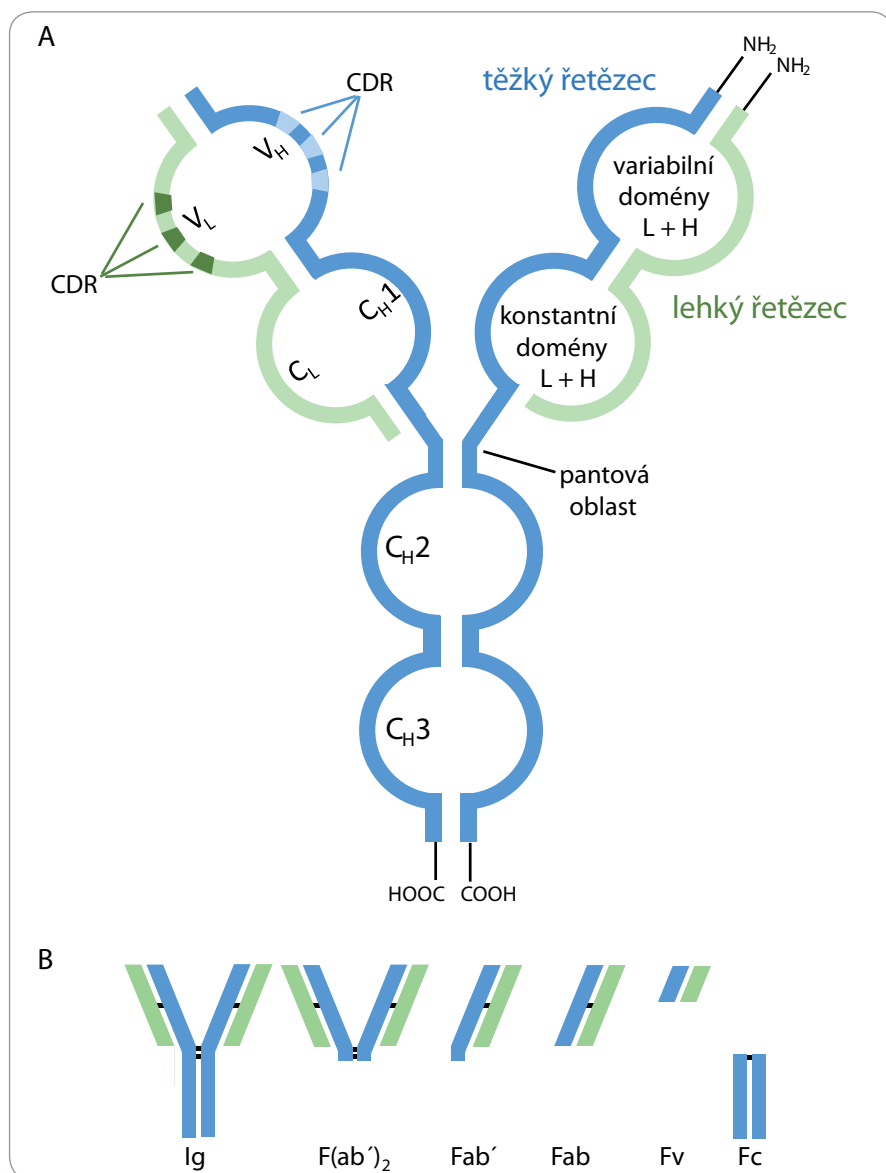
fické pro nádory (tumor specific antigen) a antigeny asociované s nádory (tumor associated antigen). Nejčastějšími cílovými molekulami terapeutických protilátek jsou CD (cluster of differentiation) antigeny (např. CD20, CD30 a CD52), receptory růstových faktorů (např. HER2/neu, EGFR, MET), růstové faktory (např. VEGF), adhezivní molekuly (např. EpCAM a alfa4-integrin) nebo imunomodulační receptory (CTLA-4 a PD-1). Mezi způsoby, jak terapeutickými protilátkami ovlivnit nádorovou buňku, patří inhibice funkce antigenu (např. receptoru), přivedení specifické toxické látky konjugované s protilátkou (např. cy-

tostatika, radioizotopu) nebo aktivace imunitního systému [1].

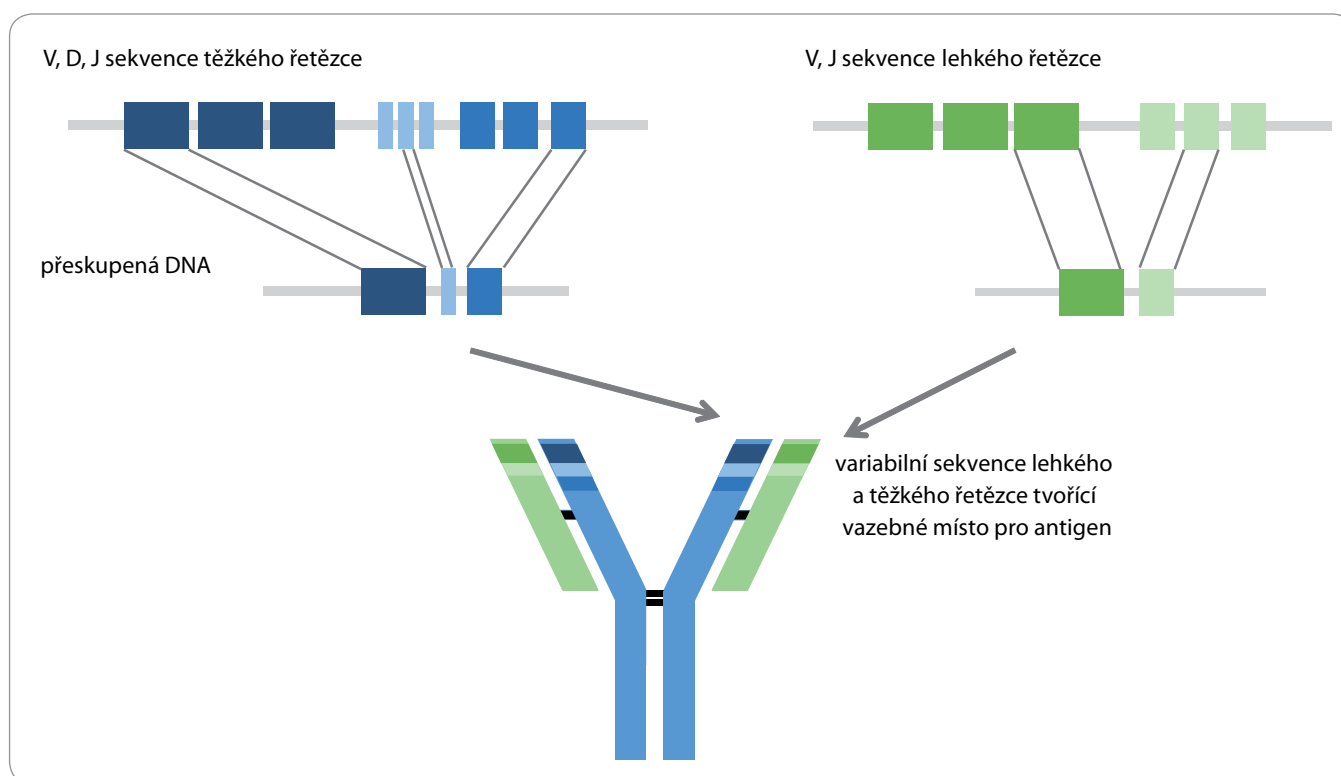
Protilátky – struktura a funkce

Protilátky, imunoglobuliny (Ig), jsou molekuly produkované B lymfocyty, které mohou v organizmu volně cirkulovat v rozpustné formě nebo mohou být vázány na cytoplazmatickou membránu B lymfocytů jako součást B buněčného receptoru (B cell receptor – BCR). U savců jsou imunoglobuliny podle vlastností těžkých řetězců rozděleny do pěti izotypových tříd, a to IgM, IgD, IgA, IgE, IgG. Jednotlivé třídy izotypů mají odlišné funkce a jsou produkovány v různých fázích imunitní odpovědi. Primární imunitní odpověď je zprostředkována sekretovanými protilátkami IgM tvořícími multivalentní molekulu pěti nebo šesti protilátek, které aktivací komplementu napomáhají fagocytóze. IgD jsou exprimovány na naivních B buňkách. Sekretované IgA tvoří dimer a nachází se ve slinách, slzách, kolostru a mateřském mléce. IgE se nachází zejména v plicích a kůži a hrají důležitou roli při hypersenzitivních a alergických reakcích. IgG jsou nejhojnějším izotypem protilátek v lidském těle a účastní se sekundární fáze imunitní odpovědi. Lidské IgG se dále dělí na čtyři podtřídy, IgG1–IgG4, lišící se množstvím v séru a vazebnou afinitou k Fc (fragment crystallizable) receptorům na buňkách imunitního systému [2]. Protilátky izotypu IgG mají nejdelší biologický poločas (přibližně 21 dnů), protože se váží na receptor FcRn (neonatal Fc receptor), který se nachází v endozomech a podílí se na recyklaci imunoglobulinů pohlcených pinocytózou. Proto je tato třída imunoglobulinů nejčastěji využívána k produkci terapeutických protilátek [3].

Molekuly imunoglobulinů jsou složeny ze dvou těžkých (H) a dvou lehkých (L) polypeptidových řetězců kovalentně spojených disulfidickými můstky do charakteristické struktury ve tvaru písmene Y (obr. 1A). Těžké řetězce se skládají ze čtyř až pěti a lehké řetězce ze dvou strukturálně podobných imunoglobulinových domén. Domény na N-konci těžkých i lehkých řetězců se označují jako variabilní (V_H , V_L), přičemž každá doména obsahuje tři hypervariabilní oblasti CDR



Obr. 1A. Schematické znázornění struktury molekuly imunoglobulinu.
B. Fragменты проtilátek vytvořené proteolytickým štěpením.



Obr. 2. Schematické znázornění VDJ přesmyku genomové DNA těžkého (H) a lehkého (L) řetězce imunoglobulinu.

Znázorněny jsou také oblasti molekuly imunoglobulinu, které odpovídají přeskupeným řetězcům.

(complementarity determining region) tvoří jedinečnou prostorovou strukturu, do které se specificky váže antigen. Variabilní oblasti jednotlivých klonů B lymfocytů jsou unikátní. Zbývající domény jsou v rámci daného typu těžkých i lehkých řetězců identické a označují se jako konstantní (C_H1 – C_H4 , C_L) [2].

Proteolytickým štěpením imunoglobulinů je možné získat specifické **fragmenty** (obr. 1B). Pomocí papainu vznikají dva identické Fab fragmenty (fragment antigen binding), které jsou monovalentní a každý obsahuje jedno vazebné místo pro antigen, a jeden Fc fragment, který je tvořen konstantními oblastmi těžkých řetězců. Fab jsou tvořeny doménami V_H , C_H1 , V_L a C_L , které jsou spojeny intramolekulární disulfidickou vazbou. Štěpení pepsinem, jehož rozpoznávací místo se nachází za pantovou oblastí, vede ke vzniku bivalentního fragmentu $F(ab')_2$, který navíc obsahuje krátký úsek Fc fragmentu. Redukcí disulfidových můstků vznikají Fab' fragmenty obsahující volnou sulfhydrylovou skupinu, která může být využita ke konjugaci enzymu, toxinu nebo jiného spe-

cifického proteinu. Fv fragmenty (fragment variable) jsou nejmenší fragmenty obsahující kompletní vazebné místo pro antigen a jsou tvořeny pouze doménami V_H a V_L , které jsou drženy nekovalentními interakcemi. Fragmenty protilátek nachází díky své menší velikosti využití v určitých imunochemických technikách a experimentálních aplikacích, kdy např. protilátky účinněji pronikají do preparátu při imunohistochemickém barvení, jsou minimalizována sterická omezení pro vazbu epitopu a dále absence Fc fragmentu omezuje nespecifické interakce a snižuje imunogenicitu protilátek při *in vivo* experimentech [4].

Genetika protilátek

Široké spektrum protilátek schopných rozlišit jakýkoli potenciální antigen není kódováno přímo v zárodečné linii, této diverzity je dosaženo procesem somatické **VDJ rekombinace** během vývoje lymfocytů. Geny kódující řetězce imunoglobulinů jsou složeny z několika skupin sekvencně příbuzných segmentů, v lidském lokusu pro těžké řetězce se nachází přibližně 50 V (variability) segmentů,

27 D (diversity) segmentů, 6 J (joining) segmentů a geny pro konstantní části těžkého řetězce. Struktura genových komplexů kódujících lehké řetězce κ a λ je podobná, ale obsahuje menší počet V a J segmentů a D segmenty chybí úplně (obr. 2). V progenitorech B lymfocytů (proB) dochází k D-J přeskupení, při němž je vyštěpen úsek mezi náhodnými D a J segmenty. Následně je vyštěpen úsek mezi některým z V segmentů a DJ segmentem vzniklým v předchozím kroku (V-D přeskupení). Pokud je přeskupením vytvořen produkt, ze kterého je syntetizován funkční H polypeptid, je další přeskupování na druhém chromozomu zastaveno (jedná se o alelickou exkluzi) a z buňky se stává pre-B lymfocyt. Tato událost dává buňce signál k zahájení přeskupování genů pro lehké řetězce, nejprve řetězců κ a v případě neúspěchu dochází k přeskupování řetězců λ . Po vytvoření povrchového IgM se buňka stává nezralým B lymfocytem a po současné expresi IgM a IgD zralým B lymfocytem. Již kombinací VDJ segmentů vzniká značná diverzita, která je znásobena nepřesnostmi ve spojo-

vání jednotlivých segmentů (tzv. spojovací variabilita) a působením enzymu terminální transferázy, jež prodlužuje konce přeskupených segmentů o krátké náhodné N-sekvence. V-D a D-J spojení odpovídá hypervariabilní oblasti CDR3, která vykazuje nejvyšší diverzitu v rámci spektra protilátek. Po styku zralého B lymfocyty s antigenem dochází k mutacím V segmentů, které dále zvyšují variabilitu imunoglobulinů. Všechny procesy vedoucí ke vzniku imunoglobulinů jsou důsledně kontrolovány a B lymfocyty produkující nefunkční, nestabilní nebo autoreaktivní protilátky jsou odstraněny.

Během terminální diferenciacie B lymfocyty po aktivaci antigenem dochází k další rekombinační události, **izotypovému přesmyku** (class switching), při kterém jsou vyštěpovány konstantní úseky těžkých řetězců. Izotypové přesmyky mohou v dané buňce probíhat několikrát za sebou, dokud jsou přítomny sekvence, které lze eliminovat. Typ přesmyku a výsledný izotyp protilátky, který bude buňka produkovat, je regulován cytokiny [2].

Monoklonální terapeutické protilátky – historický vývoj

Monoklonální protilátky jsou získávány hybridomovou technologií, kdy jsou fúzovány B lymfocyty izolované ze sleziny imunizovaných myší a nesmrtelné myší myelomové buňky [5]. Takto vytvořené myší monoklonální protilátky se staly významným nástrojem pro základní i aplikovaný výzkum a klinickou diagnostiku. Brzy se začalo uvažovat také o jejich terapeutickém využití a první terapeutickou protilátkou schválenou FDA (Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu léčiv) v USA se stal v roce 1986 muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®, k prevenci odmítnutí orgánu po transplantaci). Klinická praxe však ukázala, že podávání čistě myších protilátek vyvolává silnou imunitní odpověď organismu, což zabránilo jejich širšímu využití. Vývoj nových generací terapeutických protilátek byl umožněn výraznými pokroky v technologiích genového inženýrství a rekombinantní DNA. Nejdříve byly vytvořeny chimérické protilátky, které mají

zachovány myší variabilní řetězce, zatímco konstantní řetězce jsou nahrazeny lidskými [6]. První chimérická protilátka abciximab (ReoPro®, k inhibici agregace krevních destiček), která je Fab fragmentem, byla na trh v USA uvedena v roce 1994. Poté byly vyvinuty humanizované protilátky, které mají myší sekvence zachovány pouze v hypervariabilní oblasti CDR odpovědné za vazbu antigenu. Tato technika se nazývá CDR grafting [7]. První humanizovaná protilátka daclizumab (Zenapax®, k prevenci odmítnutí orgánu po transplantaci) byla schválena v roce 1997. Roky 1997 a 1998 byly v historii vývoje terapeutických protilátek přelomem, na trh bylo uvedeno pět protilátek a zájem o tuto oblast výzkumu prudce vzrostl. V roce 1997 byla schválena i první protilátka k léčbě nádorového onemocnění rituximab (Rituxan®, anti-CD20 protilátka k léčbě hematologických malignit). Dalším milníkem bylo vytvoření plně lidských monoklonálních protilátek. K jejich vývoji bylo potřeba vyvinout alternativní strategie, neboť imunizace lidí nepřichází z etického hlediska v úvahu a dále nebyla k dispozici stabilní lidská myelomová linie vhodná k vytvoření hybridomu. K pokroku došlo teprve s rozvojem metod založených na klonování variabilních sekvencí protilátek a jejich selekci prostřednictvím bakteriofágů [8] a později také přípravou transgenních myší (tzv. humanizované myši), které mají myší geny pro imunoglobuliny nahrazeny lidskými [9,10]. První plně humánní protilátkou uvedenou na trh v USA byl v roce 2002 adalimumab (Humira®, inhibitor TNF- α pro léčbu revmatoidní artritidy) vytvořený pomocí technologie „phage display“, která využívá exprese variabilních řetězců na povrchu bakteriofága. Následně schválené protilátky panitumumab (Vectibix®, inhibitor EGFR pro léčbu kolorektálního karcinomu) v roce 2006 nebo ipilimumab (Yervoy®, anti-CTLA4 protilátka pro léčbu metastatického melanomu) v roce 2011 byly vytvořeny s využitím transgenních myší. Významnou technologií, jak upravit vlastnosti protilátek, je modifikace Fc fragmentů připojením proteinů nebo jejich domén [11]. První schválenou fúzní terapeutickou protilátkou byl v roce 1998 etanercept (Enbrel®),

který má k Fc oblasti připojen receptor pro TNF, a inhibuje tudíž signalizaci TNF- α . Tato protilátka se využívá k léčbě autoimunitních onemocnění [12].

Mezi objevem nových technologií a schválením a uvedením na trh prvních protilátek vytvořených danou technologií bývá průměrně 9–13 let prodleva, což je vzhledem k mnoha fázím procesu registrace nového léčiva (preklinického vývoje, preklinických toxikologických testování a klinických studií) standardní doba odpovídající jiným typům léčiv [13].

Mechanismy působení terapeutických monoklonálních protilátek

Terapeutické protilátky mohou působit na nádorové buňky různými způsoby buď přímo, nebo nepřímo. Přímé účinky spočívají v ovlivnění membránových receptorů nebo proteinů vázaných na buňčném povrchu, růstových faktorů či cirkulujících proteinů. Přímé účinky protilátek mohou být také zprostředkovány pomocí toxinů, radioizotopů nebo cytokinů, které jsou kovalentně navázány na molekulu imunoglobulinu (imunokonjugace). Nepřímé účinky protilátek jsou zprostředkovány Fc oblastí protilátek, kdy protilátky po navázání na cílovou buňku aktivují komplement (complement-dependent cytotoxicity – CDC), stimulují efektorové buňky imunitního systému (antibody-dependent cytotoxicity – ADCC) nebo regulují aktivitu T lymfocytů [1]. Převážná většina terapeutických protilátek schválených ke klinickému použití jsou klasické protilátky první generace, jako např. trastuzumab (Herceptin®, anti-HER2 pro léčbu karcinomu prsu), cetuximab (Erbix®, anti-EGFR pro léčbu kolorektálního karcinomu), panitumumab (Vectibix®, anti-EGFR) nebo bevacizumab (Avastin®, anti-VEGF pro léčbu kolorektálního karcinomu). Méně často se využívají konjugované protilátky, které umožňují specifické doručení terapeutických látek přímo k nádorovým buňkám, čímž dochází ke zvýšení koncentrace léčiva v cílové oblasti a zároveň se minimalizují vedlejší účinky na zdravé tkáně [1]. Přehled monoklonálních terapeutických protilátek schválených FDA

Tab. 1. Přehled terapeutických protilátek využívaných v terapii onkologických onemocnění schválených FDA. Převzato z [14,15].

Název protilátky	Obchodní název	Antigen	Indikace	Formát protilátky	Rok schválení
dinutuximab	Unituxin™	GD2	neuroblastom	chimérická, IgG1	2015
nivolumab	Opdivo®	PD1	melanom	lidská, IgG4	2014
blinatumomab	Blincyto®	CD19, CD3	akutní lymfatická leukemie	myší bispecifický tandemový fragment scFv	2014
pembrolizumab	Keytruda®	PD1	melanom	humanizovaná, IgG4	2014
ramucirumab	Cyramza®	VEGFR2	rakovina žaludku	lidská, IgG1	2014
siltuximab	Sylvant™	IL-6	Castlemanova choroba	chimérická, IgG1	2014
obinutuzumab	Gazyva®	CD20	chronická lymfocytární leukemie	humanizovaná, IgG1, modifikovaná glykosylace	2013
ado-trastuzumab emtanzin	Kadcyla®	HER2	karcinom prsu	humanizovaná, IgG1, imunokonjugát toxinu	2013
pertuzumab	Perjeta®	HER2	karcinom prsu	humanizovaná, IgG1	2012
brentuximab vedotin	Adcetris®	CD30	Hodgkinův lymfom, anaplastický velkobuněčný lymfom	chimérická, IgG1, imunokonjugát toxinu	2011
ipilimumab	Yervoy®	CTLA-4	metastatický melanom	lidská, IgG1	2011
ofatumumab	Arzerra®	CD20	chronická lymfocytární leukemie	lidská, IgG1	2009
panitumumab	Vectibix®	EGFR	kolorektální karcinom	lidská, IgG2	2006
bevacizumab	Avastin®	VEGF	kolorektální karcinom	humanizovaná, IgG1	2004
cetuximab	Erbix®	EGFR	kolorektální karcinom	chimérická, IgG1	2004
ibritumomab tiuxetan	Zevalin®	CD20	nehodgkinské lymfomy	myší, IgG1, imunokonjugát radioizotopu	2002
alemtuzumab	MabCampath®, Campath-1H®, Lemtrada®	CD52	chronická myeloidní leukemie*, roztroušená skleróza	humanizovaná, IgG1	2001* 2014
trastuzumab	Herceptin®	HER2	karcinom prsu	humanizovaná, IgG1	1998
rituximab	MabThera®, Rituxan®	CD20	nehodgkinské lymfomy	chimérická, IgG1	1997

*MabCampath® pro indikaci CML stažen z trhu a distribuován jako Lemtrada® pro léčbu roztroušené sklerózy.

k léčbě onkologických onemocnění je uveden v tab. 1 [14,15].

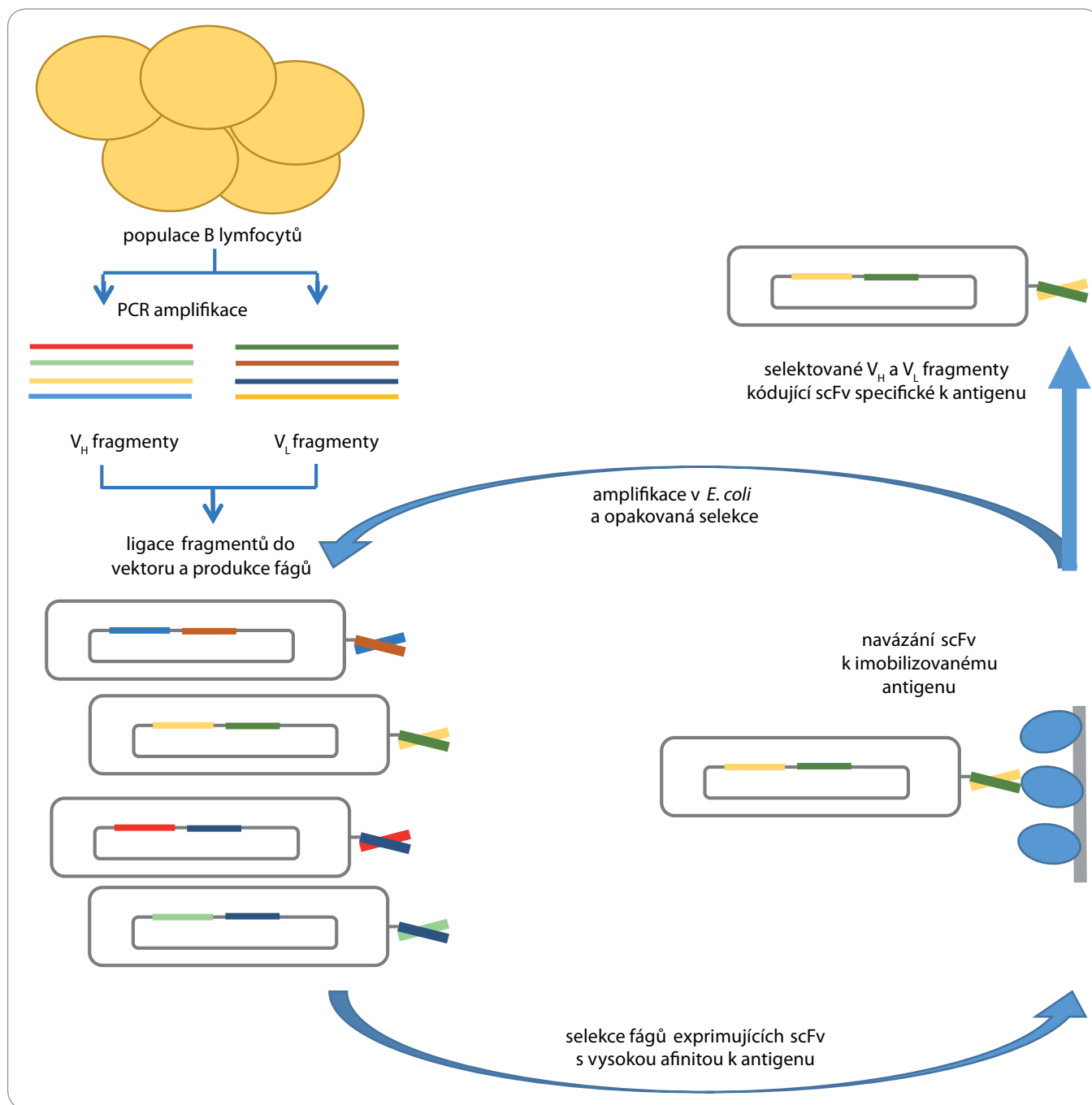
ADC (antibody drug conjugate) jsou monoklonální protilátky chemicky konjugované s cytotoxickými látkami, zejména látkami inhibujícími organizaci mikrotubulů. V současné době jsou registrovány dvě protilátky – brentuximab vedotin (Adcetris®) a trastuzumab emtansine (Kadcyla®), obě konjugované s toxiny mikrotubulů [16]. Další variantou jsou **monoklonální protilátky konjugované s radioaktivními izotopy**. Registrovány jsou protilátky ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) a tositumomab-131I (Bexxar®), které jsou cíleny na

CD20 [17]. **Bispecifické protilátky** jsou protilátky obsahující dva různé Fv fragmenty rozpoznávající dva různé antigeny, např. catumaxomab (Removab®) váže CD3 a EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) [18]. Potenciálně využitelné jsou také **imunotoxiny**, kdy jsou protilátky fúzovány s bakteriálními toxiny Pseudomonas exotoxin A, Diphtheria toxin nebo rostlinnými toxiny gelonin a ricin, které zprostředkovávají smrt nádorové buňky inhibicí proteosyntézy, a proto je tento mechanismus účinný také v případě nedělicích se buněk [19]. **Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)** je přístup, kdy je s pro-

tilátkou konjugován enzym konvertující netoxickou látku v látku cytotoxickou. Po podání netoxické látky dochází k její konverzi specificky v oblasti nádoru [20].

Protilátky druhé generace s cíleně změněnou glykosylací v oblasti Fc fragmentu byly připraveny genovou manipulací za účelem posílení ADCC. První schválenou protilátkou je obinutuzumab (Gazyva®, anti-CD20 protilátka k léčbě chronické lymfatické leukemie) [21].

Během procesu přípravy těchto terapeutických protilátek často dochází ke změnám farmakokinetiky, funkce efektoru, velikosti a imunogenicity. Z tohoto důvodu je důležité věnovat pozornost



Obr. 3. Schéma postupu přípravy protilátek metodou phage display.

výběru cílových antigenů i optimálních protilátek, včetně typu konstruktu rekombinantní protilátky a terapeutického přístupu.

Klonování protilátek – knihovny protilátek

Příprava knihoven lidských protilátek z přirozeně variabilních (naivních) zdrojů je v současné době zavedená technologie

využívaná k produkci protilátek s definovanou specifitou k jakémukoli antigenu. Tato technologie se rozšířila díky zavedení metody phage display, která umožňuje vystavit peptidové sekvence na povrchu bakteriofágů a podrobit je opakované selekci vůči specifickému antigenu (obr. 3). Phage display je tak analogií přirozené selekce protilátek *in vivo* [8]. Pro účely selekce protilátek je nejvhodnější bakte-

riofág M13, přičemž kódující sekvence protilátek jsou fúzovány s genem pro plášťový protein pIII a fragmenty protilátek jsou tak vystaveny na povrchu bakteriofága. Tímto způsobem je propojen fenotypový projev, fragment protilátky na povrchu bakteriofága, s genotypem, nukleotidovou sekvencí kódující protilátku.

První krok k přípravě knihovny je izolace kvalitní RNA z vybraných buněk

(např. mononukleární buňky z periferní krve). Tato RNA je reverzní transkriptázou přepsána do cDNA, která je použita jako templát pro PCR amplifikaci V_H a V_L řetězců s využitím primerů specifických pro konstantní oblasti V_H a V_L řetězců. Takto jsou amplifikovány přeskupené variabilní oblasti celého repertoáru imunoglobulinů, které odrážejí specifitu všech protilátek daného jedince. PCR produkty jsou ligovány do vektorů, které umožňují exprimovat V_H a V_L řetězce jako scFv (single chain fragment variable) fúzané ke kapsidovému proteinu pIII. Takto lze připravit knihovny tvořené 10^8 – 10^{11} unikátními klony, které jsou podrobeny 3–4 cyklům selekce a amplifikace, při níž jsou selektovány klony s vysokou specifitou a afinitou k antigenu. Vzdolené klony mohou být podrobeny analýze vazebných vlastností a geny kódující V_H a V_L řetězce sekvenovány. Solubilní scFv fragmenty mohou být snadno exprimovány v bakteriích a purifikovány.

Screening knihoven umožňuje přípravu protilátek specifických k jakýmkoli antigenům, včetně toxinů nebo proteinů, které jsou konzervovány v rámci savčích buněk a lze je obtížně připravit imunizací. Během selekce je možné navíc získat množství různých protilátek pokrývajících široké spektrum epitopů. Syntetické monoklonální protilátky mají relativně nízkou afinitu k antigenu, a proto byly vyvinuty metody napodobující proces zvyšování afinity (affinity maturation), jejichž výsledkem jsou kompletní syntetické protilátky [22,23].

Phage display není jediná metoda selekce protilátek. Alternativní metody jsou mRNA display [24] a ribozomový display scFv fragmentů [25], kdy selekce probíhá při *in vitro* translaci nebo vystavení scFv a Fab fragmentů na povrchu bakterií [26] či kvasinek [27].

Transgenní myši

Transgenní myši mají do svého genomu včleněny geny pro lidské imunoglobuliny, zatímco endogenní lokusy jsou inaktivovány. Tyto transgenní myši produkují celou škálu protilátek syntetizovaných z lidských genových sekvencí, a proto mohou být využity k získávání lidských monoklonálních protilátek s vysokou

afinitou a velmi nízkou imunogenicitou přímo po imunizaci cílovou molekulou. Klinické testy ukazují, že takto produkováné terapeutické protilátky jsou velmi dobře tolerovány a jsou klinicky aktivní. Těchto úspěchů bylo dosaženo díky pokrokům v technikách genové manipulace s buňkami savčích embryí. Pro úspěšnou expresi lidských protilátek v transgenních myších je nezbytné, aby vložené lidské sekvence funkčně nahradily endogenní imunoglobulinové sekvence v B lymfocytech a podléhaly všem procesům v průběhu vývoje lymfocytů, jako jsou VDJ rekombinace, somatické mutace a přesmyk izotypových tříd, a zároveň ovlivňovaly funkci, diferenciaci a přežití B lymfocytů. První transgenní myši měly do svého genomu vloženu pouze malou část VDJ segmentů, a přesto produkovaly funkční a specifické protilátky proti antigenům, kterými byly imunizovány [9,10]. Následně bylo vyvinuto mnoho kmenů transgenních myši s rozšířeným spektrem variabilních genových segmentů a nedávno bylo publikováno vytvoření transgenních myši s kompletně humanizovanými variabilními sekvencemi, kdy bylo do těchto myši vloženo až šest milionů bází DNA [28,29].

Produkce terapeutických protilátek probíhá ve velkoobjemových zařízeních, ve kterých je nutno dodržovat specifické postupy, aby byla zajištěna vysoká kvalita vyhovující standardům pro výrobu léčiv. Využívají se zejména tkáňové kultury savčích buněk, např. CHO (chinese hamster ovary) nebo hybridomové linie. Fragmenty protilátek mohou být s úspěchem produkovány v bakteriálních kulturách. Výzkum se zaměřuje také na využití kvasinkových systémů *Pichia pastoris*, transgenních rostlin, mléka nebo vajec transgenních živočichů.

Závěr

Vývoj monoklonálních protilátek k léčbě nádorových onemocnění je jedním z vědeckých úspěchů uplynulých let a využití terapeutických protilátek patří mezi nejrychleji se rozvíjející oblasti protinádorové léčby. Terapeutické protilátky prošly výraznou evolucí, jejich transformací z myších protilátek přes chimérické a humanizované až k plně lidským byly

sníženy jejich vedlejší účinky, a naopak novými technologiemi byl zesílen jejich terapeutický potenciál. Další rozvoj terapeutických protilátek bude souviset s identifikací nových specifických nádorových antigenů, selekcí účinných protilátek a prohloubením znalostí o kontrole nádorové transformace imunitním systémem s cílem vyvinout nové strategie, které povedou ke klinickému prospěchu u onkologických pacientů.

Literatura

1. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 278–287. doi: 10.1038/nrc3236.
2. Hořejší V, Bartůňková J (eds). *Základy imunologie*. 1. vyd. Praha: Triton 1998.
3. Junghans RP, Anderson CL. The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(11): 5512–5516.
4. Nelson AL. Antibody fragments: hope and hype. *MAbs* 2010; 2(1): 77–83.
5. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517): 495–497.
6. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA et al. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(21): 6851–6855.
7. Jones PT, Dear PH, Foote J et al. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; 321 (6069): 522–525.
8. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990; 348(6301): 552–554.
9. Lonberg N, Taylor LD, Harding FA et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 1994; 368(6474): 856–859.
10. Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 1994; 7(1): 13–21.
11. Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J et al. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 1989; 337(6207): 525–531.
12. Zalevsky J, Secher T, Ezhevsky SA et al. Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection. *J Immunol* 2007; 179(3): 1872–1883.
13. Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 2005; 23(9): 1117–1125.
14. Antibodysociety.org [homepage on the Internet]. The Antibody Society, USA; c2007–2013 [updated 2015 January 17; cited 2015 April 10]. Available from: http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php.
15. FDA.gov [homepage on the Internet]. U.S. Food and Drug Administration, USA [cited 2015 April 10]. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>.
16. Klute K, Nackos E, Tasaki S et al. Microtubule inhibitor-based antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Onco Targets Ther* 2014; 7: 2227–2236. doi: 10.2147/OTT.S46887.
17. Kraeber-Bodéré F, Rousseau C, Bodet-Milin C et al. A pretargeting system for tumor PET imaging and radioimmunotherapy. *Front Pharmacol* 2015; 6: 54. doi: 10.3389/fphar.2015.00054.

18. Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discov Today* 2015. doi: 10.1016/j.drudis.2015.02.008.
19. Alewine C, Hassan R, Pastan I. Advances in anticancer immunotoxin therapy. *The Oncologist* 2015; 20(2): 176–185. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0358.
20. Zawilska JB, Wojcieszak J, Olejniczak AB. Prodrugs: a challenge for the drug development. *Pharmacol Rep* 2013; 65(1): 1–14.
21. Listinsky JJ, Siegal GP, Listinsky CM. Glycoengineering in cancer therapeutics: a review with fucose-depleted trastuzumab as the model. *Anticancer Drugs* 2013; 24(3): 219–227. doi: 10.1097/CAD.0b013e328359e3f4.
22. Barbas CF, Burton DR. Selection and evolution of high-affinity human anti-viral antibodies. *Trends Biotechnol* 1996; 14(7): 230–234.
23. Razai A, Garcia-Rodriguez C, Lou J et al. Molecular evolution of antibody affinity for sensitive detection of botulinum neurotoxin type A. *J Mol Biol* 2005; 351(1): 158–169.
24. Fukuda I, Kojoh K, Tabata N et al. In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(19): e127.
25. Hanes J, Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(10): 4937–4942.
26. Fuchs P, Breitling F, Dübel S et al. Targeting recombinant antibodies to the surface of *Escherichia coli*: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein. *Biotechnology (N Y)* 1991; 9(12): 1369–1372.
27. Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* 1997; 15(6): 553–557.
28. Lee EC, Liang Q, Ali H et al. Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat Biotechnol* 2014; 32(4): 356–363. doi: 10.1038/nbt.2825.
29. Murphy AJ, Macdonald LE, Stevens S et al. Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(14): 5153–5158. doi: 10.1073/pnas.1324022111.

Imunologické aspekty v onkologii – cirkulující $\gamma\delta$ T lymfocyty

Immunological Aspects in Oncology – Circulating $\gamma\delta$ T Cells

Cibulka M.^{1,2}, Selingerová I.¹, Fědorová L.¹, Zdražilová Dubská L.¹⁻³

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Advanced Cell Immunotherapy Unit, Farmakologický ústav, LF MU, Brno

³ Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

$\gamma\delta$ T lymfocyty představují menšinovou populaci T lymfocytů, která se v základu liší konstrukcí TCR receptoru. Unikátní vlastnosti $\gamma\delta$ TCR dávají pak těmto buňkám jedinečné efektorové funkce a specifickou roli (nejen) v protinádorové imunitní odpovědi. V tomto článku popisujeme základní charakteristiku těchto buněk ve vztahu k onkologickým onemocněním. V experimentální části je pak provedena exploratorní analýza zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů v běžné populaci a srovnání těchto hodnot s hodnotami pacientů s melanomem a karcinomem prsu. Medián procentuálního zastoupení $\gamma\delta$ ze všech lymfocytů byl 2,9 % (interkvartilové rozpětí – IQR 1,7–4 %). Medián absolutních počtů $\gamma\delta$ buněk v litru krve byl $5,05 \times 10^7$ (IQR $2,9\text{--}7,84 \times 10^7$). Medián procentuálního zastoupení $\gamma\delta$ buněk mezi T lymfocyty byl 3,9 % (IQR 2,3–5,6 %). V referenční populaci nebyla prokázána závislost kvantitativních parametrů $\gamma\delta$ buněk na pohlaví či věku. Dále proběhla detailní imunofenotypizace popisující zastoupení paměťových subpopulací (pomocí značení CD45RO a CD27) a výskyt povrchových markerů HLA-Dr, CD69, CD25, CD28, CCR7, CTLA-4, ICOS, PD-1L a PD-1 mezi $\gamma\delta$ T lymfocyty u kontrol a patientek s karcinomem prsu. Z této analýzy je patrné, že $\gamma\delta$ buňky netvoří uniformní populaci, ale mohou se ve svých povrchových markerech lišit, stejně jako se pak liší v efektorových funkcích.

Klíčová slova

$\gamma\delta$ T lymfocyty – nádorová onemocnění – imunitní systém – periferní krev – imunoterapie – T lymfocyty

Summary

$\gamma\delta$ T cells present a minor population of the T cell family which basically differs in construction of their T cell receptor (TCR). Thanks to the features of $\gamma\delta$ TCR, these cells can acquire unique effector functions and play a specific role (not only) in anti-tumor immune response. In this article, we describe the basic characteristics of this cell population and their connection to cancer. In the experimental part we performed exploratory analysis of circulating $\gamma\delta$ T cells in reference population and comparison with melanoma and breast carcinoma patients. The median percentage of $\gamma\delta$ T cells from all lymphocytes was 2.9% (interquartile range – IQR 1.7–4%). The median absolute numbers of $\gamma\delta$ cells per liter of blood was 5.05×10^7 (IQR $2.9\text{--}7.84 \times 10^7$). The median percentage of $\gamma\delta$ cells between all CD3 T cells was 3.9% (IQR 2.3–5.6%). No correlation between $\gamma\delta$ T cells levels and gender or age was observed in reference population. Detailed immunophenotyping was also conducted describing representation of memory subsets (using CD45RO and CD27 markers) and presence of surface markers HLA-Dr, CD69, CD25, CD28, CCR7, CTLA-4, ICOS, PD-1L and PD-1 between $\gamma\delta$ T cells of the controls and breast carcinoma patients. From this analysis, it is evident that $\gamma\delta$ T cells do not represent a uniform population but they differ in surface markers as well as in their effector functions.

Key words

$\gamma\delta$ T cells – cancer – immune system – peripheral blood – immunotherapy – T lymphocytes

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projekty MŠMT – NPU I – LO1413 a ACIU LM201117 a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), by the projects MEYS – NPS I – LO1413, ACIU LM201117, and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Lenka Zdražilová Dubská, Ph.D.
Oddělení laboratorní medicíny
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: dubska@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 5. 2015

Přijato/Accepted: 9. 7. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152560>

Úvod

Základní povrchovou strukturou T lymfocytů je tzv. T-cell receptor (TCR). Pomocí tohoto receptoru a kostimulačních molekul pak T lymfocyty rozpoznávají antigenní peptidy, ve většině případů prezentované pomocí hlavního histokompatibilního komplexu (major histocompatibility complex – MHC) antigen prezentujících buněk (antigen presenting cells – APC). TCR je transmembránový heterodimer složený ze dvou řetězců, buďto α a β nebo γ a δ . Každý řetězec sestává z intracelulární, transmembránové a extracelulární domény, jejíž variabilní doména je odpovědná za rozpoznání antigenního komplexu. Zatímco TCR receptor konvenčních $\alpha\beta$ T lymfocytů interaguje pouze s peptidy navázanými na molekuly MHC třídy I nebo II, $\gamma\delta$ TCR je schopen rozpoznat širokou škálu vlastních a cizích antigenů, např. malých peptidů, solubilních či membránových proteinů, fosfolipidů apod., bez prezentace prostřednictvím MHC [1], díky čemuž je jejich role v rámci imunitního systému spíše vrozená než adaptivní.

Mezi efektorové funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů patří produkce cytokinů (INF- γ , TNF- α) a chemokinů (MIP-1 α/β , RANTES), stejně jako přímá cytotoxicita (perforin, granzym) a buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (antibody dependent cellular cytotoxicity – ADCC) [2]. U člověka a myši představují $\gamma\delta$ T lymfocyty méně než 5 % všech cirkulujících lymfocytů [3], naopak u přežvýkavců se jejich zastoupení pohybuje mezi 15 a 60 % a zde $\gamma\delta$ T lymfocyty mají roli spíše regulační než cytotoxickou [4]. Mimo cirkulaci a lymfatické orgány se $\gamma\delta$ T lymfocyty u člověka nacházejí také v epitelu. Přesné typy $\gamma\delta$ TCR receptoru jsou tkáňově specifické. Konkrétně V γ 9V δ 2 TCR je exprimován na 50–95 % $\gamma\delta$ buněk v periferní krvi [5], zatímco TCR složené z jiných V δ elementů se vyskytují na $\gamma\delta$ buňkách ve vnitřních orgánech (V δ 1 a V δ 3) nebo kůži (V δ 1) [6].

Cílem tohoto sdělení je shrnout literární data o úloze $\gamma\delta$ buněk u onkologických onemocnění. Cílem experimentální části je popsat: a) hladiny cirkulujících $\gamma\delta$ T lymfocytů v krvi jedinců z běžné populace a provést exploratorní analýzu; b) hodnoty cirkulujících $\gamma\delta$ T lymfocytů u pacientů s maligním melano-

mem a karcinomem prsu a c) detailního imunofenotypu.

Patofyziologická úloha $\gamma\delta$ T lymfocytů

Vzhledem k tomu, že aktivace $\gamma\delta$ buněk nevyžaduje zpracování a prezentování antigenu antigen-prezentující buňkou, mohou být $\gamma\delta$ buňky velmi rychle aktivovány a sloužit tak jako součást časné fáze imunitní odpovědi. Stejně jako NK buňky, i $\gamma\delta$ T lymfocyty reagují na stimulaci ligandy indukovanými infekcí nebo stresem, kterými jsou u lidí např. MICA/B nebo ULBP [7]. Tyto ligandy jsou obvykle exprimovány slabě či vůbec a k jejich upregulaci dochází pouze za přítomnosti stresu (poškození DNA, teplotní stres) nebo infekce. K aktivaci $\gamma\delta$ buněk pak dochází prostřednictvím jejich receptoru NKG2D [8,9], v některých případech přímo prostřednictvím $\gamma\delta$ TCR receptoru [10]. Lidské $\gamma\delta$ T buňky navíc exprimují receptory rozpoznávající molekulární vzorce (pattern recognizing receptors – PRR) jako např. toll-like receptory (TLR), které modulují jejich aktivaci [11]. Historicky je známa především schopnost mykobakterií reaktivovat $\gamma\delta$ T lymfocyty [12].

Studie ukázaly, že V γ 9V δ 2 buňky lidské periferní krve dokážou po aktivaci fosfoantigenem vyvolat imunitní odpověď typu Th1 [13], která je charakterizována produkcí cytokinů TNF- α a INF- γ a cytotoxickou aktivitou [14]. Tato diferenciace V γ 9V δ 2 buněk cestou Th1 pravděpodobně probíhá během jejich periferní expanze po vystavení environmentálním mikrobiálním antigenům. Novorozenecké $\gamma\delta$ buňky produkují INF- γ , schopnost produkovat TNF- α získávají po jednom měsíci od vystavení antigenům prostředím po porodu [15]. V *in vitro* podmínkách je ale v závislosti na přítomných cytokinech a stimulech TCR receptoru možno diferencovat $\gamma\delta$ buňky do fenotypů připomínajících Th2, Th17, folikulární pomocné T buňky (Tfh) nebo regulační T buňky (Treg) [16,17].

$\gamma\delta$ T lymfocyty a onkologická onemocnění

Mechanismus rozpoznání nádorové buňky

Aktivace a získání efektorových funkcí je u $\gamma\delta$ buněk, stejně jako u ostatních po-

pulací T lymfocytů, podmíněno stimulací TCR receptoru. Ten u $\gamma\delta$ T lymfocytů specificky rozeznává molekuly, jejichž exprese je zvýšená ve stresových podmínkách. V případě normální buňky je koncentrace izoprenoidních metabolitů (jako např. izopentyl pyrofosfát – IPP) příliš malá na to, aby byla rozpoznána V γ 9V δ 2 buňkami jakožto varovný signál. Deregulace izoprenoidního metabolismu má u některých nádorů za následek nadprodukcii IPP, které je pak detekováno V γ 9V δ 2 buňkami jako nádorový antigen [18]. K akumulaci IPP dochází např. při zablokování metabolismu kyseliny mevalonové pomocí aminobisfosfonátů. Stimulace NKR exprimovaného $\gamma\delta$ buňkami a částečně také receptoru NKG2D může rovněž efektivně spustit protinádorové funkce těchto buněk. NKG2D je exprimován V γ 9V δ 2 buňkami a váže se na nekonvenční MHC molekuly typu MIC nebo ULBP, které jsou exprimovány nádorovými buňkami [8,9].

Vliv na aktivitu jiných imunokompetentních buněk

Kromě přímého cytotoxického efektu se $\gamma\delta$ buňky podílí na protinádorové imunitní odpovědi také nepřímo prostřednictvím aktivace jiných buněčných typů, jako např. dendritických buněk, NK buněk a efektorových T lymfocytů (obr. 1). Při kontaktu s nádorovou buňkou nebo po stimulaci TCR, NKG2D či za působení cytokinů jako IL-12 nebo IL-18 produkují lidské $\gamma\delta$ T lymfocyty INF- γ a TNF- α [8,19]. Tyto dva cytokiny mohou potlačovat růst nádoru několika možnými způsoby, především však iniciací protinádorové aktivity CD8 buněk (obr. 1A) a inhibicí angiogeneze [20].

Pro-nádorová aktivita $\gamma\delta$ T lymfocytů

Imunosupresivní schopnosti lidských V γ 9V δ 2 buněk mohou také hrát důležitou roli. Tyto buňky dokáží po aktivaci produkovat cytokiny jako IL-4, IL-10 nebo TGF- β , potlačovat proliferaci T lymfocytů a tím vytvořit regulační mechanismus, který může výrazně potlačit protinádorovou imunitní odpověď [21]. Vše rozhodně závisí na kontextu, jelikož V γ 9V δ 2 buňky mohou vykazovat funkce Th1, Th2, Th17 i Th1/reg-like funkce a syntetizovat jak INF- γ , IL-4 a IL-17, tak

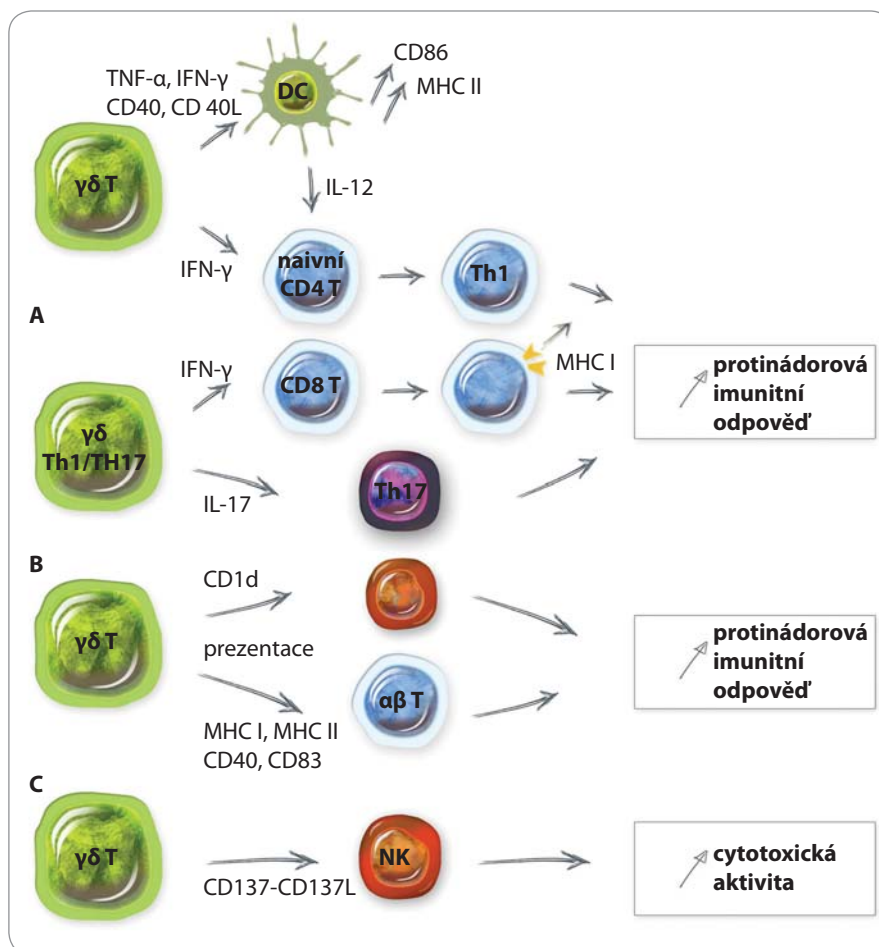
IL-10 nebo TGF- β . Poslední dva jmenované cytokiny mají imunosupresivní funkce a mohou být tím pádem zapojeny do pro-nádorových aktivit $\gamma\delta$ T lymfocytů. TGF- β hraje klíčovou roli v rozvoji nádoru díky schopnosti posílit invazivitu nádorových buněk a tvorbu metastáz prostřednictvím modulace imunitního prostředí v oblasti nádoru. Nejvýznamnější mechanismy podpory progresu nádoru spojené s TGF- β jsou epiteliálně-mezenchymální tranzice, únik imunitního systému a podpora proliferace nádorových buněk [22]. Exprese IL-10 a TGF- β je u různých typů nádorů často zvýšená. IL-10 přímo ovlivňuje funkce antigen prezentujících buněk prostřednictvím potlačení exprese MHC a kostimulačních molekul, což má za následek potlačení imunitní odpovědi, případně nastolení tolerance. IL-10 navíc potlačuje produkci Th1 cytokinů a podporuje T-regulační mechanismy.

$\gamma\delta$ T lymfocyty v protinádorové imunoterapii

$\gamma\delta$ buňky vykazují lytickou aktivitu nezávislou na MHC vůči nádorovým buňkám *in vitro* [23] a byla prokázána jejich schopnost infiltrovat různé typy nádorových tkání včetně karcinomu plic [24], karcinomu ledvin [25] a maligního melanomu [26]. Z tohoto důvodu se lidské V γ 9V δ 2 T lymfocyty jeví jako atraktivní cíl pro protinádorové terapie. Existují dva základní přístupy využití $\gamma\delta$ T lymfocytů v protinádorové terapii: 1. imunomodulace vedoucí k *in vivo* stimulaci $\gamma\delta$ buněk a jejich protinádorové aktivitě, 2. *in vitro* expanze a přímé podání $\gamma\delta$ T lymfocytů onkologickým pacientům.

$\gamma\delta$ lymfocyty jsou expandovatelné působením IL-2, a aminobisfosfonátů nebo fosfoantigenů *in vitro* [24,27], kde byla také prokázána jejich cytolytická aktivita vůči nádorovým buňkám [27]. Adoptivní transfer expandovaných $\gamma\delta$ T lymfocytů byl proveden u pacientů s metastatickým renálním karcinomem, mnohočetným myelomem a nemalobuněčným karcinomem plic [2,28–32]. Podání $\gamma\delta$ T lymfocytů bylo dobře tolerováno a u některých pacientů bylo dosaženo objektivní odpovědi.

K *in vivo* expanzi $\gamma\delta$ lymfocytů může být využit podobný přístup jako při



Obr. 1. Mechanismy protinádorové imunitní odpovědi prostřednictvím $\gamma\delta$ T lymfocytů.

A. Aktivace $\gamma\delta$ buněk vede k produkci TNF- α a IFN- γ a expresi CD40L. To napomáhá maturaci dendritických buněk a diferenciaci T lymfocytů do buněk Th1. $\gamma\delta$ Th17 buňky produkují IL-17 podporující vývoj efektorových Th17 buněk. Buňky Th1 a Th17 vykazují protinádorové funkce.

B. Aktivované $\gamma\delta$ buňky dokáží prostřednictvím trogocytózy získat a exprimovat molekulu CD1d a podporovat aktivaci iNKT buněk. Stejně tak vykazují funkce antigen prezentujících buněk (MHC I a II, CD40, CD83, CD86) a aktivují naivní i efektorové T lymfocyty s protinádorovou cytotoxickou aktivitou.

C. Aktivované $\gamma\delta$ buňky mohou poskytnout kostimulační signál NK buňkám prostřednictvím exprese molekuly CD137.

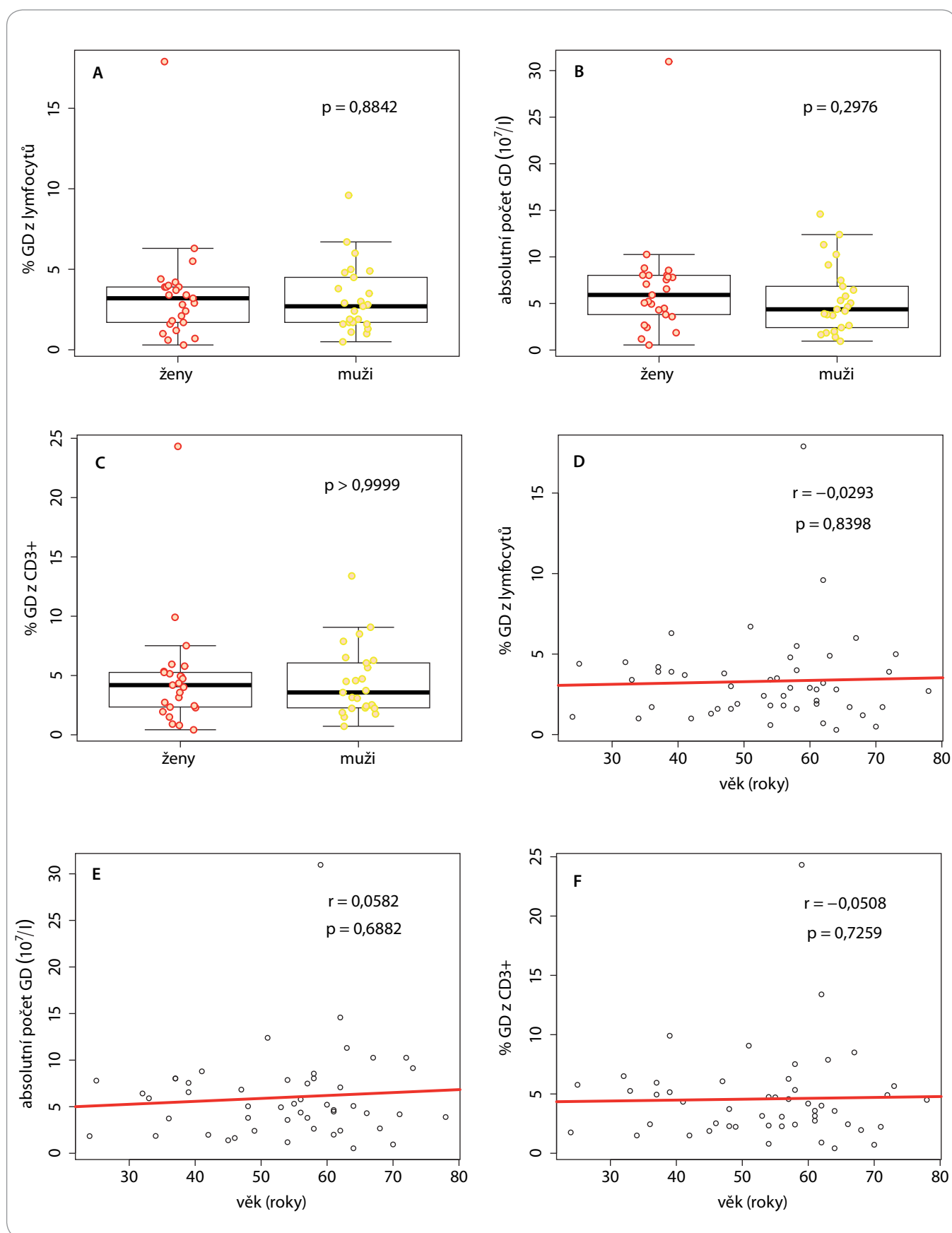
Adaptováno dle [19].

in vitro expanzi, tj. aplikace bisfosfonátů a IL-2 [33,34]. Při léčbě hormonálně refrakterního karcinomu prostaty bylo dosaženo lepší léčebné odpovědi ve skupině léčených IL-2 a zoledronátem oproti skupině se zoledronátem samotným [35]. Stimulace protinádorového efektu $\gamma\delta$ T lymfocytů může být také jedním z efektů imunoterapie prostřednictvím vakcinace mykobakteriálním preparátem [36,37], což je v současné době také předmětem klinických zkoušek [38].

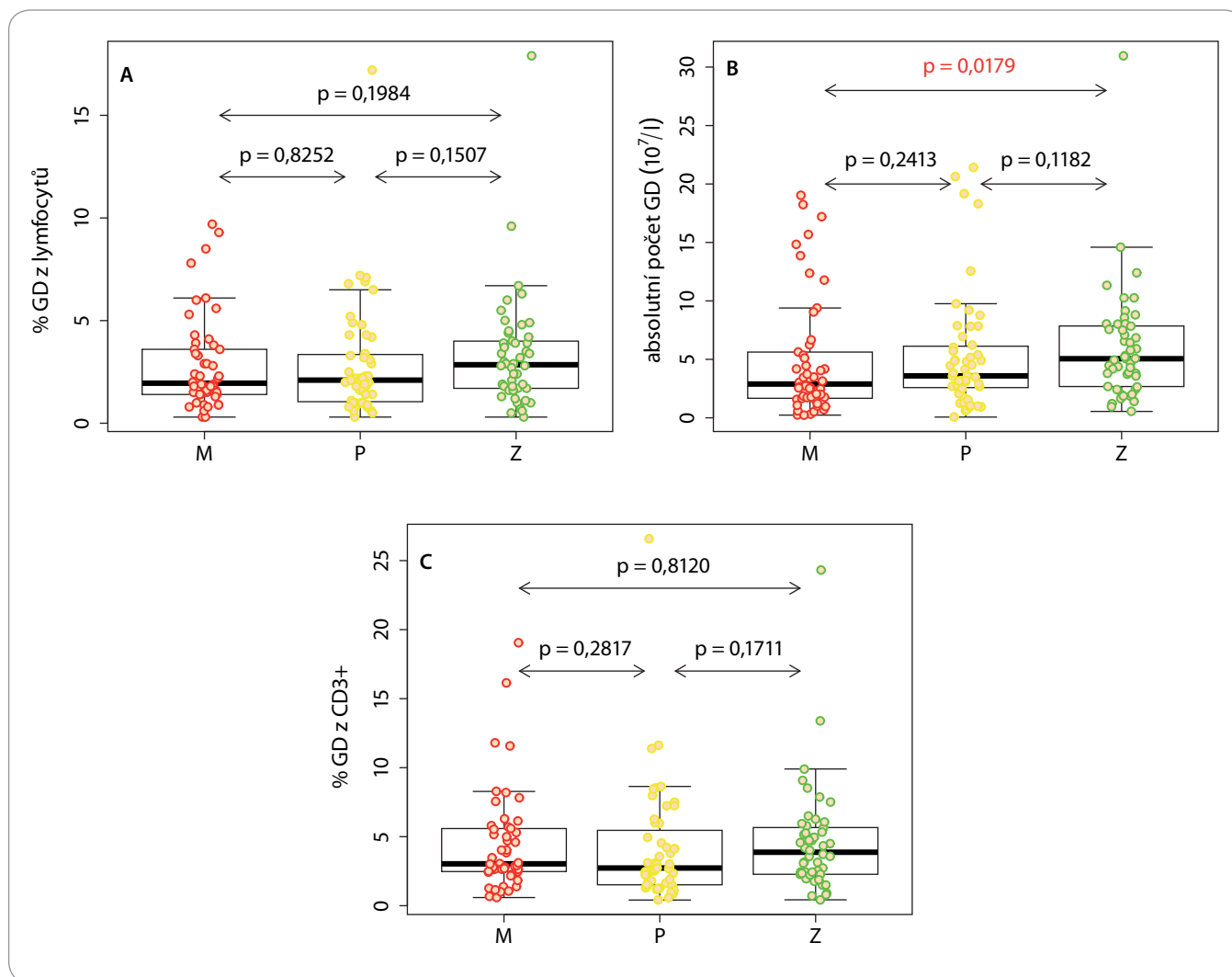
Materiál a metody

Biologický materiál

Při této studii byly průtokovou cytometrií vyšetřovány vzorky krve odebrané do K3EDTA. Vzorky byly analyzovány v den odběru nebo uchovány v lednici po dobu max. 48 hod. Celkem bylo analyzováno 50 vzorků pacientů s maligním melanomem, 50 vzorků pacientek s karcinomem prsu a 50 kontrol, pro které byly použity vzorky z preventivních vyšetření. Vzorky pacientů byly vybrány na základě diagnózy C43, resp. C50 v elektronické



Obr. 2. Kvantifikace $\gamma\delta$ T lymfocytů (GD) ve vzorcích periferní krve mužů a žen v referenční populaci.



Obr. 3. Kvantifikace cirkulujících $\gamma\delta$ lymfocytů u pacientů s maligním melanomem (M) a karcinomem prsu (P) ve srovnání s kontrolní populací (Z).

zdravotnické dokumentaci pacienta (NIS Grey Fox) a vzorky pacientů s nádorovou multiplicitou nebyly z analýzy vyloučeny. Věk kontrolních jedinců bez onkologické diagnózy se pohyboval od 24 do 78 let s mediánem 56 let. U pacientů s melanomem byl věkový rozptyl od 37 do 83 let s mediánem 67,5 let, u karcinomu prsu pak od 36 do 91 let s mediánem 61 let.

Průtoková cytometrie

Flowcytometrická analýza $\gamma\delta$ T lymfocytů byla provedena za použití značení protilátkami anti-CD3 PC5, anti-CD4 PC7 a anti- $\gamma\delta$ TCR FITC a pro detailní imunofenotyp anti-CD45RO ECD, anti-CD27 PE, anti-HLA-Dr PC5, anti-CD69 PC5, anti-CD25 PC5, anti-CD278 APC, anti-CD152 PE, anti-CD28 APC-Alexa fluor 750,

anti-CD279 PC7, anti-CD274 APC a anti-CD197 PE (vše Beckman Coulter). Nejdříve proběhla inkubace 50 μ l krve se směsí protilátek po dobu 15 min ve tmě a při pokojové teplotě, poté bylo přidáno 600 μ l lyzačního roztoku VersaLyse (Beckman Coulter) a ponecháno dalších 15 min ve stejných podmínkách. Takto připravené vzorky byly analyzovány flowcytometricky na přístroji Navios (Beckman Coulter). Absolutní počet $\gamma\delta$ T lymfocytů byl stanoven výpočtem z celkového počtu lymfocytů, který byl stanoven na hematologickém analyzátoru Sysmex XT-5000.

Statistická analýza

Statistické zhodnocení bylo provedeno v programu R (verze 3.0.2). Pro porov-

nání hladiny $\gamma\delta$ T lymfocytů ve dvou skupinách byl použit neparametrický Mannův-Whitneyho test. Vztah mezi věkem a hladiny $\gamma\delta$ T lymfocytů byl stanoven pomocí Spearmanova koeficientu korelace a jeho významnost byla testována příslušným testem. Všechny statistické testy byly oboustranné a byly provedeny na 5% hladině významnosti.

Výsledky

Hladiny $\gamma\delta$ T lymfocytů v periferní krvi jedinců bez onkologické diagnózy

U kontrolní populace nebyla u kvantitativních parametrů $\gamma\delta$ T lymfocytů pozorována statisticky významná závislost na pohlaví či věku (obr. 2). Medián procentuálního zastoupení $\gamma\delta$

ze všech lymfocytů byl 2,85 % (interkvartilové rozpětí – IQR 1,7–4 %), z toho u žen 3,2 % (IQR 1,7–3,9 %) a u mužů 2,7 % (IQR 1,7–4,5 %) (obr. 2A). Medián absolutních počtů γδ buněk v litru krve byl $5,05 \times 10^7$ (IQR $2,9$ – $7,84 \times 10^7$), z toho u žen $5,92 \times 10^7$ (IQR $3,8$ – $8,02 \times 10^7$) a u mužů $4,37 \times 10^7$ (IQR $2,41$ – $6,84 \times 10^7$) (obr. 2B). Co se týče procentuálního zastoupení γδ buněk mezi T lymfocyty, medián byl 3,9 % (IQR 2,3–5,6 %), z toho u žen 4,2 % (IQR 2,3–5,3 %), u mužů pak 3,6 % (IQR 2,3–6,1 %) (obr. 2C).

Hladiny γδ T lymfocytů v periferní krvi nemocných s maligním melanomem a karcinomem prsu

Procentuální zastoupení cirkulujících γδ T lymfocytů jak mezi T lymfocyty, tak mezi celkovými lymfocyty se neliší u pacientů s maligním melanomem a karcinomem prsu oproti zdravým kontrolám (obr. 3A, C). Absolutní počet γδ T lymfocytů byl v periferní krvi pacientů s maligním melanomem nižší než u zdravých kontrol (obr. 3B). Mediány analyzovaných hodnot byly následující: procentuální zastoupení γδ buněk ze všech lymfocytů u melanomu 2 % (IQR 1,4–3,6 %), u karcinomu prsu 2,1 % (IQR 1,1–3,4 %) a u kontrol 2,9 % (viz výše). Absolutní počet γδ buněk v litru krve u melanomu $2,9 \times 10^7$ (IQR $1,69$ – $5,56 \times 10^7$), u karcinomu prsu $3,6 \times 10^7$ (IQR $2,59$ – $6,13 \times 10^7$) a u kontrol 5×10^7 (viz výše). Procentuální zastoupení γδ buněk mezi CD3 lymfocyty u melanomu 3 % (IQR 2,5–5,6 %), u karcinomu prsu 2,7 % (IQR 1,5–5,5 %) a u kontrol 3,9 % (viz výše).

V rámci pilotní analýzy byl proveden souhrn klinických dat pacientů s maligním melanomem i karcinomem prsu, jejichž hodnoty γδ T lymfocytů byly výrazně vyšší než ostatní výsledky ze skupiny. Klinické údaje jsou aktuální k 4/2015. Čtyři pacienti s maligním melanomem s nejvyšší hodnotou procentuálního zastoupení γδ T lymfocytů jsou:

Případ A. Pacient, ročník 1955, s onkologickou triplicitou – adenokarcinomem rekta, adenokarcinomem prostaty a maligním melanomem v bederní krajině. Diagnóza melanomu v 8/2013. Ložisko kompletně excidováno, histologická klasifikace pT4b pNX, v kompletní remisi. Adenokarcinom rekta dia-

gnostikován v 4/2013, T4b Nx Mx (LAP v dx třísele), inoperabilní, paliativní sigmoideostomie, 1. linie chemoterapie FOLFOX a konkomitantně radioterapie na oblast pánve, celkem absolvoval 10 sérií chemoterapie bez závažnějších nežádoucích účinků (NÚ), radioterapie ukončena předčasně pro rozvoj kožní toxicity. V 3/2014 onemocněl operabilní a v 4/2014 byla provedena exenterace pánve s ureteroileostomií. Vedlejším nálezem adenokarcinom prostaty, Gleason skóre 3 + 4, pT2c, L0 V0. Pacient dále sledován a léčen pro komplikace spojené s ureteroileostomií. Onkologické onemocnění se nyní jeví bez známek diseminace a bez lokální recidivy.

Případ B. Pacient, ročník 1968, s primárně metastatickým (lymfatické uzliny v proximální části stehna) maligním melanomem dg. 2/2011. Po rozšířené disekci uzlin ilioinguinální krajiny adjuvantní imunoterapie IFN-α, ukončena pro toxicitu v 6/2011. V 1/2012 lokoregionální recidiva a v 6/2012 vícečetné podkožní metastázy bez vzdálené diseminace, v 8/2012 provedena izolovaná hypertermická chemoperfuze levé dolní končetiny, v 10/2012 generalizace melanomu – podkožní metastázy levé dolní končetiny, metastázy lymfatických uzlin v páni a retroperitoneu, susp. jaterní metastázy. V 11/2012 zahájena léčba vemurafenibem v rámci klinické studie s efektem regrese kožních metastáz. Efekt léčby trvá a terapie vemurafenibem pokračuje.

Případ C. Pacient, ročník 1940, s onkologickou duplicitou – maligním melanomem a adenokarcinomem žaludku. Melanom diagnostikován v 1986. Řešen širokou excizí s disekcí levé axily. Po chirurgickém zákroku v kompletní remisi. Adenokarcinom žaludku dg. v 2009. Vzhledem k lokálnímu rozsahu onemocnění následovalo radikální odstranění tumoru s gastrektomií a omentektomií. Po resekci tumoru byl pacient sledován bez adjuvantní terapie. Relaps onemocnění nastal v 7/2014. Na CT objevena solitární metastáza v játrech. V 9/2014 byla odoperována metastatická část jater a horní okraj pankreatu. Pro histologicky pozitivní resekční okraje následovala konkomitantně pooperační radioterapie a chemoterapie v režimu FU/FA

de Gramont. Radioterapie ukončena plánovaně v lednu 2015. Nadále se pokračuje chemoterapií. Aktuálně podána 7. série.

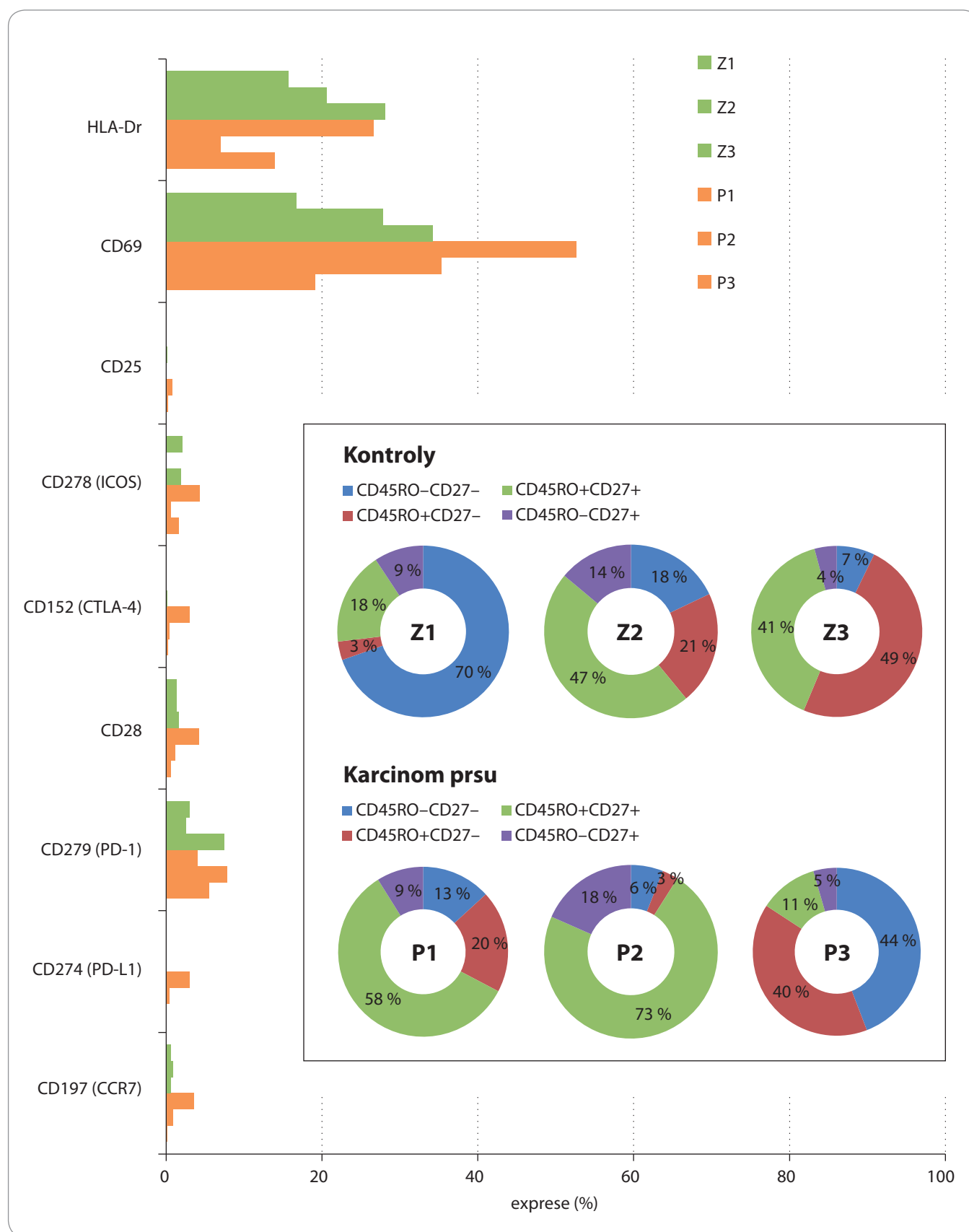
Případ D. Pacient, ročník 1935, s diseminací maligního melanomu. Primární ložisko melanomu diagnostikováno a excidováno v 9/2011. Mikroskopický nález ukázal na neúplnosti excize, proto reexcidováno v říjnu 2011. Pacient dále sledován. V 11/2014 se objevily metastázy v kalvě a v plicích, BRAF negativní. V 2/2015 zahájena 1. linie chemoterapie DTIC, nyní 3. série.

Pacientky s karcinomem prsu s nejvyšším absolutním i procentuálním zastoupením γδ T lymfocytů jsou:

Případ A. Pacientka, ročník 1969, s diagnózou karcinom prsu vpravo, dg. 7/2012, HER2 1+, stav po parciální mastektomii a adjuvantní radioterapii (ukončena 6/2013) a hormonální adjuvantní terapii tamoxifenem. Nyní poradiační fibróza v pravém prsu, bez nálezu metastáz a bez známek recidivy. Nadále hormonoterapie tamoxifenem a 6/2014 a 12/2014 podány dvě dávky imunoterapie s nelipepimut-S (NeuVax™) v rámci studie PRESENT.

Případ B. Pacientka, ročník 1957, s diagnózou karcinom prsu vpravo z 9/2007. Histologicky se jedná o invazivní ductální karcinom, ER 80 %, PR 20 %, HER 3+, HER 2+ (FISH), T4b N2 M0, klinické stadium IIIB. Indikována chemoterapie a cílená léčba: 4krát AC, následně 4krát taxotere 3w a trastuzumab (1/2008–6/2009) s efektem dočasné regrese nádoru. Dále udržovací terapie letrozolem. Progrese onemocnění 9/2014, paliativní chemoterapie docetaxel a trastuzumab s progresí onemocnění v 12/2014, dále pokračováno eribulinem. Nyní metastázy v nadklíčku, podklíčku, na hrudníku vlevo a lehce i vpravo, v levé axile a v levém prsu – další progrese ve srovnání s 12/2014, progredující fluidotorax vlevo. Zahájena léčba s trastuzumab emtansin.

Případ C. Pacientka, ročník 1924, s diagnózou karcinom prsu vlevo 1/2015. Resekce v 2/2015, histologicky invazivní karcinom málo diferencovaný (G3). Bez nálezu metastáz, bez nálezu postižení uzlin (cT2 N0 M0). Od 3/2015 adjuvantní



Obr. 4. Imunofenotyp cirkulujících $\gamma\delta$ T lymfocytů u zdravých kontrol (Z1–Z3) a pacientek s karcinomem prsu (P1–P3).

Vnitřní panel: diferenciace paměťových subpopulací probíhá od fenotypu CD45RO–CD27+ (modrý) dále po směru hodinových ručiček.

hormonální terapie anastrozol s dobrou tolerancí.

Imunofenotyp γδ T lymfocytů

V rámci imunofenotypizace γδ buněk byly analyzovány tři kontrolní vzorky u tří pacientek s karcinomem prsu. Byl sledován výskyt znaků CD45RO a CD27 (jejich kombinace definuje rozdělení T lymfocytů na naivní, paměťové, efektorové a pozdní paměťové), HLA-Dr (MHCII), CD69 (transmembránový lektinový protein vyskytující se na aktivovaných T lymfocytech a NK buňkách), CD25 (α-řetězec receptoru pro IL-2, vyskytuje se na aktivovaných a regulačních T lymfocytech), CD278 (kostimulační molekula z rodiny CD28 – ICOS, vyskytující se na aktivovaných T lymfocytech), CD152 (CTLA-4, receptor na povrchu T lymfocytů, který je afinitní k molekulám B7 a hraje významnou roli v potlačení aktivace imunitního systému), CD28 (kostimulační receptor, který se společně s TCR podílí na aktivaci T lymfocytů), CD279 (programmed cell death protein – 1PD-1, receptor důležitý pro regulaci imunitního systému, zároveň indukuje apoptózu antigen-specifických T lymfocytů a inhibuje apoptózu regulačních T lymfocytů), CD274 (PD-L1 – jeden ze dvou ligandů pro PD-1) a CD197 (chemokinový receptor 7 – CCR-7, podílí se na kontrole migrace paměťových T lymfocytů a stimulaci maturace dendritických buněk). Výsledky jsou uvedeny v obr. 4.

Diskuze

Medián procentuálního zastoupení γδ buněk mezi všemi cirkulujícími T lymfocyty byl u referenční populace 3,87 %, což je mírně nižší hodnota než v jiných studiích, kde se pohybuje okolo 5 % [39,40]. U pacientů s melanomem byl již dříve pozorován pokles cirkulujících γδ buněk [41], což souhlasí i s našimi výsledky. V dřívější studii však autoři poukazují na jev opačný – zvýšení počtu cirkulujících cytotoxických γδ buněk u pacientů s melanomem [42]. V této oblasti je třeba provést důkladnou analýzu s větším důrazem na stadium onemocnění a typ probíhající léčby. Celkově jsme nicméně nepozorovali u onkologických pacientů elevaci γδ buněk, která by mohla být prostým odrazem aktivace

imunitního systému při onkologickém onemocnění ve smyslu reaktantu akutní fáze. Otázkou je pochopitelně vliv protinádorové terapie na potlačení tvorby a vývoje γδ T lymfocytů. Zvýšené počty γδ buněk u některých pacientů jak s maligním melanomem, tak s karcinomem prsu pozorované v této práci jsou nyní v rovině kazuistik a nelze je jednoznačně interpretovat. Zajímavostí nicméně je elevace γδ buněk u pacientky na imunoterapii nonapeptidem nelipepmut-S a u pacienta s primárně metastatickým maligním melanomem s dlouhodobým efektem léčby vemurafenibem, v současné době více než čtyři roky od diagnózy.

Ve studii s expandovanými γδ T lymfocyty, kde autoři definovali paměťový imunofenotyp absencí znaku CD45RA, byl dominantní imunofenotyp naivní CD27+CD45RA+ nebo CD27+CD45RA– paměťový, zatímco expandované buňky měly IF CD27–CD45RA– efektorový paměťový imunofenotyp [2]. Naše exploratorní analýza definující paměťový imunofenotyp jako CD45RO+ ukázala, že imunofenotyp v rámci kontrolní skupiny zdravých jedinců je variabilní. Zatímco u kontroly Z1 převažovaly pozdní paměťové CD27–CD45RO– buňky, u kontroly Z2 převažovaly efektorové CD27–CD45RO+ buňky a u kontroly Z3 dominoval paměťový CD27+CD45RO+ a efektorový CD27–CD45RO+ imunofenotyp podobně jako ve studii [2]. U pacientek s karcinomem prsu, které měly nízké zastoupení γδ T lymfocytů, dominoval paměťový CD27+CD45RO+ imunofenotyp u pacientky P3 s vyšším počtem γδ T lymfocytů v periferní krvi, byla většina γδ T lymfocytů pozdní paměťová CD27–CD45RO– nebo efektorová CD27–CD45RO+. Expresí CD69 zcela chyběla u naivních buněk a byla rovnoměrně rozložena mezi paměťové, efektorové a pozdní paměťové subpopulace. Vzhledem k expresi HLA-Dr je zřejmé, že γδ T lymfocyty mají schopnost prezentovat antigen. V naší studii exprese HLA-Dr korelovala se zastoupením efektorových buněk CD27–CD45RO+ podobně jako v práci [43], kde efektorové γδ T lymfocyty sekretovaly nejen IFN-γ, ale také IL-17. U pacienta P1 jsme pozorovali

zvýšenou expresi znaků ICOS, CTLA-4, CD28, PD-L1 a CCR-7. Expresí PD-1 byla naopak menší než u pacientů P2 a P3. Již dříve bylo zjištěno, že s aktivací γδ buněk přichází zvýšení exprese CTLA-4, CD28, PD-1 a PD-L1. Přičemž exprese PD-L1 byla po aktivaci vyšší než exprese PD-1, přestože před aktivací byla nižší než PD-1 [44]. V kontextu tohoto nálezu bychom mohli usuzovat, že u pacienta P1 proběhla stimulace γδ T lymfocytů. Přičemž o aktivaci γδ T lymfocytů u P1 vypovídá také zvýšená exprese znaků ICOS, CCR-7, HLA-Dr a CD69 v porovnání s ostatními testovanými vzorky. Ve vzorku P1 jsme též zachytili malou subpopulaci γδ buněk, které exprimují zároveň markery CTLA-4, PD-L1 a CD25, a tedy se imunofenotypem blíží γδ regulačním T lymfocytům [45].

Z preklinického i klinického výzkumu vyplývá, že γδ buňky v závislosti na přesném fenotypu hrají určitou roli jak při indukci imunitní odpovědi, tak i potlačení jeho funkce. V závislosti na kontextu tak mohou v případě onkologických onemocnění nejen inhibovat, ale do jisté míry i podporovat progresi patofyziologických jevů. Naše studie ukazuje, že i když γδ buňky tvoří jen minoritní část všech CD3+ T lymfocytů, existuje ještě mnoho podskupin, na které je možno tuto subpopulaci rozdělit a které se významně liší ve svých funkcích. Pro detailní charakteristiku a analýzu efektorových a regulačních funkcí γδ T lymfocytů je potřeba provést další experimenty, korelovat nález v periferní krvi s nálezem v nádorové tkáni a klinickými údaji, jako je typ subtyp maligního onemocnění, druh léčby, efekt léčby.

Literatura

1. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity* 1995; 3(4): 495–507.
2. Kakimi K, Matsushita H, Murakawa T et al. Gammadelta T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2014; 3(1): 23–33. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2013.11.01.
3. Groh V, Porcelli S, Fabbri M et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 1989; 169(4): 1277–1294.
4. Guzman E, Hope J, Taylor G et al. Bovine gammadelta T cells are a major regulatory T cell subset. *J Immunol* 2014; 193(1): 208–222. doi: 10.4049/jimmunol.1303398.
5. Hinz T, Wesch D, Halary F et al. Identification of the complete expressed human TCR V gamma repertoire by flow cytometry. *Int Immunol* 1997; 9(8): 1065–1072.

6. Holtmeier W, Pfänder M, Hennemann A et al. The TCR-delta repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR-delta repertoire in the peripheral blood. *J Invest Dermatol* 2001; 116(2): 275–280.
7. Groh V, Steinle A, Bauer S et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998; 279(5357): 1737–1740.
8. Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P et al. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol* 2005; 175(4): 2144–2151.
9. Das H, Groh V, Kuijl C et al. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 2001; 15(1): 83–93.
10. Kong Y, Cao W, Xi X et al. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D. *Blood* 2009; 114(2): 310–317. doi: 10.1182/blood-2008-12-196287.
11. Shojaei H, Oberg HH, Juricke M et al. Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human gammadelta T cells. *Cancer Res* 2009; 69(22): 8710–8717. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1602.
12. Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM et al. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 1989; 339(6225): 544–548.
13. Dunne MR, Mangan BA, Madrigal-Esteban L et al. Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 704941. doi: 10.1155/2010/704941.
14. Thedrez A, Sabourin C, Gerner J et al. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev* 2007; 215: 123–135.
15. Gibbons DL, Hague SF, Silberzahn T et al. Neonates harbour highly active gammadelta T cells with selective impairments in preterm infants. *Eur J Immunol* 2009; 39(7): 1794–1806. doi: 10.1002/eji.200939222.
16. Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol* 2001; 212(2): 110–117.
17. Casetti R, Agrati C, Wallace M et al. Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J Immunol* 2009; 183(6): 3574–3577. doi: 10.4049/jimmunol.0901334.
18. Gober HJ, Kistowska M, Angman L et al. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 2003; 197(2): 163–168.
19. Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E et al. Plasticity of gammadelta T cells: impact on the anti-tumor response. *Front Immunol* 2014; 5: 622. doi: 10.3389/fimmu.2014.00622.
20. Lu Y, Yang W, Qin C et al. Responsiveness of stromal fibroblasts to IFN-gamma blocks tumor growth via angiostasis. *J Immunol* 2009; 183(10): 6413–6421. doi: 10.4049/jimmunol.0901073.
21. Kuhl AA, Pawlowski NN, Grollich K et al. Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology* 2009; 128(4): 580–588. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03162.x.
22. Drabsch Y, ten Dijke P. TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31(3–4): 553–568. doi: 10.1007/s10555-012-9375-7.
23. Dhar S, Chiplunkar SV. Lysis of aminobisphosphonate-sensitized MCF-7 breast tumor cells by Vgamma9Vdelta2 T cells. *Cancer Immunol* 2010; 10: 10.
24. Ferrarini M, Pupa SM, Zocchi MR et al. Distinct pattern of HSP72 and monomeric laminin receptor expression in human lung cancers infiltrated by gamma/delta T lymphocytes. *Int J Cancer* 1994; 57(4): 486–490.
25. Choudhary A, Davodeau F, Moreau A et al. Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol* 1995; 154(8): 3932–3940.
26. Cordova A, Toia F, La Mendolona C et al. Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PLoS One* 2012; 7(11): e49878. doi: 10.1371/journal.pone.0049878.
27. Liu Z, Guo BL, Gehrs BC et al. Ex vivo expanded human Vgamma9Vdelta2+ gammadelta-T cells mediate innate antitumor activity against human prostate cancer cells in vitro. *J Urol* 2005; 173(5): 1552–1556.
28. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J et al. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(4): 469–476.
29. Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM et al. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57(11): 1599–1609. doi: 10.1007/s00262-008-0491-8.
30. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J et al. Phase I/II study of adoptive transfer of gammadelta T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60(8): 1075–1084.
31. Nicol AJ, Tokuyama H, Mattarollo SR et al. Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *Br J Cancer* 2011; 105(6): 778–786. doi: 10.1038/bjc.2011.293.
32. Abe Y, Muto M, Nieda M et al. Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated Vgamma9gammadelta T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Exp Hematol* 2009; 37(8): 956–968. doi: 10.1016/j.exphem.2009.04.008.
33. Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* 1999; 340(9): 737–738.
34. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 102(1): 200–206.
35. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F et al. Targeting human (gamma)delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67(15): 7450–7457.
36. Fowler DW, Copier J, Wilson N et al. Mycobacteria activate gammadelta T-cell anti-tumour responses via cytokines from type 1 myeloid dendritic cells: a mechanism of action for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(4): 535–547. doi: 10.1007/s00262-011-1121-4.
37. Naoe M, Ogawa Y, Takeshita K et al. Bacillus Calmette-Guerin-pulsed dendritic cells stimulate natural killer T cells and gammadeltaT cells. *Int J Urol* 2007; 14(6): 532–538.
38. Dalgleish A. A Trial comparing gemcitabine with and without IMM-101 in advanced pancreatic cancer. NCT01303172.
39. Mann ER, McCarthy NE, Peake ST et al. Skin- and gut-homing molecules on human circulating gammadelta T cells and their dysregulation in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2012; 170(2): 122–130. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04649.x.
40. Su C, Jakobsen I, Nei M. Diversity and evolution of T-cell receptor variable region genes in mammals and birds. *Immunogenetics* 1999; 50(5–6): 301–308.
41. Petrini I, Scatena C, Naccarato AG et al. CD57 and gammadelta T-cell receptor expression in nodal metastatic spread of melanoma. *Eur J Clin Invest* 2012; 42(5): 575–576. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02612.x.
42. Campillo JA, Martínez-Escribano JA, Minguela A et al. Increased number of cytotoxic CD3+ CD28– gammadelta T cells in peripheral blood of patients with cutaneous malignant melanoma. *Dermatology* 2007; 214(4): 283–288.
43. Hu C, Qian L, Miao Y et al. Antigen-presenting effects of effector memory Vgamma9Vdelta2 T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Mol Immunol* 2012; 9(3): 245–254. doi: 10.1038/cmi.2011.50.
44. Peters C, Oberg HH, Kabelitz D et al. Phenotype and regulation of immunosuppressive Vdelta2-expressing gammadelta T cells. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(10): 1943–1960.
45. Shibuya K, Nakano N. Interleukin-2 drives immature double negative thymocytes into gammadelta T cells expressing Foxp3 on a stromal cell line in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452(4): 912–919. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.155.

Cirkulující nádorová DNA v krvi a její využití jako potenciálního biomarkeru nádorových onemocnění

Circulating Tumor DNA in Blood and Its Utilization as a Potential Biomarker for Cancer

Ondroušková E., Hrstka R.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Nalezení dostatečně citlivé metody pro detekci a monitorování onkologických onemocnění, která by zároveň nepředstavovala zbytečnou zátěž pro pacienta, je dlouholetou výzvou v nádorové diagnostice. Ideálním cílem jsou neinvazivní biomarkery – biologické molekuly, které by bylo možné detekovat z krve, a které by podaly co nejpřesnější obraz o stavu a vývoji onemocnění. V podstatě všechny typy nádorových buněk obsahují somatické mutace, které jim umožňují neregulovaně růst a vyvíjet se. Tyto mutace jsou přítomny pouze v DNA nádorových buněk a představují tedy vhodný biomarker. Genotypizace nádorových tkání se stává v klinické onkologii běžným postupem, má však své limity. Biopsie tkáně podává informaci jen o velmi malé lokalitě nádoru v konkrétním čase odběru a v některých případech je obtížné nebo téměř nemožné vzorek vůbec odebrat. Navíc, jako každá invazivní metoda, představuje zátěž pro pacienty. Řešením by se mohla stát analýza cirkulující nádorové DNA odebrané přímo z krve – tzv. tekuté biopsie. Umírající nádorové buňky uvolňují fragmenty své DNA do krevního oběhu, odkud mohou být izolovány, a díky novým citlivým a přesným metodám podrobeny analýze genomových změn. Tyto změny se navíc v čase vyvíjejí, protože nádorové onemocnění je charakterizováno postupnou evolucí a schopností selektovat nové mutace přinášející růstové výhody či rezistenci k aplikované léčbě. Nezachycení těchto změn je přitom častou příčinou neúspěchu léčby. Současné technologické pokroky v detekci a charakterizaci cirkulující nádorové DNA by mohly umožnit monitorování vývoje nádoru v reálném čase a stát se vodítkem pro včasné a přesné rozhodnutí o nevhodnější léčbě.

Klíčová slova

cirkulující nádorová DNA – nádorové biomarkery – biopsie – tekutá biopsie – krev – mutace

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projekty MŠMT – NPU I – LO1413, GAČR 13-00-956S, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010004).

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101, by the project MEYS – NPS I – LO1413, GAČR 13-00956S, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Eva Ondroušková, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: eva.ondrouskova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 7. 4. 2015
Přijato/Accepted: 3. 7. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152569>

Summary

Pursuing sensitive methods for detection and monitoring of oncologic diseases, that would limit the stress for patients, represents a long-standing challenge in cancer diagnostics. As an ideal non-invasive biomarkers may be considered- biological molecules that can be detected in blood and that provide most relevant picture about the state and development of disease. In fact, all types of cancer cells carry somatic mutations that enable the cells to escape from regulation and to grow and progress. These mutations are only present in the DNA of tumor cells and thus are hallmarks of cancer cells. Genotyping of tumor tissues becomes a common technique in clinical oncology, but it has its limits. Tissue biopsy only yields information about a very small area of tumor at the time of extraction and in some cases it is difficult or impossible to obtain the tissue sample. Furthermore, it is an invasive method that can stress patients. Analysis of circulating tumor DNA from blood – the so-called liquid biopsy – represents one possible solution. Dying tumor cells release fragments of their DNA into the blood stream. From blood, they can be isolated and subjected to analysis using new, sensitive and precise methods that detect genomic changes. These changes are evolving over time because cancer disease is characterized by evolution and ability to select new mutations that bring growth advantages or resistance to treatment. Our inability to capture the heterogeneity during tumor development is one of the major reasons responsible for failure of cancer treatment. Recent technological progress in detection and characterization of circulating DNA could enable tumor evolution monitoring in real time and become a guideline for an accurate and prompt treatment choice.

Key words

circulating tumor DNA – tumor biomarkers – biopsy – liquid biopsy – blood – mutation

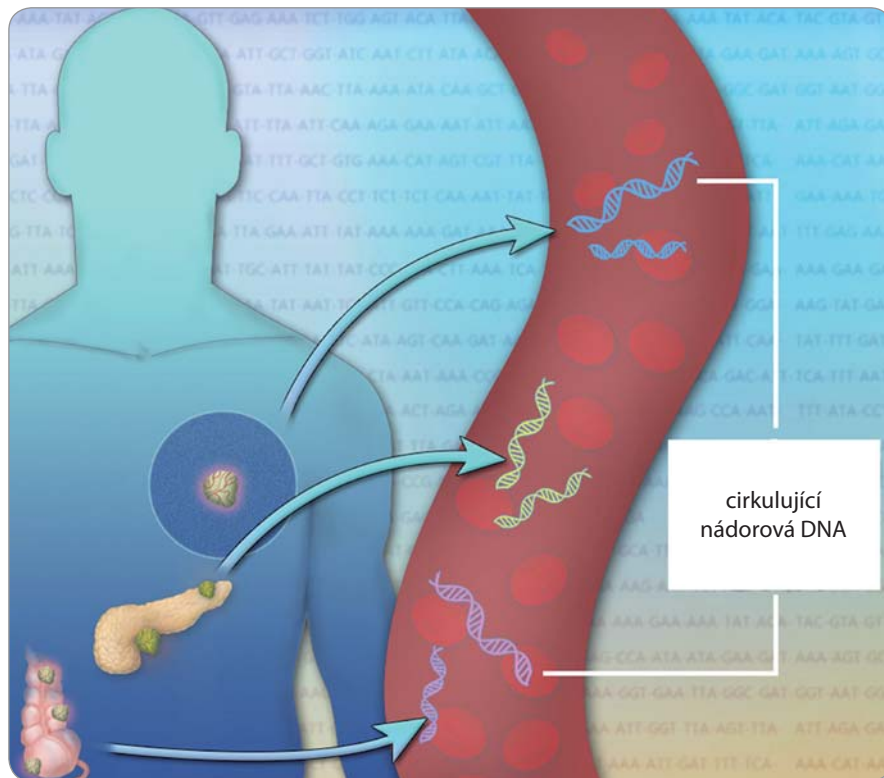
Úvod

Biomarkery využívané v současné době při diagnostice a monitorování odpovědi na léčbu jsou většinou proteiny, jejichž hladina v krvi může být snadno detekována a změna exprese je spojena s určitým typem nádorového onemocnění. V poslední době se však díky rozvoji citlivějších technologií detekce stává také DNA cirkulující v krevním oběhu alternativním zdrojem informací o nádorovém onemocnění.

První nález DNA cirkulující v lidské krvi byl popsán již v roce 1948 [1] a její zvýšená hladina v krvi onkologických pacientů potom o 29 let později [2]. V roce 1994 se u pacientů trpících myelodysplastickým syndromem nebo akutní myelogení leukemií poprvé podařilo prokázat, že tato DNA obsahuje mutace typické pro nádorové buňky, konkrétně mutovaný gen *N-ras* [3]. DNA vyskytující se v krvi je souhrnně označována jako cell-free DNA (cfDNA), cirkulující nádorová DNA potom konkrétně ctDNA (circulating tumor DNA). V krvi zdravých jedinců byla detekována cfDNA v průměrné koncentraci 13 ng/ml, zatímco u pacientů s různými typy rakoviny dosahovala průměrné koncentrace 180 ng/ml [2]. Fragmenty DNA detekovatelné v krvi mohou být velmi krátké (70–200 bp) nebo dlouhé až 21 kb, za jejich původce byly proto považovány apoptotické či nekrotické buňky [4]. Některé studie navíc naznačují i možnost, že je cfDNA buňkami ak-

tivně sekretována [5]. Zbytky mrtvých buněk a jejich DNA jsou běžně odstraňovány buňkami imunitního systému, např. makrofágy. Přesto ale v krvi zůstává v mnoha případech dostatečné množství genetického materiálu umožňujícího analýzu, obzvláště u pacientů s rozvinutým nádorovým onemocněním

v pozdějších stádiích (obr. 1). V těchto případech může být nádorová DNA dokonce převažujícím typem DNA detekovatelné v krvi. Množství detekovatelné ctDNA se liší také v závislosti na typu nádorového onemocnění. Její podíl může např. představovat přibližně 0,01–5 % cfDNA u melanomu [6], méně než 1 %



Obr. 1. Variabilita ctDNA detekovatelné v krvi pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním.

Převzato a upraveno dle [46].

u nemetastazujících kolorektálních nádorů nebo naopak převažujícím typem DNA v plazmě u rozvinutých metastazujících nádorů [7]. Poměr cfDNA/ctDNA se liší také v průběhu léčby, jak je detailně ukázáno na příkladu rakoviny žaludku [8]. ctDNA se může stát přesným diagnostickým nástrojem, protože při její analýze jsou určeny konkrétní genetické a epigenetické změny. Tyto změny zahrnují mutace v DNA, ztrátu heterozygosity, integraci virových genomů, hypermetylaci tumor-supresorových genů či změny v mitochondriální DNA [9]. Navíc je životnost ctDNA v krevním oběhu mnohem kratší než u proteinů (řádově jen několik hodin), takže podává i přesnější obraz o momentálním stavu a vývoji onemocnění [10].

V tomto přehledovém článku shrneme výhody a nevýhody diagnostiky založené na detekci ctDNA, příklady, kdy byla úspěšně využita při monitorování nebo diagnostice nádorových onemocnění a metodiku, která je k detekci ctDNA používána.

Tkáňová vs. tekutá biopsie

Biopsie a histologické vyšetření tkáně jsou ústředním postupem při diagnostice (nejen) nádorových onemocnění. Její limity ale velmi dobře ukázala nedávná studie heterogenity nádorových tkání, konkrétně nádoru ledvin. Po provedení sekvenace DNA získané odběrem vzorků tkáně z různých oblastí téhož nádoru vědci zjistili, že genetická diverzita je větší, než se dosud předpokládalo. Pouze třetina mutací byla shodná ve všech odebraných vzorcích, jinak se od sebe části nádoru podstatně lišily a ještě větší odlišnosti pak vykazovaly sekundární nádory v jiných částech těla pacienta [11]. Při provedení jediné biopsie je tedy pravděpodobné, že vzorek zdaleka nepostihne všechny podstatné mutace, které mohou ovlivňovat odpověď na léčbu a prognózu onemocnění. Biopsie jsou však invazivní a potenciálně rizikové, mnohdy i obtížné proveditelné v případě nedostupných nebo křehkých tkání, jako jsou např. plíce. Navíc opakované provádění tkáňových biopsií je pro pacienty náročné, a proto jsou lékaři ve své diagnostice a plánování léčby často odkázáni na informace,

které rychle zastarávají v kontextu toho, jak se nádor dále vyvíjí.

Nadějnou alternativou se tedy stávají tzv. tekuté biopsie – odběry krve, z ní lze izolovat ctDNA či sekretované proteiny. V klinické praxi je detekce proteinových markerů v krvi běžně používána při diagnostice rakoviny prostaty (prostate-specific antigen – PSA), jater (α -fetoprotein), střeva (carcinoembryonic antigen – CEA), prsu (CA 15.3, cancer antigen) [12] a dalších. V některých případech však diagnóza založená na těchto markerech vede k falešně pozitivním nálezům, protože jejich hladina v krvi může být zvýšena i z jiných důvodů [13]. U většiny nádorů navíc nejsou známy žádné vhodné sekretované proteinové biomarkery, které by bylo možno stanovit přímo z krevních odběrů.

U většiny pacientů však lze v krvi detekovat ctDNA a pomocí stále přesnějších technik zaměřených na analýzu DNA sestavovat důkladnější obraz mutačních změn v nádorových buňkách, než by umožnila tkáňová biopsie. Protože odběr krve lze provádět v podstatě kdykoliv, otevírá se možnost rychlého testování, zda je zvolená léčba vhodná či zda nedošlo v důsledku terapie k selekci a dalšímu růstu rezistentní populace nádorových buněk. Nevýhodou prozatím zůstává to, že jde o metodu novou a zaváděnou, takže dosud publikované studie jsou provedeny na poměrně malém počtu pacientů a jen u některých typů nádorů. Hladina ctDNA v krvi se liší případ od případu a může být obtížné detekovatelná, obzvláště u malých nádorů v raných stadiích. Metody pro zpřesnění detekce i malého množství ctDNA se ale stále vyvíjejí a jsou čím dál citlivější, takže lze očekávat, že se tento diagnostický postup časem stane běžným a pro pacienty přínosným.

Využití ctDNA při diagnostice a monitorování nádorových onemocnění

DNA obsahující somatické mutace je vysoce specifická pro nádorové buňky, a může se tedy stát optimálním markerem. V solidních nádorech, jako jsou např. kolorektální či prsní tumory, bylo zjištěno až 80 mutovaných genů, které jsou detekovatelné prakticky v každé

nádorové buňce, ale nejsou přítomny v DNA zdravých buněk [14].

Velmi obsáhlý vzorek pacientů byl analyzován skupinou dr. Diaze [7]. Technologií založenou na digitální PCR (polymerase chain reaction) zhodnotili využitelnost ctDNA k detekci nádorů u 640 pacientů s různými typy rakoviny. Detekovatelnou hladinu ctDNA zachytili u > 75 % pacientů s rozvinutou rakovinou hlavy a krku, močového měchýře, slinivky, vaječníku, prsu, melanomu, hepatocelulárních buněk, ale u < 50 % pacientů s nádorem v mozku, ledvinách, prostatě nebo thyroidních buňkách. To ukazuje, že množství ctDNA není závislé jen na stupni rozvinutosti nádorového onemocnění, ale i na tom, v jaké tkáni se vyskytuje. Po srovnání hladiny ctDNA a cirkulujících nádorových buněk v této studii se také mj. ukázalo, že tyto dva ukazatele jsou vzájemně nezávislé a že cirkulující nádorové buňky nejsou hlavním zdrojem ctDNA [7].

Modifikace metody zvané BEAMing (beads, emulsion, amplification and magnetics) zvýšila citlivost detekce ctDNA a umožnila studii na 18 pacientech s rakovinou střeva. Hladina ctDNA byla sledována po operaci, kdy poklesla o 99 %, ale v mnoha případech nezmizela zcela. V případech, kdy zůstala ctDNA detekovatelná i po chirurgickém odstranění nádoru, došlo až na jednu výjimku k relapsu onemocnění. Naopak návrat onemocnění nebyl zaznamenán u žádného pacienta, u kterého nebyla ctDNA detekována [15]. Tento výsledek ukázal, že ctDNA může indikovat, zda bude pacient po chirurgickém odstranění nádoru potřebovat i následnou chemoterapii.

Studie srovnávající citlivost proteinových markerů CEA a CA19-9 s metodou založenou na analýze ctDNA byla provedena u sedmi pacientů s kolorektálním karcinomem. V DNA izolované z krve bylo detekováno několik nejčastěji mutovaných genů (*APC*, *KRAS*, *TP53*, *PIK3CA* a *BRAF*). Hladina ctDNA byla sledována po operaci v několika časových intervalech, vždy úzce korelovala s aktuálním klinickým stavem pacienta a projevila se jako univerzálnější marker pro monitorování klinického vývoje nemoci než běžně používané CEA a CA19-9 [16].

Tab. 1. Přehled studií nádorových onemocnění založených na analýze ctDNA.

Typ nádorového onemocnění	Detekovaná mutace	Metodika	Reference
kolorektální karcinom	<i>KRAS</i>	PCR	[38]
	<i>KRAS</i>	PCR	[39]
	<i>APC, KRAS, TP53, PIK3CA, BRAF</i>	PCR-DCE	[16]
	<i>TP53, APC, PIK3CA, KRAS</i>	BEAMing	[15]
	genomové přestavby	PARE	[40]
	chromozomální přestavby	celogenomové sekvenování	[37]
	<i>KRAS, NRAS, BRAF, EGFR</i>	celogenomové, cílené, exomové sekvenování	[7]
karcinom slinivky	<i>KRAS, NRAS, BRAF, EGFR</i>	celogenomové, cílené, exomové sekvenování	[7]
karcinom prsu	<i>TP53</i>	MAP	[41]
	<i>PIK3CA</i>	PCR	[22]
	<i>TP53, PIK3CA</i>	Seq	[42]
	<i>TP53, PIK3CA, PTEN, AKT1, IDH2, SMAD4</i>	NGS	[23]
	<i>PIK3CA</i>	BEAMing	[43]
nemalobuněčný karcinom plic	různé	CAPP-seq	[24]
	<i>EGFR</i>	dPCR	[44]
melanom	<i>BRAF, cKIT, NRAS, TERT</i>	Seq	[25]
karcinom vaječníku	<i>PIK3CA, TP53</i> , genomové přestavby	dPCR	[33]
karcinom prostaty	SNV, změny počtu kopií, přestavby	Ion-AmpliSeq	[45]
	celogenomové SNV, přestavby, kopie	celogenomové sekvenování	[36]

PCR-DCE – polymerase chain reaction – denaturing capillary electrophoresis, dPCR – digital PCR, Seq – sequencing, BEAMing – beads, emulsion, amplification and magnetic, MAP – MIDI-activated pyrophosphorolysis, NGS – next-generation sequencing, CAPP-Seq – capture-based sequencing, PARE – personalised analysis of rearranged ends, SNV – single nucleotide variation

Na signální dráhy *KRAS*, *BRAF*, *EGFR* a *TP53* je zacíleno mnoho chemoterapeutik [17,18]. Pro predikci léčebné odpovědi je tedy důležité znát a průběžně monitorovat případný vznik mutací v těchto genech a sledovat tak evoluci v genomu nádorových buněk způsobenou selektivním tlakem chemoterapeutik [19]. U kolorektálních nádorů s nemutovaným *KRAS* se často indikuje léčba cílená na *EGFR*, ale téměř vždy se během několika měsíců objeví rezistence k této terapii. Analýza ctDNA 24 pacientů ukázala, že během 5–6 měsíců od zahájení léčby byla u devíti pacientů, jejichž nádorové onemocnění bylo původně wild-type *KRAS*, detekována mutace v tomto genu, a tedy že lze metodu monitorování ctDNA využít k predikci odpovědi na léčbu [20]. Podobně, detekce *EGFR* mutací v ctDNA může být využita k předpovědi vývoje onemocnění a rezistence

k chemoterapii u pacientů s rakovinou plic. Ve studii provedené Mackem et al byl analyzován efekt aktivujících mutací v genu pro *EGFR* detekovaných v ctDNA u nemalobuněčných nádorů plic. U všech pacientů (6 ze 49), u kterých byl tento typ mutace detekován, byl pozorován prodloužený medián OS [21].

Při analýze ctDNA u pacientek s rakovinou prsu, založené na detekci *PIK3CA* mutace, byla tato ctDNA v krvi nalezena pouze u rozvinutějších metastatických stadií onemocnění, ale v žádném z 30 vzorků s diagnostikovaným lokalizovaným nádorem. Tento výsledek naznačuje, že ctDNA-*PIK3CA* detekce je využitelná až u pokročilejších stadií nemoci [22]. Podobně se analýza mutací v genech *TP53*, *PIK3CA*, *PTEN*, *AKT1*, *IDH2* a *SMAD4* v ctDNA z plazmy osvědčila jako rovnocenná metoda s tkáňovou biopsií ve studii srovnávací vzorky 17 pacientek s metastatickými

karcinomy prsu [23]. Rovněž u nemalobuněčného karcinomu plic se metodika založená na sekvenaci ctDNA osvědčila jako slibná neinvazivní metoda. Hladina ctDNA v plazmě u 13 pacientů korelovala s velikostí nádoru a ukázala se být citlivější při vyhodnocování brzké odpovědi na léčbu v porovnání s konvenčním radiografickým přístupem [24]. U pacientů s metastatickým melanomem (studie zahrnující 12 pacientů) byly v ctDNA detekovány mutace v genech *BRAF*, *cKIT*, *NRAS* a *TERT*. Hladina ctDNA korelovala s klinickými a radiologickými výsledky a v jednom případě její snížení předcházelo pozdější regresi nádoru [6]. Přehled studií detekujících ctDNA u pacientů s různými typy nádorů je shrnut v tab. 1.

Metodika

Pro širší využití a zavedení testování ctDNA do klinické praxe je potřeba na-

stavit metodiku uchování a zpracování krevních vzorků, stejně jako zvolit nejvhodnější metodu pro následnou detekci a analýzu ctDNA. DNA může být izolována z plazmy nebo séra, přičemž je potřeba při zpracování vzorků zabránit popraskání membrány krevních buněk a kontaminaci jejich DNA. Plazma je preferována před sérem právě díky nižší pravděpodobnosti kontaminace DNA z bílých krvinek, navíc koncentrace cfDNA v čerstvé plazmě, ač nižší než v séru, přesněji odpovídá koncentraci cfDNA v krevním oběhu [25,26]. cfDNA z ní může být izolována pomocí komerčně dostupných kitů. cfDNA pocházející z nádorových i nenádorových buněk může být kvantifikována pomocí PCR v reálném čase (qPCR) založené na amplifikaci ALU sekvencí nebo jiných markerů (β -globin, β -actin) [27]. Protože však, jak již bylo uvedeno dříve, je DNA pocházející z nádorových buněk větší ve výrazné menšině, výzvou se stává následná analýza nádorově-specifických mutací v ctDNA. V tab. 2 jsou uvedeny používané metody, včetně srovnání jejich senzitivity a specifity.

Pro detekci mutací v omezeném počtu genů se jako nejvhodnější jeví různé varianty digitální PCR – na mikročipech či mikrokapkách [28,29] nejlépe v kombinaci s metodou BEAMing, která je založena na zachycení DNA na magnetické kuličky a následné analýze pomocí digitální PCR. ctDNA může být s její pomocí detekována i v případech, kdy ji DNA ze zdravých buněk přechlívá v poměru 10 000 : 1 [30]. Technologie sekvenování nové generace (next-generation sequencing – NGS) jsou aplikovatelné na analýzu DNA v plazmě a umožňují podrobnější detekci mutací v rozsáhlejších oblastech genomu. Jako příklad lze uvést nedávnou studii provedenou na 107 vzorcích plazmy odebraných od pacientů s rakovinou plic. Při analýze DNA z primárního nádoru bylo detekováno 50 mutací v různých genech, z nichž 26 se podařilo detekovat také v krevních vzorcích, se senzitivitou 58 % a specifitou 87 % [31]. Pro detailní analýzu byla NGS technologie využita např. při dlouhodobém sledování pacientky s nádorem prsu, u které bylo analyzováno 300 genů v primárním nádoru,

Tab. 2. Přehled senzitivity a specifity metod používaných pro kvantifikaci ctDNA a pro detekci mutací.

Převzato a upraveno dle [27].

	Metoda	Senzitivita	Specifita
kvantitativní analýza	qPCR	vysoká	nízká
kvalitativní analýza	Sangerovo sekvenování	velmi nízká	vysoká
	pyrosekvenování	nízká	nízká
	NGS	nízká	vysoká
	ARMS	nízká	vysoká
	BEAMing	vysoká	vysoká
	digitální PCR	vysoká	vysoká
	TAM-sekvenování	vysoká	vysoká

qPCR – quantitative polymerase chain reaction, NGS – next-generation sequencing, ARMS – amplification refractory mutation systém, BEAMing – beads, emulsion, amplification and magnetic, TAM-sekvenování – tagged-amplicon deep sequencing

v metastázách a v ctDNA. Sekvenování ctDNA umožnilo sledovat vývoj nádorových buněk při vznikající rezistenci k terapii a bylo využito k identifikaci *de novo* mutací vznikajících v důsledku aplikované protinádorové terapie [32].

Na sekvenování specifických genomových oblastí v plazmové DNA byly využity varianty cíleného hloubkového sekvenování: TAM-seq (tagged-amplicon deep sequencing) [33], Safe-Seq [34] nebo CAPP-Seq (capture-based sequencing) [24]. Detekovat lze v ctDNA také chromozomální přestavby, jako jsou translokace nebo ztráta či získání chromozomálních regionů, což představuje vysoce specifickou a senzitivní metodu pro detekci nádorové DNA [35]. V některých případech byla metoda celogenomového sekvenování aplikována přímo na analýzu DNA obsažené v plazmě a poskytla informace o somatických mutacích a změnách v počtu kopií cílových genů v rámci celého genomu [36,37].

S dalším zvyšováním citlivosti metod založených na analýze celého genomu budou technologie NGS hrát zřejmě klíčovou roli v analýze ctDNA a jejím využitím v klinické praxi.

Závěr

Analýzy nádorového onemocnění založené na tkáňové biopsii a zobrazovacích metodách by mohly být v dohledné

době vhodně doplňovány také analýzou ctDNA. Tato metoda přináší řadu výhod, např. možnost častého odběru vzorků, detekce mutací v buňkách pocházejících z různých oblastí primárního nádoru i metastáz, monitorování vývoje a predikce odpovědi na léčbu. Před jejím zavedením do klinické praxe však musí být ještě optimalizovány a zavedeny standardizované postupy odběru a uchování krevních vzorků, stejně tak zvoleny nejvhodnější metody pro izolaci ctDNA a analýzu vyskytujících se mutací. Zintenzivnění výzkumu a rostoucí počet publikací v posledních letech naznačuje, že je tato metoda považována za nadějnou a přínosnou, a snad se tedy stane dalším nástrojem zvyšujícím šance pacientů v boji proti nádorovému onemocnění.

Literatura

1. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc Biol Fil 1948; 142(3–4): 241–243.
2. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res 1977; 37(3): 646–650.
3. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. Br J Haematol 1994; 86(4): 774–779.
4. Stroun M, Anker P, Lyautey J et al. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. Eur J Cancer Clin Oncol 1987; 23(6): 707–712.
5. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. Clin Chim Acta 2001; 313(1–2): 139–142.

6. Lipson EJ, Velculescu VE, Pritchard TS, et al. Circulating tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade. *J Immunother Cancer* 2014; 2(1): 42. doi: 10.1186/s40425-014-0042-0.
7. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6(224): 224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
8. Hamakawa T, Kukita Y, Kurokawa Y et al. Monitoring gastric cancer progression with circulating tumour DNA. *Br J Cancer* 2015; 112(2): 352–356. doi: 10.1038/bjc.2014.609.
9. Gonzalez-Masia JA, Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 819–832. doi: 10.2147/OTT.S44668.
10. Yong E. Cancer biomarkers: written in blood. *Nature* 2014; 511(7511): 524–526. doi: 10.1038/511524a.
11. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366(10): 883–892. doi: 10.1056/NEJMoa1113205.
12. Jacobs EL, Haskell CM. Clinical use of tumor markers in oncology. *Curr Probl Cancer* 1991; 15(6): 299–360.
13. Djavan B, Keffer JH, Molberg K et al. False-positive serum prostate-specific antigen values in a patient with non-Hodgkin lymphoma of the kidney. *Urology* 1995; 45(5): 875–878.
14. Wood LD, Parsons DW, Jones S et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007; 318(5853): 1108–1113.
15. Diehl F, Schmidt K, Choti MA et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14(9): 985–990. doi: 10.1038/nm.1789.
16. Levy M, Benesova L, Lipska L et al. Utility of cell-free tumour DNA for post-surgical follow-up of colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2012; 32(5): 1621–1626.
17. Gadgil SM, Cote ML, Schwartz AG et al. Parameters for individualizing systemic therapy in non-small cell lung cancer. *Drug Resist Updat* 2010; 13(6): 196–204. doi: 10.1016/j.drug.2010.10.001.
18. Rosell R, Vergnenegre A, Liu B et al. Biomarkers in lung oncology. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23(6): 508–514.
19. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013; 497(7447): 108–112. doi: 10.1038/nature12065.
20. Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486(7404): 537–540. doi: 10.1038/nature11219.
21. Mack PC, Holland WS, Burich RA et al. EGFR mutations detected in plasma are associated with patient outcomes in erlotinib plus docetaxel-treated non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009; 4(12): 1466–1472. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181bbf239.
22. Board RE, Wardley AM, Dixon JM et al. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120(2): 461–467. doi: 10.1007/s10549-010-0747-9.
23. Rothe F, Laes JF, Lambrechts D et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Ann Oncol* 2014; 25(10): 1959–1965. doi: 10.1093/annonc/mtu288.
24. Newman AM, Bratman SV, To J et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014; 20(5): 548–554. doi: 10.1038/nm.3519.
25. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev* 2002; 28(5): 255–271.
26. Lee TH, Montalvo L, Chrebtov V et al. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 2001; 41(2): 276–282.
27. Rolfo C, Castiglia M, Hong D et al. Liquid biopsies in lung cancer: the new ambrosia of researchers. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1846(2): 539–546.
28. Hrstka R, Kolarova T, Michalova E et al. Development of PCR methods and their applications in oncological research and practice. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S69–S74. doi: 10.14735/amko20141569.
29. Wang J, Ramakrishnan R, Tang Z et al. Quantifying EGFR alterations in the lung cancer genome with nanofluidic digital PCR arrays. *Clin Chem* 2010; 56(4): 623–632. doi: 10.1373/clinchem.2009.134973.
30. Diehl F, Li M, Dressman D et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(45): 16368–16373.
31. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S et al. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res* 2014; 20(17): 4613–4624. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3063.
32. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol* 2014; 25(9): 1729–1735. doi: 10.1093/annonc/mtu239.
33. Forsheew T, Murtaza M, Parkinson C et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 2012; 4(136): 136ra68. doi: 10.1126/scitranslmed.3003726.
34. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(23): 9530–9535. doi: 10.1073/pnas.1105422108.
35. Shaw JA, Page K, Blighe K et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome Res* 2012; 22(2): 220–231. doi: 10.1101/gr.123497.111.
36. Heitzer E, Ulz P, Belic J et al. Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med* 2013; 5(4): 30. doi: 10.1186/gm434.
37. Leary RJ, Sausen M, Kinde I et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* 2012; 4(162): 162ra154. doi: 10.1126/scitranslmed.3004742.
38. Kopreski MS, Benko FA, Borys DJ et al. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(11): 918–923.
39. Morgan SR, Whiteley J, Donald E et al. Comparison of KRAS mutation assessment in tumor DNA and circulating free DNA in plasma and serum samples. *Clin Med Insights Pathol* 2012; 5: 15–22. doi: 10.4137/CPATH.S8798.
40. Leary RJ, Kinde I, Diehl F et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Sci Transl Med* 2010; 2(20): 20ra14. doi: 10.1126/scitranslmed.3000702.
41. Chen Z, Feng J, Buzin CH et al. Analysis of cancer mutation signatures in blood by a novel ultra-sensitive assay: monitoring of therapy or recurrence in non-metastatic breast cancer. *PLoS One* 2009; 4(9): e7220. doi: 10.1371/journal.pone.0007220.
42. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; 368(13): 1199–1209. doi: 10.1056/NEJMoa1213261.
43. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E et al. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res* 2012; 18(12): 3462–3469. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2696.
44. Yung TK, Chan KC, Mok TS et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15(6): 2076–2084. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2622.
45. Carreira S, Romanel A, Goodall J et al. Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. *Sci Transl Med* 2014; 6(254): 254ra125. doi: 10.1126/scitranslmed.3009448.
46. National Human Genome Research Institute. [homepage on the Internet]. Available from: <http://www.genome.gov/dmd/img.cfm?node=Photos/Graphics&id=92951>.

Adenovírusové vektory v génovej terapii

Adenoviral Vectors in Gene Therapy

Pjechová M.¹, Hernychová L.¹, Tomašec P.^{1,2}, Wilkinson G. W.^{1,2}, Vojtěšek B.¹

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Department of Medical Microbiology, Institute of Infection and Immunity, School of Medicine, Cardiff University, United Kingdom

Súhrn

Tento článok je zameraný na génovú terapiu, špeciálne na adenovírusové vektory a ich vzťah k imunitnej odpovedi. Adenovírusové vektory patria k najviac využívaným nosičom genetického materiálu pri génovej terapii, štúdiu exprese génov či imunoterapii. Dôležitou otázkou pri *in vivo* používaní je ich vplyv na organizmus. Štúdium ich imunomodulačných vlastností je preto veľmi významná oblasť výskumu, vďaka ktorej je možné adenovírusové vektory progresívne upravovať a tak zefektívniť ich potenciál pre využitie v praxi.

Kľúčové slová

génová terapia – adenoviridae – imunitný systém

Summary

This review is focused on gene therapy, especially adenovirus vectors and their relationship with the immune system response. Adenovirus vectors belong to the most used gene delivery vehicles in gene therapy, study of gene expression or immunotherapy. One of the most important questions concerning their use is their influence on organism *in vivo*. Study of immunomodulating properties of the adenovirus vectors opens a way for further manipulation and their more effective practical use.

Key words

gene therapy – adenoviridae – immune system

Práca bola podporená Európskym fondom pre regionálny rozvoj a štátnym rozpočtom Českej republiky (OP VaVpl – RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projektom MŠMT – NPU I – LO1413 a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), by the project MEYS – NPS I – LO1413 and by (MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Mariana Pjechová
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: mariana.pjechova@mou.cz

Obdržané/Submitted: 2. 4. 2015

Prijaté/Accepted: 20. 7. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152575>

Úvod

Génová terapia ako horizontálny prenos génov bola prvýkrát skoncipovaná v 70. rokoch minulého storočia s nástupom technologických možností vnášania genetického materiálu do eukaryotických buniek [1]. „Prísna“ génová terapia je založená na koncepte nahradenia defektného génu vnesením a integráciou jeho funkčnej verzie. Z tohto dôvodu bola génová terapia vyvíjaná hlavne voči genetickým chorobám spôsobeným deficienciou jedného génu [2], ako napr. recesívne enzymatické poruchy. Avšak v dôsledku mnohých genetických abnormalít, simultánnych porúch viacerých génov pri vzniku tumorov nie je možné aplikovať prísnu génovú terapiu pri liečbe rakovinových ochorení. Preto sa génová terapia rakovinových ochorení sústreďuje najmä na vnesenie genetického materiálu s terapeutickými účinkami do tumoru, na zničenie rakovinových buniek a posilnenie imunitnej odpovede voči nim [3]. Hlavnými študovanými prístupmi v génovej terapii určenej na liečbu nádorových ochorení sú:

1. Vnesenie „samovražedného génu“ na konvertovanie pro-liečiva v tumore na liečivo a následné usmrtenie nádorových buniek. V klinických štúdiách sa

testuje napr. tymidín kináza herpes simplex vírusu (HSV-tk), ktorá fosforyluje gancyklovir, čo vedie k terminácii DNA syntézy [4].

2. Vnesenie imunomodulátorov, cytokinových génov na prítiahnutie a aktiváciu imunitných buniek. Príkladom je adenovírusový vektor nesúci TNF- α , pod kontrolou chemoradiačne indukčného promotora, ktorý je súčasťou klinických štúdií [5].

3. Vnesenie tumor-supresorových génov na naprogramovanie apoptózy v tumorových bunkách, ako napr. adenovírusový vektor nesúci gén *TP53*, ktorý sa testuje v klinických štúdiách (pokročilá rakovina ústnej dutiny) [6].

4. Vnesenie onkolytických vírusov špecificky lyzujúcich tumorové bunky. V klinických štúdiách II. fázy bol na liečbu metastatického malígneho melanómu použitý OncoVex – onkolytický herpes simplex vírus kódujúci stimulujúci faktor pre granulocyty/makrofágy (GM-CSF) [7].

5. Vnesenie microRNA (miRNA), slúžiacich na umlčanie cieľových génov, napr. onkogénov [3,8]. V súvislosti s vylepšovaním onkolytických vírusov sa experimentálne testuje aj miRNA, ktorá sa používa na prevenciu replikácie vírusu v zdravých bunkách [9].

Typy vektorov

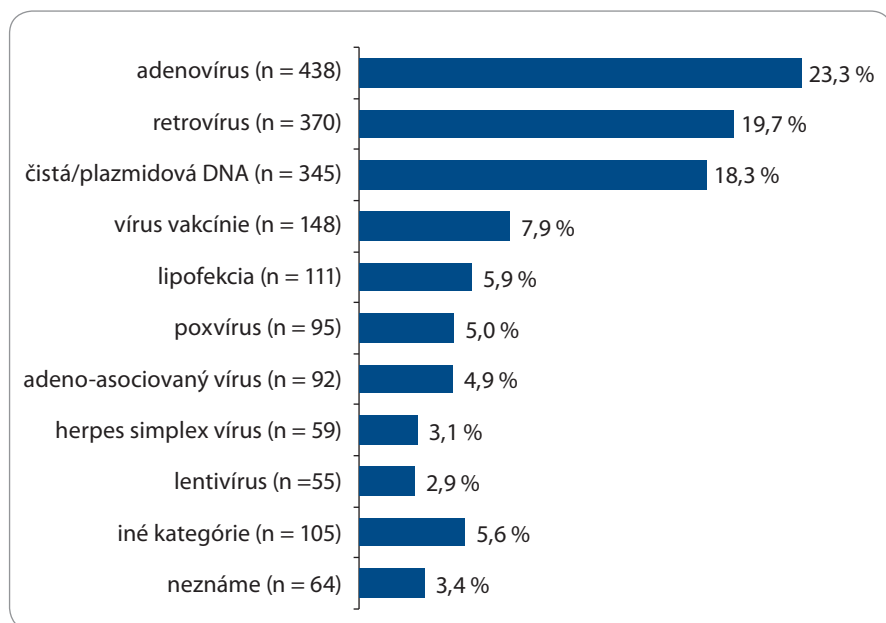
Efektivita génovej terapie v značnej miere závisí od voľby vektora. Vo všeobecnosti môžeme vektory používané pri génovej terapii rozdeliť na dve hlavné skupiny: vírusové a nevírusové. Vírusy si evolúciou vyvinuli efektívny spôsob infikovania buniek, narušenia bunkovej obrany a expresie ich génov v bunkách. Tieto ich prirodzené vlastnosti boli využité a upravené genetickým inžinierstvom na veľmi výkonné systémy na vnesenie cudzorodých génov pomocou vírusov do buniek, tzv. transdukcii buniek. Nevírusové vektory sú atraktívnou alternatívou k vírusovým vektorom vďaka ich bezpečnosti, univerzálnosti a ľahkej príprave. Môžeme ich rozdeliť na štyri hlavné skupiny: čistá DNA, lipozómy, syntetické polyméry a nanočastice. Hlavnou nevýhodou všetkých štyroch skupín je však veľmi nízka efektivita transfekcie *in vivo*. V tomto článku sa budeme venovať vírusovým vektorom, hlavne adenovírusovým vektorom, ktoré boli podľa Ginn et al (2012) celosvetovo najviac využívanými génovými vektormi v klinických štúdiách (graf 1) [10].

Vírusové vektory

Vírusové vektory sa podľa mechanizmu ich pôsobenia rozdeľujú na onkolytické vírusy a replikačno-deficientné vírusové vektory.

Onkolytické vírusy

Onkolytické vírusy sú replikačno-kompetentné, čo znamená, že gény zodpovedné za ich replikáciu sú zachované, čo je hlavný rozdiel oproti replikačno-deficientným vírusovým vektorom. Terapeutické využitie onkolytických vírusov je založené na selektívnej efektivite ich replikácie v nádorových bunkách. Každý vírus má špecifický bunkový tropizmus, ktorý determinuje, aký typ buniek bude daný vírus infikovať (rabies – infikuje a ničí neuróny, hepatitída B – hepatocyty). Mnohé vírusy majú preferenčný, avšak nie exkluzívny tropizmus k nádorovým bunkám. Pravdepodobne je to dôsledok tumorovej biológie, keďže mnoho tumorov sa vyvíja detekcií a deštrukcií imunitným systémom a majú tiež porušené apoptotické mechanizmy a translačnú supre-



Graf 1. Vektory používané v klinických štúdiách s génovou terapiou do roku 2012 podľa Ginn et al.

Prevzaté z [10].

siu, čo sú kľúčové odpovede, ktoré využívajú zdravé bunky na potlačenie vírusovej infekcie. Onkolytické vírusy môžu taktiež využívať zmeny v metabolizme a bunkovom cykle tumorových buniek [11]. Schopnosť onkolytických vírusov usmrtiť nádorové bunky sa nazýva vírusová onkolýza. Onkolytické vírusy môžu zničiť infikované nádorové bunky mnohými spôsobmi – od priamej vírusovo-sprostredkovanej cytotoxicity až po množstvo indukovaných imunitných mechanizmov. Hlavné typy onkolytických vírusov sú: podmienene replikatívne adenovírusy, herpes simplex vírus 1, 2 (HSV-1, HSV-2) a variant vírusu osýpok [8]. Ďalším používaným vektorom je vírus vakcínie, pričom je zaujímavé, že niektoré jeho kmene majú prirodzený tropizmus k tumorovým bunkám (1 000–10 000-krát vyššia expresia vírusu než v iných tkanivách). V tejto súvislosti sa tiež študujú Sindbis vírus, reovírusy, parvovírusy a myxomavírusy [12]. Replikačno-kompetentné vírusy môžu byť ďalej modifikované a exprimovať transgén tzv. armed oncolytic viruses. Prikladom je OncoVex, onkolytický herpes simplex vírus kódujúci stimulujúci faktor pre granulocyty/makrofágy (GM-CSF) [7]. Niektoré onkolytické vírusy (napr. onkolytické formy atenuovaného vírusu vakcínie, onkolytický herpes simplex vírus oHSV G47Δ, adenovírus ONYX-015) sa využívajú aj v kombinácii s tradičnou rádioterapiou a chemoterapiou, kde bolo preukázané ich synergické pôsobenie [13–15].

Replikačno-deficientné vírusové vektory

Pri replikačno-deficientných vírusových vektoroch sú gény zodpovedné za ich replikáciu odstránené, resp. vymenené za transgén, čo znamená, že sú schopné replikácie iba v špecializovaných pomocných bunkových líniiach, ktoré tieto gény obsahujú. Medzi najviac využívané vírusové vektory patria replikačno-deficientné adenovírusové vektory, retrovírusové vektory a adeno-asociované vírusové vektory, závislé na adenovíruse alebo herpes simplex víruse, ktorý umožní dokončiť ich životný cyklus. Taktiež sa používajú vektory odvodené od HSV-1 a simian vírusu 40 (SV40) [8].

Replikačno-deficientné adenovírusové vektory

Adenovírus je neobalený vírus ikosaédrového tvaru s priemerom 60–90 nm a lineárnou dvojvláknovou DNA o veľkosti 30–40 kb [16,17]. Pri transkripcii sa ako prvý exprimuje gén E1A kódujúci transaktivátor pre transkripciu skorých génov E1B, E2A, E2B, E3 a E4, rovnako spolu s E1B pôsobí pri bunkovej transformácii (obr. 1). Genómový región E2 kóduje proteíny potrebné pre DNA replikáciu: DNA polymerázu, DNA-viažuci proteín a prekursor terminálneho proteínu. Genómový región E3 kóduje produkty na moduláciu bunkových receptorov. Genómový región E4 má regulačnú funkciu, blokuje skorú a spúšťa neskorú transkripciu. Taktiež obsahuje gény, ktoré sú zodpovedné za aktivovanie imunomodulátorov. Jadrové a kapsidové proteíny a cysteínové proteázy potrebné na proteolytické zostrihnutie terminálneho proteínu ako aj ďalšie štruktúrne proteíny sú exprimované zo spoločného hlavného neskorého promotora [18].

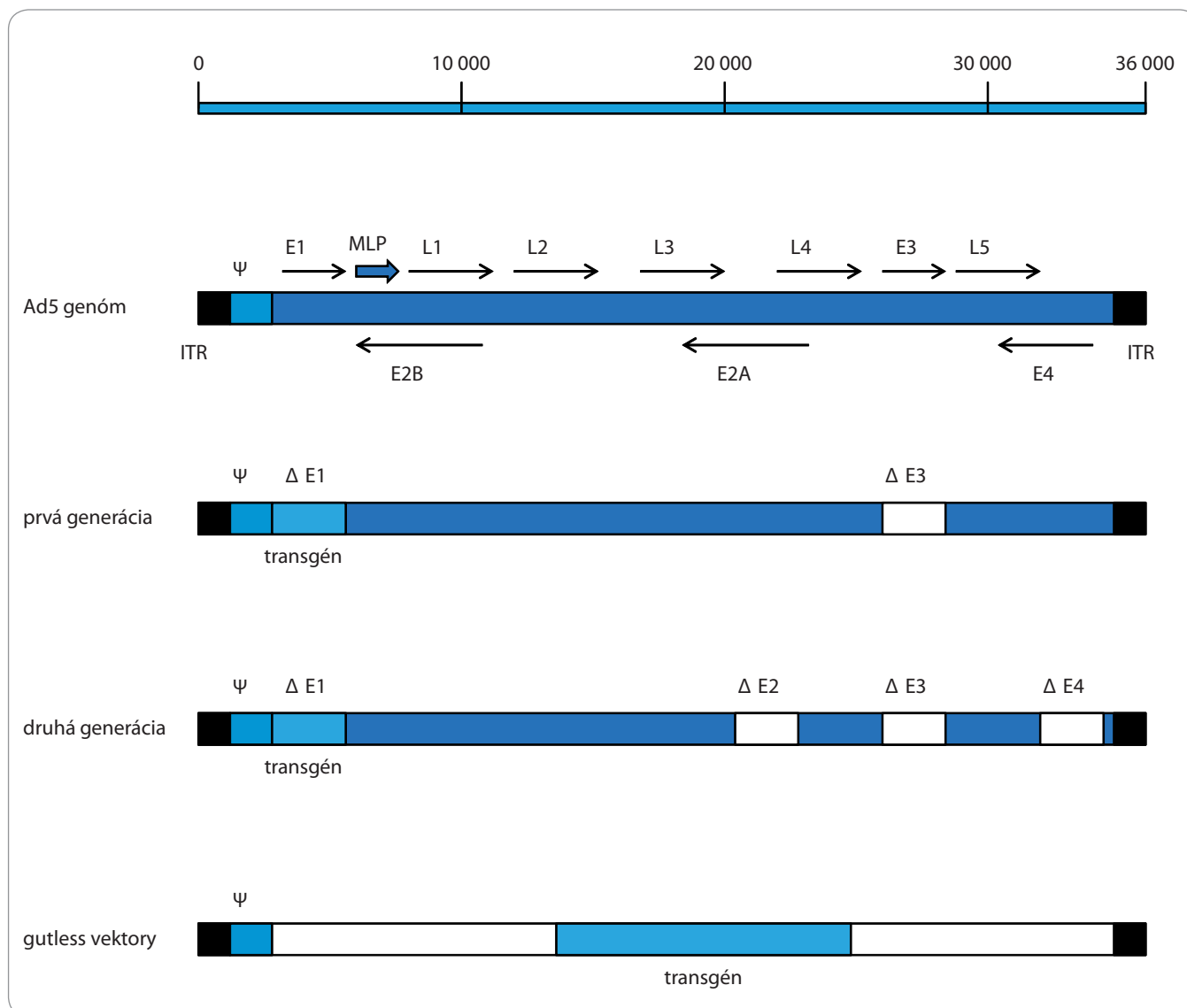
Spomedzi viac než 50 rôznych sérotypov ľudských adenovírusov je pre génovú terapiu najviac využívaný sérotyp 5 (Ad5). Pre človeka je málo patogénny, spôsobuje napr. mierne akútne respiračné infekcie. Aj napriek tomu majú Ad vektory dobrý bezpečnostný profil a môžu byť produkované vo veľkých množstvách, neintegrujú sa do bunkového genómu, majú vysokú transduktivitu *in vivo* a transdukovujú deliace i nedeliace sa bunky [8,18]. V súvislosti s ich vývojom rozoznávame tri hlavné skupiny: tzv. adenovírusové vektory prvej a druhej generácie a „gutless“ vektory. Adenovírusové vektory prvej generácie sú založené na princípe delécie E1 a E3 regiónu. Keďže funkcia E1 regiónu je pre replikáciu vírusu nevyhnutná, musí byť zastúpená v bunkových líniiach, napr. ľudských embryonálnych bunkách obličiek 293 (human embryonic kidney – HEK 293) alebo ľudských embryonálnych retinoblastov 911 (human embryonic retinoblasts – HER 911). Adenovírusové vektory druhej generácie obsahujú ďalšie delécie E2 a/alebo E4 regiónu, čím znižujú alebo eliminujú expresiu vírusových proteínov,

zlepšujú stálosť exprese transgénu a podľa niektorých štúdií znižujú imunitnú odpoveď organizmu [17]. Gutless vektory dokážu niesť až 36 kb DNA. Sú zbavené všetkých kódujúcich regiónov (okrem 5' a 3' ITRs a zbalovacieho signálu Ψ) a na dokončenie svojho replikačného cyklu potrebujú pomocný adenovírus, ktorý nesie všetky kódujúce regióny. Preto sú nazývané aj helper-dependent adenovíruses. Zbalovací signál pomocného adenovírusu je odstránený (napr. pomocou Cre loxP systému), čím sa zabráni vytvoreniu pomocných adenovírusových častíc [19].

Adenovírusový vektor prvej generácie pJM17 bol vyvinutý Frankom Grahamom v roku 1988 [20]. Má veľkosť 40,3 kb a obsahuje celú Ad5 DNA molekulu a pBRX inzert nesúci ampicilínovú a tetracyklínovú rezistenciu. Transgén sa včleňuje do E1 regiónu. Rekombinantné virióny sa vytvárajú homológnu rekombináciou po kotransfekcii tohto plazmidu s pomocným plazmidom obsahujúcim E1 región v bunkách HEK 293 [20].

Veľkým prelomom v manipulácii Ad vektorov bol systém AdEasy1. Je založený na umelom bakteriálnom chromozóme (BAC), odvodený od Ad5 s deléciou E1 a E3 regiónov. Na včlenenie transgénu sa využíva homológna rekombinácia s pomocným plazmidom nesúcim transgén v baktériách *E. coli*. Veľkosť transgénu je do 10 kb, pričom je možné produkovať viacero transgénov z jedného vektora. Prítomnosť génu pre rezistenciu na antibiotikum kanamycín zabezpečuje ľahkú identifikáciu rekombinantov (BAC s transgénom). Rekombinantné BAC sú linearizované prídanim enzýmu *PmeI* a následne vnesené do adenovírusových pomocných buniek HER 911 alebo HEK 293, ktoré obsahujú E1 región umožňujúci replikáciu vírusu. Vektor môže obsahovať zelený fluorescenčný proteín (green fluorescent protein – GFP), čo dovoľuje priamu kontrolu efektivity infekcie [21].

Oveľa jednoduchší a modernejší je adenovírusový systém AdZ (Ad with zero cloning steps – adenovírusový vektor bez klonovacích krokov). Bol vyvinutý neskôr než AdEasy1 a v porovnaní s týmto systémom obsahuje viacero vylepšení. AdZ je vektor odvodený od



Obr. 1. Mapa genómu adenovírusu (sérotyp 5) a rôznych generácií adenovírusových vektorov.

Skoré transkripty sú znázornené ako E1–E4 regióny a neskoré transkripty ako L1–L5 regióny.

MLP – hlavný neskorý promótor, ψ – zbaľovací signál

Prevzaté z [19].

Ad5 s deléciou E1 a E3 regiónov, vložený v umelom jednokópiovom BAC v baktériách *E. coli* (kmeň SW102), čo umožňuje priame vloženie transgénu (ako PCR fragment) do buniek *E. coli*, teda bez pomocného plazmidu. Rekombinácia prebieha na základe teplotne-kontrolovaného λ fágového systému. Tento systém obsahuje endonukleázu *I-SceI*, ktorá zabezpečuje jeho linearizáciu po transfekcii do pomocných buniek. Transgénu môžu byť exprimované v natívnej forme alebo so streptavidínovým V5 alebo GFP tagom. AdZ obsahuje aj tetracyklínový

operátor, vďaka ktorému je možné umlčať expresiu transgénu [22].

Imunitná odpoveď na adenovírusové vektory

Mechanizmy prirodzenej imunity odpovedajú na vírusovú infekciu ako prvé. Adenovírusový kapsid interaguje so zložkami klasickej, alternatívnej a lektínovej komplementovej dráhy, čo má za následok aktiváciu komplementu v prítomnosti už existujúcich anti-adenovírusových protilátok (po prekonanej infekcii spôsobenej adenovírusom), ako aj bez

nich. U Ad séropozitívnych pacientov, ktorí prijímajú vysoké dávky Ad vektora, tak vzniká riziko silnej komplementovej aktivácie, ktorá môže viesť až k život ohrozujúcej systémovej odpovedi [23].

V skorej odpovedi prirodzenej imunity na infekciu zohrávajú dôležitú úlohu toll like receptory (TLR) prítomné na povrchu mnohých imunitných buniek, vrátane dendritických buniek a makrofágov. Tieto molekuly rozpoznávajú vysoko konzervované mikrobiálne štruktúry pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), ako napr. peptidoglykán

a lipopolisacharid. Adenovírusovo-asociované molekulárne motívy rozoznávajú receptory TLR2 a TLR9. Ich stimulácia iniciuje signálne dráhy MAPK a NF- κ B vedúce k indukcii prozápalovej cytokínovej a chemokínovej odpovede. Medzi cytokíny a chemokíny exprimované po podaní Ad vektorov patria interleukín (IL)-6, IL-8, IL-12, TNF- α , interferón γ a λ , interferón indukibilný proteín 10, makrofágový zápalový proteín (MIP) 1 β a MIP2 [24,25].

Infekcia buniek vírusmi, ale aj vírusovými vektormi spúšťa signálne dráhy indukujúce produkciu molekúl, ktoré aktivujú imunitný systém. Bunkové rozpoznanie adenovírusu cez kapsidové komponenty je regulované pomocou týchto molekúl: coxackie-adenovírus receptor (CAR), membránový kofaktorový proteín (membrane cofactor protein) CD46, integríny a heparán sulfát – obsahujúce proteoglykány. Antivírusová vrodená imunitná odpoveď iniciovaná infikovanou bunkou aktivuje interferónovú odpoveď na zablokovanie vírusovej replikácie, pričom simultánne produkuje chemokíny na prítiahnutie neutrofilov a NK buniek [26].

Heterogénna populácia NK buniek je schopná rozoznať a usmrtiť predovšetkým nádorové a vírusmi infikované bunky. NK bunka na svojom povrchu exprimuje mozaiku inhibičných a aktivujúcich receptorov. Príkladom je receptor NKG2D, ktorý rozoznáva min. 7 ligandov (príbuzné polypeptidové sekvencie k MHC triedy I). Tieto ligandy môžu byť nadexprimované u buniek vystavených stresu, napr. infekcii (vírusová, bakteriálna), tepelnému šoku alebo poškodeniu DNA [27]. Po ich rozpoznaní NK bunka spúšťa deštrukciu cieľovej bunky pomocou proteínov ako perforíny a granzýmy, ktoré sú prítomné v granulách v jej cytoplazme. Obsah granúl sa vyleje do priestoru synapsie medzi NK bunkou a cieľovou bunkou. Perforíny vytvárajú póry v membráne cieľovej bunky a granzýmy prechádzajú do vnútra cieľovej bunky, kde indukciou kaspáz iniciujú apoptotický proces. Tento jav bol popísaný aj v prípade infekcie adenovírusovými vektormi AdEasy1, kde bolo zistené zvýšenie expresie MICA antigénov (ligand pre NKG2D, príbuzná polypepti-

dová sekvencia k MHC triedy I) [27]. V prípade génovej terapie, ktorej cieľom je expresia transgénu, môže byť takýto scenár nežiadúci. Na zamedzenie tohto procesu sú vo vývoji adenovírusové vektory s ďalšími modifikáciami, ktorých úlohou je predísť aktivácii signálnych dráh vedúcich k aktivácii imunitného systému. Jednou z možností modifikácií je manipulovanie regiónom E4 namiesto jeho úplnej delécie, ktorá spôsobuje ťažkosti pri príprave vektorov druhej generácie a gutless vektorov, a tým obmedzuje ich použitie v praxi. Naopak manipulácia E4 regiónom má znížiť aktiváciu imunitného systému, pričom vitalita vírusu zostáva zachovaná.

Adaptívna imunitná odpoveď na vírusovú infekciu je spojená s T a B bunkami imunitného systému. Adenovírusovo špecifické T cytotoxické bunky (CD8+, CTLs) rozoznávajú vírusový antigén v komplexe s molekulou MHC class I na povrchu infikovanej bunky, čo vedie k uvoľneniu perforínu a následnej lýze infikovanej bunky. CD4+ pomocné T bunky sú aktivované vírusovým antigénom v komplexe s molekulou MHC class II na povrchu antigén prezentujúcich buniek. Po aktivácii začnú produkovať cytokíny a stimulovať proliferáciu B buniek [28].

B bunky zabezpečujú humorálnu odpoveď, čo je jeden z kľúčových komponentov imunitnej odpovede. Produkcia protilátok závisí od schopnosti B buniek rozpoznať špecifický epitop na cudzom antigéne. V súvislosti s humorálnou imunitnou odpoveďou je potrebné spomenúť, že ľudská populácia je vystavená adenovírusom a adeno-asociovaným vírusom a väčšina ľudí má k týmto vírusom protilátky. Ich prítomnosť môže negatívne ovplyvniť úspešnosť génovej terapie založenej na adenovírusoch a adeno-asociovaných vírusoch. Jedným zo spôsobov, ako sa vyhnúť už prítomným anti-adenovírusovým protilátkam, je využitie alternatívnych sérotypov vírusu (namiesto sérotypu 5), ako napr. adenovírus 2 a 7. Taktiež sa vyvíjajú vektorové systémy s využitím zvieracích (psích, prasacích, šimpanzích) adenovírusov [29,30]. Tieto prístupy tiež riešia problém s pamäťovými B bunkami, u ktorých sa produkcia

anti-adenovírusových protilátok nedá zablokovať.

Adenovírusové vektory v klinických štúdiách

V roku 1993 podstúpil génovú terapiu pomocou Ad vektora prvý pacient. Odvtedy do roku 2012 bolo uskutočnených dokopy 438 klinických štúdií, v ktorých sa použili rôzne typy adenovírusových vektorov a 92 klinických štúdií, pri ktorých boli využité adeno-asociované vektory [10,18].

Adenovírusové vektory môžu byť aplikované systémovo alebo lokálne v závislosti od účelu terapie. Podávané sú intravenózne, subkutánne alebo intradermálne, intramuskulárne a tiež respiračnou cestou [31]. Pri klinických štúdiách je táto terapia celkovo dobre tolerovaná, medzi vedľajšie účinky použitia Ad vektorov patria mierna horúčka, lokálna bolesť, triaška a zimnica [32]. Avšak v roku 1999 18-ročný pacient s čiastočnou deficienciou ornitíntranskerbamylázy (OTC) zomrel po podaní veľmi vysokej dávky ($3,8 \times 10^{13}$ častíc) Ad vektora druhej generácie, ktorý niesol funkčný OTC gén. Príčinou jeho smrti bola Ad vektorom indukovaná prirodzená imunita, ktorá spôsobila akútne uvoľnenie zápalových mediátorov, čo viedlo k systémovému zápalu a multiorgánovému zlyhaniu [33]. Táto udalosť mala za následok reevaluáciu protokolov a sprísnenie podmienok na používanie Ad vektorov.

Podľa U.S. National Institutes of Health [34] je k 1. 3. 2015 v I. fáze klinických testov ukončených 49 štúdií s použitím adenovírusových vektorov, z ktorých 14 je zameraných na liečbu nádorových ochorení. V II. fáze je ukončených 18 štúdií, z ktorých deväť sa zaoberá liečbou rakovinových ochorení. V III. fáze je ukončená jedna štúdia zaoberajúca sa exprimovaním TNF- α , ktorý je pod kontrolou chemoradiácie indukibilného promotora, v tkanivách vystavených rádiácii pri rakovine pankreasu [5]. Novozačínajúcich štúdií (so statusom prijímajúci/ešte neprijímajúci dobrovoľníkov) I. fázy je 19, z čoho v šiestich prípadoch sa jedná o génovú terapiu určenú na liečbu nádorových ochorení, novozačínajúcich štúdií II. fázy je deväť,

pričom v piatich prípadoch ide o protinádorovú terapiu a v III. fáze je jedna no-vozačínajúca štúdia zameraná na liečbu nádorového ochorenia. Okrem využitia adenovírusových vektorov na liečbu nádorových ochorení sú vo vývoji a klinických skúškach aj adenovírusové vakcíny proti rôznym infekčným ochoreniam (HIV, ebola, malária, chrípka, tuberkulóza a i.) [34].

Záver

Génová terapia ponúka množstvo možností na liečbu nádorových ochorení. Využitie vírusových ako aj nevírusových systémov je efektívny spôsob na vniesenie genetického materiálu do buniek. Ďalšie štúdium vplyvov génovej terapie na organizmus a imunitný systém, najmä v prípade vírusových vektorov, nám dáva priestor na optimalizovanie jej účinkov a na ďalšie vylepšenia, vďaka ktorým by mohla byť rutinne používaná v klinickej praxi. V tejto súvislosti je nutné študovať vplyv vektorov na vnútrobunkové mechanizmy a následne zabezpečiť ich úpravu tak, aby sa minimalizovala imunitná odpoveď organizmu. U adenovírusových vektorov sa zdá byť sľubným postupom manipulácia regiónom E4, ktorý hrá dôležitú úlohu pri aktivácii imunomodulátorov. Ideálnym výsledkom tejto manipulácie by mal byť vektor, ktorý pri použití vyvoláva minimálnu imunitnú odpoveď organizmu a mohol by byť bežne používaný *in vivo*.

Literatúra

- Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? Science 1972; 175(4025): 949–955.
- Sheridan C. Gene therapy finds its niche. Nat Biotechnol 2011; 29(2): 121–128. doi: 10.1038/nbt.1769.
- Kwiatkowska A, Nandhu MS, Behera P et al. Strategies in gene therapy for glioblastoma. Cancers 2013; 5(4): 1271–1305. doi: 10.3390/cancers5041271.
- Zhao F, Tian J, An L et al. Prognostic utility of gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase for patients with high-grade malignant gliomas: a systematic review and meta analysis. J Neurooncol 2014; 118(2): 239–246. doi: 10.1007/s11060-014-1444-z.
- Herman JM, Wild AT, Wang H et al. Randomized phase III multi-institutional study of TNFerade biologic with fluorouracil and radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: final results. J Clin Oncol 2013; 31(7): 886–894. doi: 10.1200/JCO.2012.44.7516.
- Li Y, Li LJ, Wang LJ et al. Selective intra-arterial infusion of rAd-p53 with chemotherapy for advanced oral cancer: a randomized clinical trial. BMC Med 2014; 12: 16. doi: 10.1186/1741-7015-12-16.
- Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. J Clin Oncol 2009; 27(34): 5763–5771. doi: 10.1200/JCO.2009.24.3675.
- Fillat C, Jose A, Bofill-De Ros X et al. Pancreatic cancer gene therapy: from molecular targets to delivery systems. Cancers 2011; 3(1): 368–395. doi: 10.3390/cancers3010368.
- Leja J, Nilsson B, Yu D et al. Double-detargeted oncolytic adenovirus shows replication arrest in liver cells and retains neuroendocrine cell killing ability. PLoS One 2010; 5(1): e8916. doi: 10.1371/journal.pone.0008916.
- Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. J Gene Med 2013; 15(2): 65–77. doi: 10.1002/jgm.2698.
- Russell SJ, Peng KW, Bell J. Oncolytic virotherapy. Nat Biotechnol 2014; 30(7): 658–670. doi: 10.1038/nbt.2287.
- McCart JA, Ward JM, Lee J et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. Cancer Res 2001; 61(24): 8751–8757.
- Khuri FR, Nemunaitis J, Garly I et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. Nat Med 2000; 6(8): 879–885.
- Mansfield D, Pencavel T, Kyula JN et al. Oncolytic Vaccinia virus and radiotherapy in head and neck cancer. Oral Oncol 2013; 49(2): 108–118. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.07.019.
- Kanai R, Rabkin SD, Yip S et al. Oncolytic virus-mediated manipulation of DNA damage responses: synergy with chemotherapy in killing glioblastoma stem cells. J Natl Cancer Inst 2012; 104(1): 42–55. doi: 10.1093/jnci/djr509.
- Doerfler W, Boehm P (eds). The molecular repertoire of adenoviruses. Berlin: Springer 1995.
- Stewart PL. Adenovirus structure. In: Curiel DT, Douglas JT (eds). Adenoviral vectors for gene therapy. San Diego: Academic Press 2002: 1–18.
- Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. J Gene Med 2004; 6 (Suppl 1): S164–S171.
- Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. Gene Ther 2005; 12 (Suppl 1): S18–S27.
- McGrory WJ, Bautista DS, Graham FL. A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. Virology 1988; 163(2): 614–617.
- He T, Zhou S, da Costa LT et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(5): 2509–2514.
- Stanton RJ, McSharry BP, Armstrong M et al. Re-engineering adenovirus vector systems to enable high-throughput analyses of gene function. Biotechniques 2008; 45(6): 659–668.
- Jiang H, Wang Z, Serra D et al. Recombinant adenovirus vectors activate the alternative complement pathway, leading to the binding of human complement protein C3 independent of anti-ad antibodies. Mol Ther 2004; 10(6): 1140–1142.
- Appledorn DM, McBride A, Seregin S et al. Complex interaction with several arms of the complement system dictate innate and humoral immunity to adenoviral vectors. Gene Ther 2008; 15(24): 1606–1617. doi: 10.1038/gt.2008.114.
- Cerullo V, Seiler MP, Mane V et al. Toll-like receptor 9 triggers an innate immune response to helper-dependent adenoviral vectors. Mol Ther 2007; 15(2): 378–385.
- Chen RF, Lee CY. Adenoviruses types, cell receptors and local innate cytokines in adenovirus infection. Int Rev Immunol 2014; 33(1): 45–53. doi: 10.3109/08830185.2013.823420.
- Tomasec P, Wang EC, Groh V et al. Adenovirus vector delivery stimulates natural killer cell recognition. J Gen Virol 2007; 88(4): 1103–1108.
- Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. J Gen Virol 2000; 81(11): 2573–2604.
- Farina SF, Gao GP, Xiang ZQ et al. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. J Virol 2001; 75(23): 11603–11613.
- Kremer EJ, Boutin S, Chillon M et al. Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. J Virol 2000; 74(1): 505–512.
- Ahi YS, Bangari DS, Mittal SK. Adenoviral vector immunology: its implications and circumvention strategies. Curr Gene Ther 2011; 11(4): 307–320.
- Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. Oncologist 2002; 7(1): 46–59.
- Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N et al. A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial orthonine transcarbamylase deficiency. Hum Gene Ther 2002; 13(1): 163–175.
- Clinicaltrials.gov [homepage on the Internet]. U.S. National Institutes of Health, USA; [updated 2014 May, cited 2015 March 1]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=adenoviral+vector&recr=Open&no_unk=Y&phase=0.

Nádory u adolescentů

Cancer in Adolescents

Bajčiová V., Onderčová Z., Kodytková D.

Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

Souhrn

Zhoubné nádory u adolescentů (15–19 let) představují v současnosti závažný medicínský, psychologický, etický a ekonomický problém. Skupina pacientů ve věku dospívání byla dlouho na pokraji zájmu dětské onkologie a téměř zcela mimo zájem onkologie dospělého věku. Spektrum nádorů a jejich biologické vlastnosti i klinické chování jsou věkově specifické a odlišné od nádorů jiných věkových skupin. Incidence malignit v období adolescence má trvale stoupající trend. Výsledky léčby nádorů u adolescentů jsou horší než výsledky léčby u dětí mladších 15 let.

Klíčová slova

adolescenti – nádory – věkově specifické rozdíly – diagnostické problémy – léčebné možnosti

Summary

Cancer in adolescents (15 to 19 years) appears to be a serious medical, psychologic, ethical and economical problem as well. This group of patients has been languishing in the shadow of pediatric oncology and out of interest of adult oncology. Spectrum of types of tumors and their biological characteristics are age-specific and different from all other age groups. The overall incidence of cancer in adolescents is continuously increasing. Treatment results and outcome of adolescent cancer are worse compared with outcome in children with cancer younger than 15 years.

Key words

adolescents – cancer – age-specific differences – diagnostic challenges – therapeutic options

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101 and by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Viera Bajčiová, CSc.
Klinika dětské onkologie
LF MU a FN Brno
Černopolní 9
625 00 Brno
e-mail: vbajciov@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 17. 5. 2015
Přijato/Accepted: 22. 7. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152S81>

Úvod

I když dle demografických údajů populace v ČR stárne, je počet dospívajících ve věku 15–19 let v ČR kolem 670 000, tedy asi 7 % z celkové populace. Víc než v minulosti je u dnešní generace adolescentů vyhozen střet a nepoměr mezi biologickou zralostí a zralostí psychickou a sociální, což přináší řadu rizik a problémů moderního světa – antisociální

chování mladých lidí (abúzus alkoholu, kouření, drogy, gemblerství, sexuální promiskuita). Alarmujícím tempem stoupá u mladých lidí počet sebevražd.

Kromě těchto problémů jsou dospívající ohroženi celou řadou závažných onemocnění. Více než 12 % adolescentní populace žije s chronickým onemocněním. Do skupiny chronických nemocných se dnes řadí i pacienti s nádorovým onemocněním.

Charakteristika a specifika období dospívání

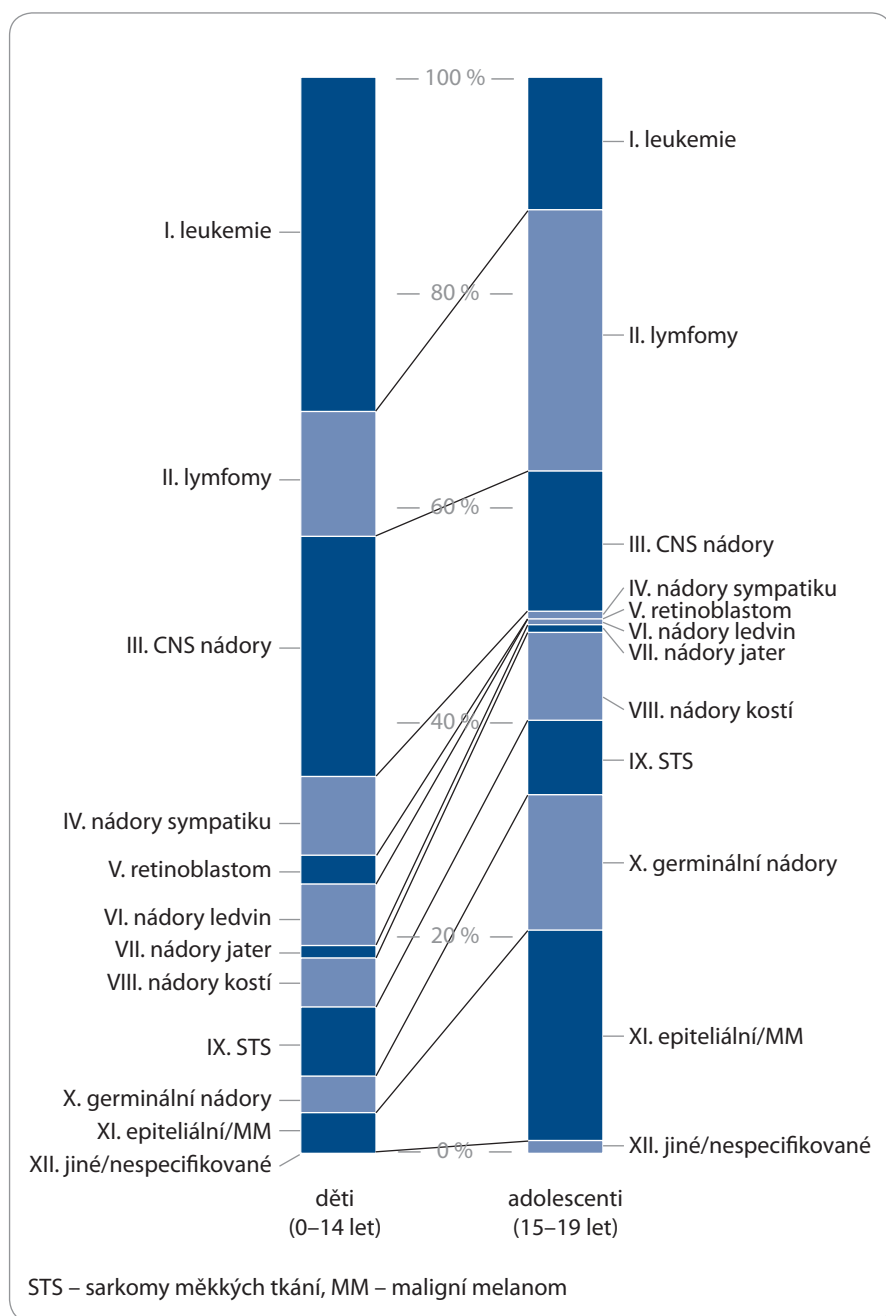
Období dospívání je období přechodu z věku dětského do věku dospělého, které není jednoznačně ohraničeno. Začátek dospívání je biologicky a medicínsky dán začátkem pohlavního zrání (objevení se sekundárních pohlavních znaků). Období pohlavního dozrávání (puberta) začíná v našich zeměpisných šířkách u dívek mezi 11. a 12. rokem, u chlapců mezi 13. a 14. rokem. Konec dospívání je v ČR určen legislativně dosažením 18. roku života. V medicíně pod pojmem adolescentní věk rozumíme věk 12–15 let (mladší adolescentní věk) a 15–19 let (starší adolescentní věk) [1,2].

V onkologii rozlišujeme onkologii dětského věku (tedy od narození do 15 let věku) a onkologii dospělého věku, tedy od 18 let výše. Je více jak zřejmé, že období dospívání mezi 15. a 18. (19.) rokem věku je někde „ztracené“ mezi dětmi a dospělými. Pod pojmem nádory adolescentů hodnotíme nádory u onkologických pacientů ve věku 15–19 let [2,3].

Období dospívání je velmi složité vývojové období charakterizované nejen změnami tělesnými, ale i metabolickými, psychickými a emočními se snahou o osamostatnění. Pro adolescenta je velmi významný fakt autonomie a nezávislosti s typickým nerespektováním autorit, řádů a norem. O to větší šok znamená v tomto citlivém období diagnóza maligního onemocnění. Psychosociální stránka péče o adolescenta (izolace od přátel a rodiny, změny tělesného vzhledu, uvědomění si akutního ohrožení života a strach ze smrti) je stejně důležitá jako samotná protinádorová léčba. Psychický stav pacienta výrazně ovlivňuje průběh a celkovou toleranci léčby. Fyziologické tělesné změny v průběhu puberty (změny metabolismu v době pubertálního růstu, hormonální aktivita, růstová aktivita, změny body mass indexu, změny objemové distribuce tukové tkáně) mohou ovlivnit efekt a toxicitu onkologické léčby (změny farmakokinetiky a biofarmakologické tolerance) [1,2,4–6].

Epidemiologie nádorů u dospívajících

V Evropě jsou údaje o incidenci nádorů u dětí do 15 let věku a rozdíly v in-



Graf 1. Relativní frekvence (%) 12 diagnostických skupin dle ICC (International Classification of Childhood Cancer) u dětí a adolescentů v Evropě.

Zdroj: [26].

cidenci dle jednotlivých regionů a států dobře dokumentovány. Ve srovnání s tím je podstatně méně informací o incidenci nádorů a celkové přežití (overall survival – OS) u adolescentů a mladých dospělých. V celé Evropě ze všech invazivních zhoubných nádorů v populaci méně než 0,3 % vyrůstá u dospívajících ve věku 15–19 let.

Výskyt nádorových nemocí u adolescentů má neustále stoupající trend, který v posledních letech předstihl incidenci nádorů v dětské populaci. Incidence maligních onemocnění u dospívajících je dvakrát vyšší než u 5–9letých dětí a až o 2/3 vyšší než u 10–14letých dětí. S postupujícím věkem se incidence nádorů zvyšuje. Celkový vzestup meziroční incidence zhoubných nádorů je kolem 1 % za rok, s výjimkou maligního melanomu a nádorů varlat u dospívajících, u kterých je meziroční vzestup incidence kolem 2–3,5 % za rok.

Věkově specifická incidence je založena na faktu, že incidence nádorů

roste exponenciálně s věkem. Adolescenti mají vyšší riziko rozvoje nádoru než děti do 15 let na základě předpokladu delší karcinogenní expozice faktorů zevního prostředí, stárnutí buněk a s tím spojených nitrobuňkových a genetických změn. Faktory zevního prostředí hrají pouze částečnou roli v etiologii a patogenezi nádorů u adolescentů, protože u dospívajících převažují nádory tzv. dětského typu.

Incidence nádorů u dospívajících ve věku 15–19 let v ČR se pohybuje kolem 15/100 000/rok. Celkem tedy v ČR onemocní maligním nádorem ročně kolem 350–400 mladých lidí ve věku 15–20 let [1–9].

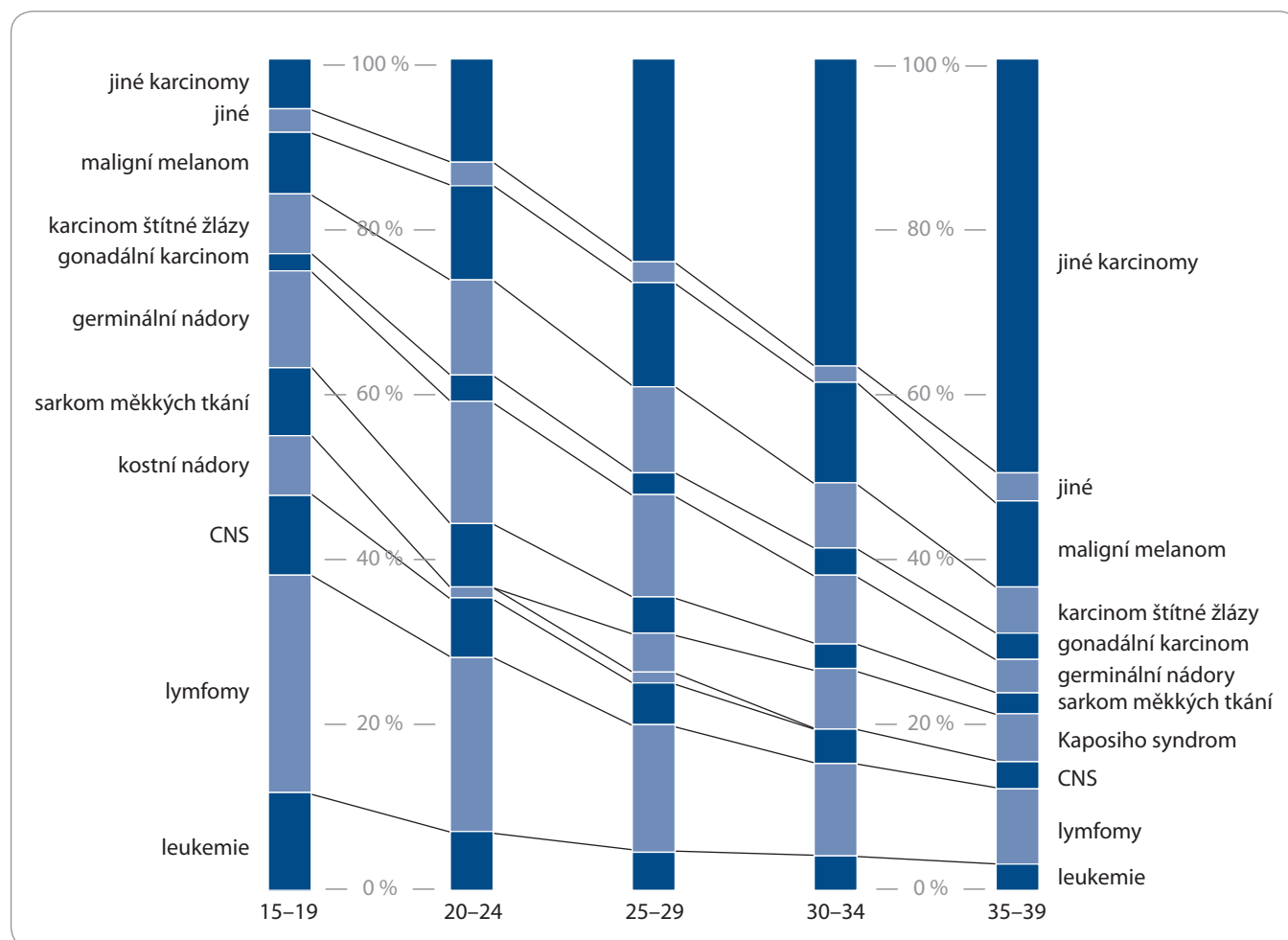
Dalším důležitým demografickým ukazatelem je rozbor příčin úmrtí u dospívajících. Nádory jsou v této věkové skupině na čtvrtém místě hned za úrazy, sebevraždami a vraždami a jsou tedy nejčastějším onemocněním vedoucím k smrti

u adolescentů [10]. OS adolescentů s maligním onemocněním v ČR je srovnatelné s OS v jiných státech Evropy [9].

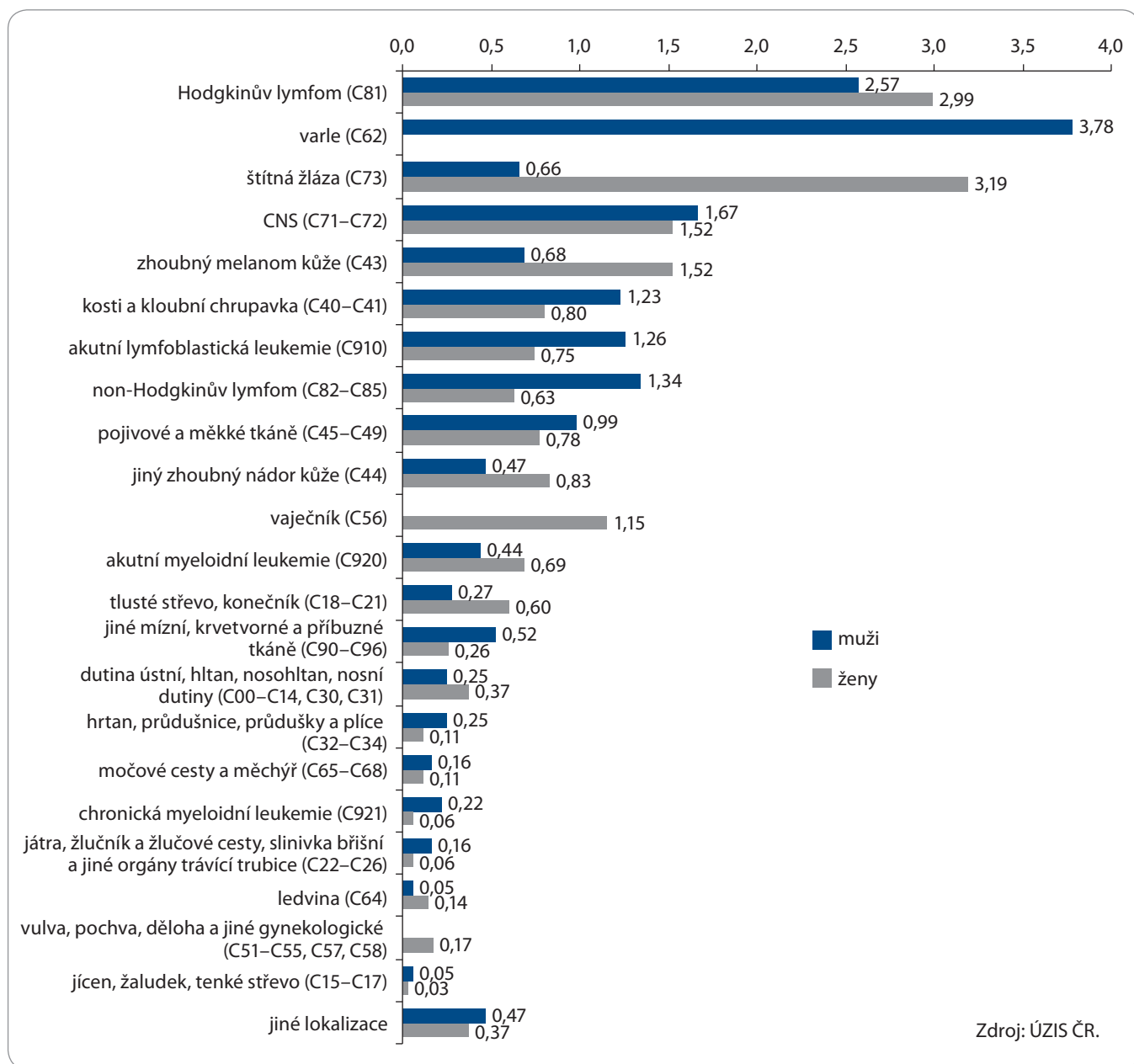
Specifika nádorů u dospívajících

Spektrum nádorů u dospívajících a jejich biologické vlastnosti jsou věkově specifické a významně se liší od spektra nádorů dětí mladších 15 let nebo od nádorů dospělé a starší populace. Epiteliální nádory (karcinomy), typické pro onkologii dospělých a starší věk, tvoří méně než 12 % ze všech nádorů u adolescentů (graf 1, 2). Etiopatogeneze karcinomů u dospívajících a spektrum patogenetických změn se s věkem mění [2,4,5,7,11].

Nádory embryonálního původu typické pro dětský věk (neuroblastom, nefroblastom, hepatoblastom, retinoblastom atd.) jsou u adolescentů spíše raritní, a pokud se vyskytnou, mají vý-



Graf 2. Distribuce typů nádorů dle věku v USA [10].



Graf 3. Incidence zhoubných nádorů u dospívajících (15–19 let) v období 2000–2010 v ČR.

razně agresivnější klinické chování a špatnou prognózu.

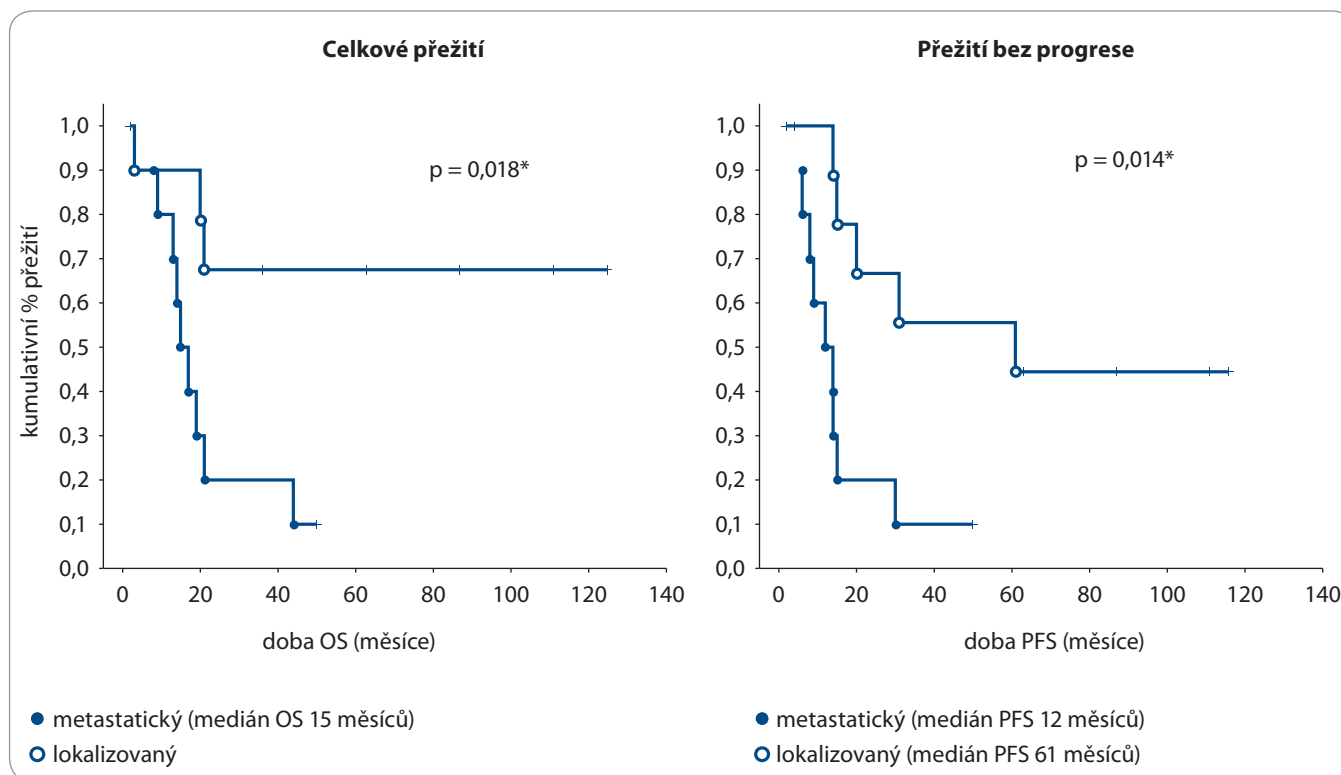
U dospívajících převažují maligní lymfomy (především Hodgkinův lymfom) s převahou u dívek, nádory varlat u chlapců a germinální nádory ovarií u dívek. Vrchol výskytu je u sarkomů kostí (osteosarkom, Ewingův sarkom), časté jsou rovněž sarkomy měkkých tkání (s převahou rhabdomyosarkomu) a nádory CNS. V posledních letech velmi prudce stoupá výskyt maligního melanomu (především kožní formy) s převahou u dívek (graf 3). Z karcinomů je

nejčastější karcinom štítné žlázy u dospívajících dívek. Karcinomy plic ve srovnání s dospělou populací jsou u dospívajících extrémně raritní. Na etiologii kolorektálního karcinomu u dospívajících se ve vyšší míře podílejí predispoziční hereditární syndromy spíše než dietetické návyky.

Srovnání klinických, epidemiologických, molekulárních a léčebných závěrů jasně prokazují rozdíly u nejčastějších zhoubných nádorů u adolescentů. Klinické výzkumy docházejí k závěru, že biologie nádorů u adolescentů je roz-

dílná ve srovnání s jinými věkovými skupinami, i když se dle histopatologie jedná o stejný typ nádoru. Rozdílné věkově specifické cytogenetické a molekulárně genetické studie dávají prostor k úvahám o rozdílné patogenezi, která se liší podle věku nositele. Jestli přijmeme hypotézu, že biologie maligních nádorů u adolescentů se liší dle věku pacienta, pak se zřejmě bude lišit i optimální léčebná strategie, speciálně v současnosti při rozvoji cílené biologické léčby [2,6,8,11,12].

Kromě biologie nádoru hraje svou roli i věkově specifická biologie hostitele.



Obr. 1. Délka OS a PFS u Ewingova sarkomu dle rozsahu nemoci.

Zdroj: Klinika dětské onkologie, FN Brno. OS – celkové přežití, PFS – přežití bez progresse

Dospívající jedinci jsou obvykle zdraví, na rozdíl od starší populace netrpí téměř žádnými komorbiditami. Důležité jsou rovněž fyziologické změny organismu v rámci puberty. Růstový spurt, vliv pohlavních hormonů, zrychlený metabolismus mohou měnit farmakokinetiku (jaterní a renální funkce, clearance cytostatik) a biofarmakologickou toleranci, a tedy mohou mít vliv na efekt a toxicitu aplikované protinádorové léčby. Všeobecně lze říct, že dospívající tolerují onkologickou léčbu hůř než děti, ale lépe než starší pacienti. Ve srovnání s dětmi trpí adolescenti častěji periferní polyneuropatií, intolerancí glukózy u kortikoidů, mají vyšší riziko vzniku osteonekrózy. Ve srovnání s dospělými a staršími pacienty mají dospívající nižší orgánovou toxicitu, farmakokinetické procesy jsou efektivnější. Léčebné strategie, které by byly cíleny na věkově specifickou skupinu se specifickými biologickými charakteristikami nádoru a hostitele, by v budoucnu mohly výrazně zlepšit výsledky a prognózu dospívajících s maligním nádorem [2,4,11,13].

Aktuální specifické problémy v onkologii dospívajících

V současnosti se v onkologii dospívajících setkáváme především se čtyřmi hlavními a palčivými problémy.

1. Problém pozdní diagnózy a oddálení léčby nádorů u adolescentů

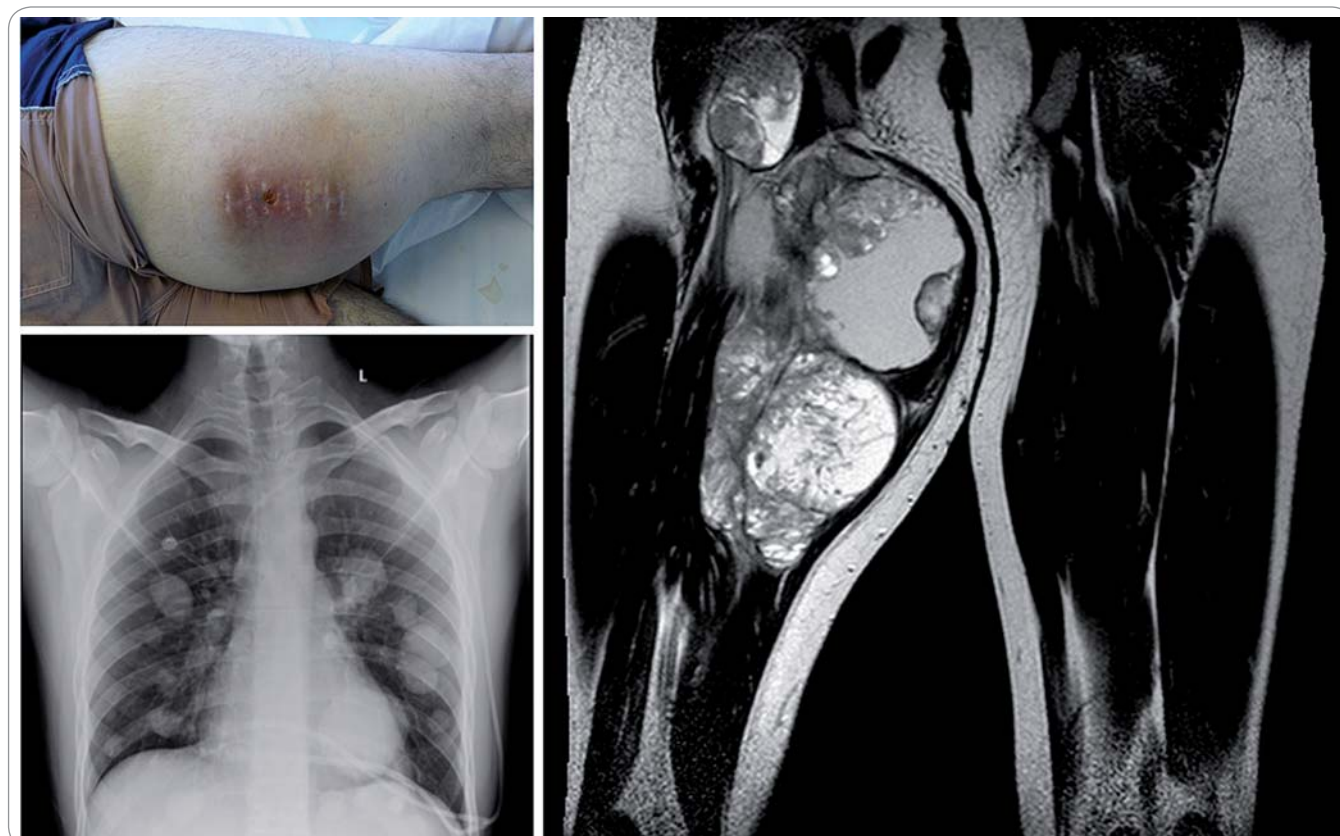
Velké procento dospívajících má lokálně pokročilou nebo metastatickou nemoc v čase diagnózy. Iniciální rozsah nádoru patří mezi nejdůležitější faktory ovlivňující prognózu, a pozdní diagnóza se tak výraznou mírou podílí na horším OS u adolescentů (obr. 1). Příčin pozdní diagnózy nádorů u dospívajících je několik, a to na všech úrovních – od pacienta samotného přes rodinu a rodiče až po lékaře [2,14,15].

Ze strany pacienta hraje roli právě věk – období psychického dozrávání a formování osobnosti. Protože nádor jako takový obvykle nebolí, nevěnuje dospívající iniciálním příznakům obvykle pozornost, navíc mladý organismus dokáže kompenzovat poměrně dlouhou nárust nádoru (např. útlak plic nádorovou

masou bez dyspnoe či tachypnoe). Adolescenti většinou ani netuší, že by ve svém věku mohli onemocnět zhoubným nádorem [2,15].

Rodina a především rodiče se obvykle zaměřují zvláště na sociální stránku a problémy dospívajícího (škola a prospěch, další vzdělávání a pracovní uplatnění, kamarádi atd.). Často bagatelizují iniciální zdravotní problémy a stížnosti adolescenta, protože již vyrostl z dětského věku, kdy se báli o jeho zdraví a každou „bolístku“ řešili návštěvou lékaře („děti již vyrostly, jsou mladí, nemohou být tedy vážně nemocní...“). Je to dáno i faktem, že příznaky způsobené nádorem u mladých lidí jsou většinou nespecifické a dětské typy nádorů obvykle nemají příznaky, které jsou v povědomí populace spjaté s rozvojem nádoru [2,14,15].

Ze strany poskytovatelů zdravotní péče (lékařů primárního kontaktu, ale i kolegů z různých oddělení či klinik všeobecných nemocnic) rovněž dochází k mnoha omylům. Stále se bohužel i dnes setkáváme s mladými lidmi, u kterých byly iniciální příznaky nádoru i několik měsíců podceňovány nebo



Obr. 2. Synoviální sarkom stehna diseminovaný (délka anamnézy osm měsíců).

Zdroj: Klinika dětské onkologie, FN Brno.

byly hodnoceny nesprávně, často se na možnost nádoru jako vyvolávající příčiny vůbec nemyslelo (obr. 2). Tento fakt může být dán vzácným výskytem nádorů u mladých lidí. Ovšem v populaci počet preventivních prohlídek s věkem klesá, a co je možná horší, mnohdy proběhnou pouze formálně. I mezi zdravotníky se setkáváme s názorem, že mladý člověk nemůže být vážně nemocen a je automaticky zdravý z titulu svého mládí [14–18].

2. Místo léčby dospívajících s malignitou

V ČR všeobecně péči o dospívající pacienty do dovršení 18 [19] roku věku zabezpečuje lékař primárního kontaktu – pediatr. Situace se v jednotlivých krajích Evropy liší [12]. V současnosti není v ČR vytvořeno věkově specifické centrum pro léčbu nádorů u dospívajících. Dospívající pacient se může dostat na pracoviště dospělé onkologie nebo na pracoviště dětské onkologie. Většina dospívajících je léčena na pracovištích dětské onkologie, ale v sou-

časném systému zdravotní péče existuje riziko, že se dle typu nádoru (např. plicní nádory či ložiska, gynekologické nádory, sarkomy) může adolescent ocitnout sice na specializovaném pracovišti, které ale nemá dostatek zkušeností ani znalostí o specifických problémech juvenilních typů nádorů. Není zaveden jednotný systém reference dospívajícího onkologického pacienta. Centralizace v onkologických věkově specifických centrech se tak stává pro pacienta životně důležitou v čase, kdy histologický náález a klinické stadium již zdaleka nestačí k přesnému určení diagnózy, určení individuální míry rizika a tím adekvátní léčby a prognózy. Diagnostika a léčba juvenilních typů nádorů je velmi složitá a vyžaduje dlouholetou zkušenost a úzkou spolupráci specializovaného týmu odborníků [2,4,5,7,8,11,18].

Kromě často rozdílné strategie léčebného přístupu u dospělé a dětské onkologie je důležitý především faktor zkušeností s léčbou agresivních juvenilních typů nádoru. Pokud onkolog pro do-

spěle používá stejnou dávkovou intenzitu a modifikace léčby u dospívajících jako u starší generace pacientů, je více než pravděpodobné, že adolescent bude vzhledem k agresivnímu typu nádoru a vysoké míře biofarmakologické tolerance relativně podléčen a jeho nádor nebude zvládnut a léčen úspěšně [13].

Ideální postup je společná péče dětského onkologa i onkologa dospělého věku o dospívajícího pacienta s maligním nádorem, která bude reflektovat typ nádoru, jeho biologické a cytogenetické charakteristiky, klinické chování a stejně tak i věkově specifickou biologii pacienta. Ve Velké Británii, kde se nejdéle věnují problematice dospívajících onkologických pacientů, je v rámci National Health Services Trust nemocnic vytvořeno 28 specializovaných jednotek pro adolescenty.

3. Možnosti prevence a časné diagnostiky nádorů u dospívajících – osvěta

Možnosti, způsoby a formy prevence nádorů u dospívajících se zásadně neliší od

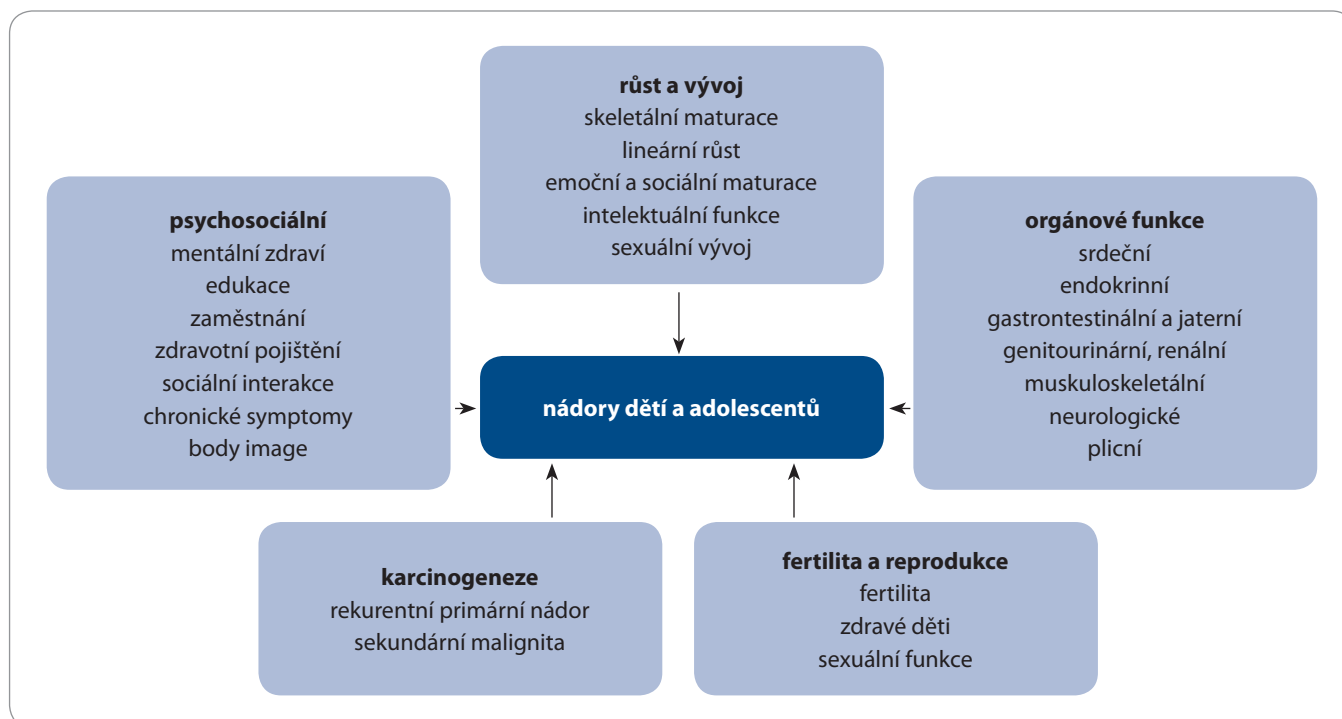


Schéma 1. Rizika pozdních následků u bývalých dětských onkologických pacientů.

prevence v jiných věkových skupinách. Platí především dodržování zásad zdravého životního stylu. U dospívajících je tento bod o to důležitější, že právě v období dospívání se fixují životní návyky a životní styl.

Primární prevence je u adolescentů obtížně definovatelná. Aktivní vyhledávání, tj. screening nádorů, se rutinně neprovádí z několika důvodů – nádory u dospívajících patří mezi vzácná onemocnění, chybí specifické indikátory nádorové nemoci, etiologie není známa (resp. je multifaktoriální souhrou genetických faktorů a vlivů vnějšího prostředí) a tedy nelze definovat rizikovou skupinu mladých lidí [4].

I tu však existuje výjimka, a to u dospívajících s genetickými k nádorům predisponujícími syndromy (např. Li-Fraumeni syndrom, syndrom familiární adenomatózní polypózy, neurofibromatóza typu I a II, Gardnerův syndrom, Lynchův syndrom, tuberózní skleróza atd.). Genetických predispozičních nádorových syndromů je popsáno v literatuře kolem 200. Pacienti do 19 let věku, u kterých byl nádorový predispoziční syndrom prokázán genetickým vyšetřením nebo mají vysokou pravděpodobnost jeho výskytu vzhledem k rodinné anamnéze, by

měli být dispenzarizováni a pravidelně sledováni na odborném pracovišti dětské onkologie [19,20].

U dospívajících dívek je možností prevence rozvoje karcinomu děložního čípku v pozdějším věku očkování vakcínou proti HPV, a to před zahájením aktivního pohlavního života (vakcína hrazena do věku 14 let).

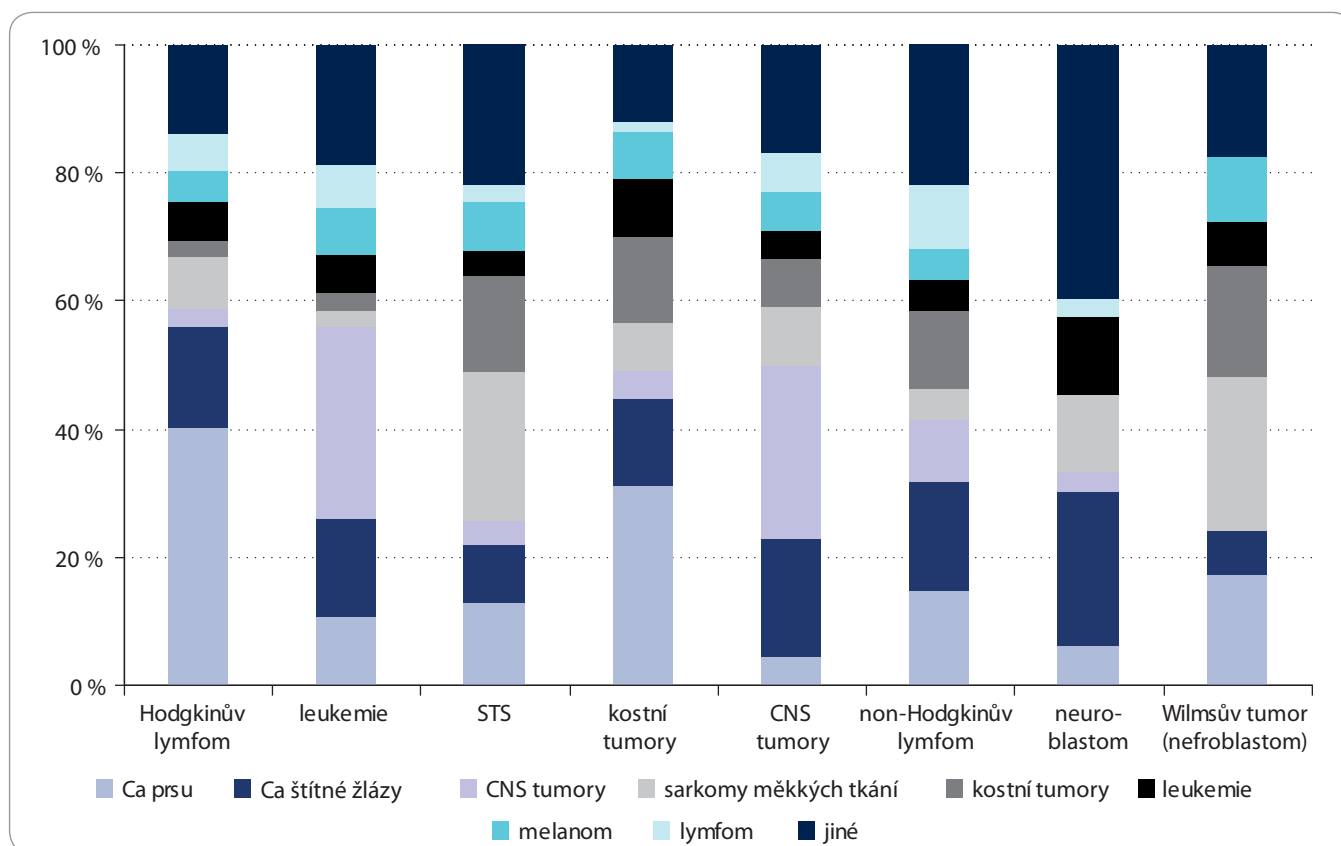
Časná diagnostika a zkrácení doby od prvních příznaků ke stanovení diagnózy a zahájení efektivní onkologické léčby je pro adolescenty klíčová a tady hraje významnou roli informovanost a osvěta – nejenom adolescentů, ale i jejich rodičů. Znalost možných rizikových a predispozičních faktorů, zdravotní osvěta a výchova mladé generace k odpovědnému přístupu k vlastnímu zdraví je nezbytnou součástí prevence nádorových onemocnění v mladém věku. V přípravě je webová stránka www.fighttogether.cz zaměřená na bližší informace o maligních nádorech u adolescentů a mladých dospělých včetně anonymní poradny, která by měla začít fungovat v průběhu roku 2015.

Poučení o samovyšetření prsu u mladých dívek a samovyšetření varlat u chlapců a mladých mužů lze nalézt na stránkách: www.prevencenadoru.cz, www.maskoule.cz, www.hlidackouli.cz.

V sekundární prevenci a časném zachytu nádorů u dospívajících hraje mimořádně důležitou roli lékař primárního kontaktu a systém pečlivě prováděných preventivních prohlídek. Doškolování lékařů primárního kontaktu v oblasti onkologie nejen dospělých, ale i dětí a dospívajících, je nutností [16–18]. Lékaři i laici najdou informace na www.linkos.cz, na nichž funguje i bezplatná poradna stran prevence a časně diagnostiky nádorů, dále www.mojemedicina.cz, na webových stránkách Kliniky dětské onkologie FN Brno a Kliniky dětské onkologie a hematologie FN v Motole, Praha. Ze zahraničních stránek jsou všeobecné užitečné informace pro pacienty na www.cancer.gov (adolescents and young adults).

Již po několikáté probíhá doškolovací vzdělávací akce pro lékaře primárního kontaktu v rámci Brněnských onkologických dnů.

Dalším zdrojem informací jsou články zabývající se touto tematikou v odborných časopisech a dvě monografie cílené na tuto věkovou skupinu pacientů (Nádory adolescentů a mladých dospělých, Grada 2011 a Vybrané kazuistiky nádorů u adolescentů a mladých dospělých, Mladá fronta 2012).



Graf 4. Typ sekundárních nádorů dle primárního nádoru u dětí.

Modifikovaný graf dle [21].

4. Dlouhodobě přežívající dětští onkologičtí pacienti (childhood cancer survivors), problémy přechodu z dětské onkologie do péče medicíny dospělého věku (tzv. transitional care)

Specifickou skupinou v onkologii jsou mladí dospělí, kteří byli léčeni pro maligní nádorové onemocnění v dětském věku a dlouhodobě přežívají bez přítomnosti nádoru. Jejich počet v populaci narůstá, v současnosti je jeden z 850 lidí do 35 let věku přežívající dětský onkologický pacient; 25 % z nich je mladších 20 let věku, 75 % je mladších 40 let věku. Tito pacienti by měli být dlouhodobě, ideálně celoživotně, sledováni na specializovaném pracovišti. Velké procento z nich již dosáhlo dospělého věku a je ohroženo vznikem pozdních následků protinádorové léčby (poruchy růstu, kardiotoxicita, neurotoxicita, hormonální poruchy, poruchy fertility, neurokognitivní změny atd.). Nejzávažnějším z nich je vyšší riziko vzniku sekundárního nádoru (schéma 1) [2,4,12,21]. Míra rizika roz-

voje sekundárního nádoru a typu sekundárního nádoru závisí na typu primárního nádoru a typu protinádorové léčby, riziko zvyšuje rovněž přítomnost genetické zátěže (např. mutace *Rb1* genu). Pro lékaře, který pacienta dlouhodobě sleduje, je důležité znát míru rizika a předpokládaný typ sekundární malignity (graf 4). O významu této problematiky svědčí mimo jiné fakt, že problémy adolescentů a „childhood cancer survivors“ překročily hranice dětské onkologie a byly tématem speciální sekce v rámci kongresu ESMO 2014 v Madridu.

V reálné klinické praxi je často velmi problematický přechod z pracoviště dětské onkologie na pracoviště dospělé medicíny (tzv. transitional care) [11,22–25]. Ve světě existuje několik modelů následné péče:

1. Pacienta sleduje praktik nebo rodinný lékař, onkolog (a většinou již ne dětský onkolog, který pacienta léčil) je konzultován pouze v případech potíží. Nevýhodou je, že ošetřující lékař nemá zpětnou vazbu a neví nic o dlouho-

dobých problémech svého bývalého pacienta a nemůže tak korigovat současnou léčbu.

2. Pacient je sledován u svého praktického lékaře, který odesílá výsledky všech vyšetření a zázpis o kontrole onkologovi dospělého věku – kontinuita informací o pacientovi záleží na spolupráci a domluvě zainteresovaných lékařů.
3. Pacient je sledován onkologem dospělého věku, který často pro nedostatek času a jiných faktorů nekomunikuje s dětským onkologem a ten opět nemá informace o dalším vývoji zdravotního stavu svého bývalého pacienta.
4. Pacient je sledován onkologem dospělého věku ve spolupráci s dětským onkologem. Tento stav se jeví jako ideální.

Měřítkem léčebného úspěchu je v současné onkologii kromě délky samotného OS zejména kvalita života, schopnost mladých lidí zařadit se zpět do vzděláva-

cího či pracovního procesu, schopnost najít si partnera a založit si rodinu a žít plnohodnotný život. Proto je dlouhodobé sledování přežívajících mladých onkologických pacientů mezioborový multidisciplinární proces (onkologové, psychologové, kardiologové, gynekologové, ale také sociální pracovníci, tzv. poradci pro školu a práci atd.). Je to v podstatě zrcadlo a způsob hodnocení kvality práce dětského onkologa.

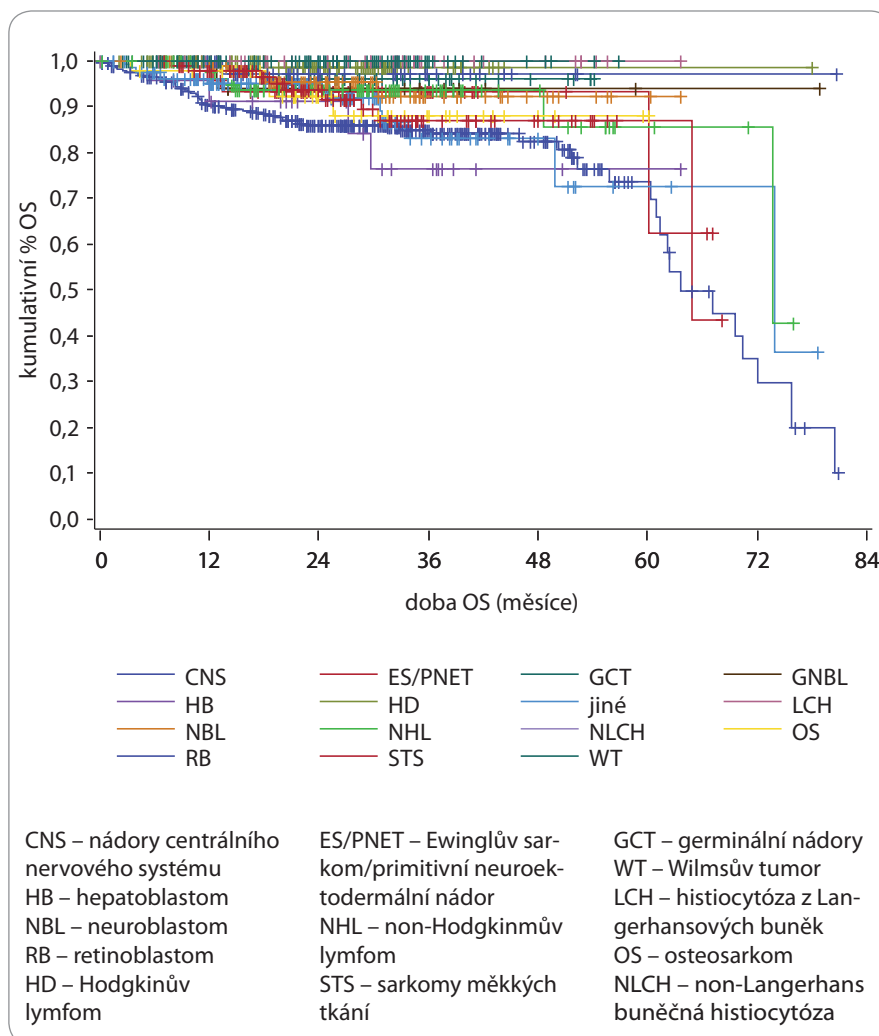
Subjektivní vnímání dobré kvality života u vyléčených mladých lidí závisí také na adekvátním chování a dostatečném pochopení ze strany jeho okolí. Proto je nevyhnutná osvěta široké populace i v tomto směru.

Vlastní zkušenosti s léčbou adolescentů

Na Klinice dětské onkologie FN Brno jsme v 10letém období 2004–2014 léčili 358 pacientů starších 15 let se širokým spektrem diagnóz. Počet pacientů v jednotlivých letech byl stacionární s minimálními odchylkami v rozmezí 26–36 pacientů za rok. Spektrum diagnóz zahrnovalo všechny typy nádorů a hematologických malignit typických pro tuto věkovou skupinu s převahou maligních lymfomů, sarkomů kostí a měkkých tkání, gonadálních germinálních nádorů. V posledních letech pozorujeme nárůst kožního maligního melanomu. Z karcinomů, i když vzácných, byl nejčastější hepatocelulární karcinom, renální karcinom a karcinom střeva na podkladě genetické zátěže (familiární adenomatózní poly póza, Lynchův syndrom atd.). Zemřelo celkem 57 pacientů (16 %), z nich 95 % na progresi maligního nádoru, pouze 5 % pacientů zemřelo na komplikace léčby nebo komplikace v souvislosti se základním onemocněním. Přežívá 84 % pacientů, délka OS se liší dle typu nádoru (graf 5).

Závěr

Zhoubné nádory u dospívajících a mladých dospělých patří v rámci oboru onkologie mezi onemocnění vzácná. Nízký výskyt je snad příčinou, proč byla tato skupina pacientů dlouhé období mimo centra zájmu onkologů dospělého věku i dětských onkologů. I když jsou juvenilní



Graf 5. Křivka OS dle diagnóz.

nádory potenciálně vyléčitelné, OS adolescentů nedosahuje úspěchy dosažené v dětské onkologii.

Při srovnání počtu klinických studií, úsilí a nemalých finančních nákladů, které jsou věnovány nádorům dospělého věku s velmi špatnou prognózou, kde se za úspěch považuje prodloužení života o několik málo měsíců, je naší morální povinností věnovat alespoň stejnou pozornost mladé generaci s onkologickým onemocněním, která má navíc podstatně lepší šance na dlouhodobé vyléčení. Využít tuto šanci a pomoci mladým lidem zvládnout jejich náročný boj s maligním nádorem ve složitém období dospívání se dá pouze širokou spoluprací jednotlivých medicínských specializací a vytvořením jednotných a všeobecně akceptovaných podmínek pro všechny mladé lidi.

Literatura

1. Bajčiová V. Definice adolescentního věku. In: Bajčiová V, Tomásek J, Štěrba J. Nádory adolescentů a mladých dospělých. Praha: Grada 2011; 1–2.
2. Bajčiová V. Adolescenti a mladí dospělí – „zabudnutá“ skupina v onkologii? Onkolog 2006; 1(2): 98–102.
3. Aubin S. What should the age range be for AYA oncology? J Adol Young Adult Oncol 2011; 1(1): 3–7.
4. Coccia PF, Altman J, Bhatia S et al. Adolescent and young adult oncology. Clinical practice guidelines in oncology. J Natl Compr Cancer Netw 2012; 10(9): 1112–1150.
5. Pearce MS, Parker L, Windebank KP et al. Cancer in adolescents and young adults aged 15–24 years: a report from the North of England young person's malignant disease registry, UK. Pediatr Blood Cancer 2005; 45(5): 687–693.
6. Bleyer WA. Cancer in older adolescents and young adults: epidemiology, diagnosis, treatment, survival and importance of clinical trials. Med Ped Oncol 2002; 38(1): 1–10.
7. Pentheroudakis G, Pavlidis N. Juvenile cancer: improving care for adolescents and young adults within the frame of medical oncology. Ann Oncology 2005; 16(2): 181–188.
8. Albritton K, Bleyer WA. The management of cancer in the older adolescent. Eur J Cancer 2003; 39(18): 2584–2599.

9. Bajčiová V. Epidemiologie nádorů u dospívajících a mladých dospělých. In: Bajčiová V, Tomášek J, Štěrbá J. *Nádory adolescentů a mladých dospělých*. Praha: Grada 2011: 7–22.
10. Bleyer WA. Young adult oncology: the patients and their survival challenges. *CA Cancer J Clin* 2007; 57(4): 242–255.
11. Freyer DR, Felgenhauer J, Perentesis J et al. Children's oncology group's 2013 blueprint for research: adolescent and young adult oncology. *Ped Blood Cancer* 2013; 60(6): 1055–1058. doi: 10.1002/pbc.24431.
12. Vassal G, Fitzgerald E, Schrappe M et al. Challenges for children and adolescents with cancer in Europe: the SIOP-Europe agenda. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61(9):1551–1557. doi: 10.1002/pbc.25044.
13. Veal GJ, Hartford CHM, Stewart CF. Clinical pharmacology in the adolescent oncology patient. *J Clin Oncol* 2010; 28(32): 4790–4799. doi: 10.1200/JCO.2010.28.3473.
14. Dang-Tan T, Franco EL. Diagnostic delay in childhood cancer: a review. *Cancer* 2007; 110(4): 703–713.
15. Bajčiová V. Rizika a následky pozdní diagnózy u dospívajících. *Vox Paediatricae* 2012; 12(6): 26–29.
16. Ahrensberg JM, Fenger-Grøn M, Vedsted P. Use of primary care during the year before childhood cancer diagnosis: a nationwide population – based-matched comparative study. *PLoS One* 2013; 8(3): e59098. doi: 10.1371/journal.pone.0059098.
17. Fern LA, Campbell CH, Eden TO et al. How frequently do young people with potential cancer symptoms present in primary care? *Brit J Gener Pract* 2011; 61(586): 223–230. doi: 10.3399/bjgp11X572418.
18. Hayes-Lattin B, Mathews-Bradshaw B, Siegel S. Adolescent and young adult oncology training for health professionals: a position statement. *J Clin Oncol* 2010; 28(32): 4858–4861. doi: 10.1200/JCO.2010.30.5508.
19. Schiffman JD, Geller JL, Mundt E et al. Update of pediatric cancer predisposition syndromes. *Ped Blood Cancer* 2013; 60(8): 1247–1252. doi: 10.1002/pbc.24555.
20. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 2003; 21(12): 2397–2406.
21. Meadows AT, Friedman DL, Neglia JP et al. Second neoplazma in survivors of childhood cancer: findings from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *J Clin Oncol* 2009; 27(14): 2356–2362. doi: 10.1200/JCO.2008.21.1920.
22. Freyer DR. Transitional of care for young adult survivors of childhood and adolescent cancer: rationale and approaches. *J Clin Oncol* 2010; 28(32): 4810–4818. doi: 10.1200/JCO.2009.23.4278.
23. Sender LS. The AYA cancer patients survivorship: challenges and opportunities. *J Adol Young Adult Oncol* 2013; 2(3): 87–88.
24. Zahara R, Rosenberg-Yunger S, Klassen AF et al. Barriers and facilitators of transition from pediatric to adult long-term follow up care in childhood cancer survivors. *J Adol Young Adult Oncol* 2013; 2(3): 104–111.
25. Fernandes SM, O'Sullivan-Oliviera J, Landzberg MJ et al. Transition and transfer of adolescents and young adults with pediatric onset chronic disease: the patient and parent perspective. *J Pediatr Rehabil Med* 2014; 7(1): 43–51. doi: 10.3233/PRM-140269.
26. Tayc.org [homepage on the Internet]. Teenagers and young adults with cancer. Available from: www.tyac.org.uk.

Bioinformatika a sekvenování nové generace

Bioinformatics and Next-generation Sequencing

Krejčí A., Müller P., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Technologie sekvenování DNA nové generace mají v současné době nezastupitelné místo ve výzkumu a postupně nacházejí cestu i do oblasti klinické praxe. Sekvenační přístroje produkují velké množství dat, jejichž analýza metodami bioinformatiky je nezbytná k získání relevantních výsledků. Sekvenování se tak bez pokročilého výpočetního zpracování specializovanými algoritmy naprosto neobejde. V tomto přehledu jsou představeny základní koncepty výpočetního zpracování sekvenačních dat s přihlédnutím ke specifickým aspektům oblasti onkologie. Rovněž jsou uvedeny nejčastější problémy a překážky komplikující zpracování a biologickou interpretaci výsledků.

Klíčová slova

bioinformatika – technologie masivně paralelního sekvenování – mutace – onkologický výzkum – klinická aplikace

Summary

Next-generation sequencing technologies are currently well-established in the research field and progressively find their way towards clinical applications. Sequencers produce vast amounts of data and therefore bioinformatics methods are needed for processing. Without computational methods, sequencing would not be able to produce relevant biological information. In this review, we introduce the basics of common NGS-related bioinformatics methods used in oncological research. We also state some of the common problems complicating data processing and interpretation of the results.

Key words

bioinformatics – high-throughput nucleotide sequencing – mutations – cancer research – clinical application

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projektem MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010004).

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), by the project MEYS – NPS I – LO1413, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: vojtesek@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 21. 4. 2015

Přijato/Accepted: 26. 6. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152591>

Úvod

Objevem funkce DNA v roce 1944 [1] začala snaha o přečtení a rozluštění dědičné informace. Objev struktury DNA v roce 1953 [2] objasnil princip, jakým je informace uchovávána a přenášena do dalších generací. První metody umožňující relativně účinné čtení dědičné informace, neboli sekvenování DNA, se však objevily až koncem 70. let 20. století [3,4]. Vývoj těchto metod umožnil v 90. letech 20. století započít sekvenování lidského genomu [5], v té době extrémně náročný projekt těžko představitelného rozsahu. Po roce 2000 se začaly objevovat první metody masivně paralelního sekvenování, označované jako sekvenování nové generace (next-generation sequencing – NGS) [6]. Ty se vyvíjejí dodnes a v současné době koexistují se zcela novými přístupy ke čtení DNA, někdy označovanými jako sekvenování třetí generace [7].

Bioinformatika jako obor zabývající se zpracováním rozsáhlých molekulárněbiologických dat včetně sekvencí DNA byla nezbytná již od počátků sekvenování. Důležitost výpočetních přístupů dobře ilustrují počáteční neúspěchy vědců při snaze sestavit kompletní genomy i velmi jednoduchých organismů, způsobené právě neexistencí vhodných počítačových programů. Teprve v roce 1995, pět let po zahájení projektu s cílem sestavit lidský genom, se podařilo sestavit první kompletní genom volně žijícího organismu, bakterie *Haemophilus influenzae* [8]. Skupina Craiga Ventera tehdy vyvinula program TIGR assembler [9], který dokázal sestavit 24 000 fragmentů sekvence bakteriální DNA ve správném pořadí a zkompletovat tak celý 1,8 milionů bází dlouhý chromozom. Zmíněná čísla ukazují, že i při práci s jednoduchými organismy ruční zpracování dat nepřipadá v úvahu a že sekvenování DNA se bez bioinformatiky neobejde.

V dnešní době jsou pokročilé metody sekvenování hojně využívány ve výzkumu a své místo si postupně nacházejí i v klinické praxi [10]. Přístroje jsou schopné vyprodukovat enormní množství dat, která jsou však bez pokročilého bioinformatického zpracování bezcenná.

Principy sekvenování nové generace

Základní myšlenkou metod NGS je tzv. masivně paralelní sekvenování. Jde o postup, při kterém je během jednoho experimentu v jednom okamžiku zároveň sekvenováno velké množství samostatných molekul. Vstupní DNA (genomická nebo cDNA získaná reverzní transkripcí) je fragmentována na úseky o délce typicky několika desítek až stovek párů bází a v případě potřeby amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR). Tyto krátké fragmenty jsou poté čteny a zpracovávány paralelně. Společným znakem těchto metod je čtení velkého množství (v řádu jednotek milionů až jednotek miliard) fragmentů – „readů“ (pojem někdy též překládaný jako „čtení“), které jsou však relativně krátké (typicky v řádu stovek bází). Takto vysoká míra paralelizace je hlavní rozdíl mezi NGS a klasickým Sangerovým sekvenováním, při kterém je zároveň čteno typicky max. 96 molekul DNA.

Princip samotného určování bází DNA dnes spočívá nejčastěji v tzv. sekvenování syntézou. Většina metod využívá DNA polymerázu postupně syntetizující vláknko komplementární k jednovláknovému templátu sekvenovaného fragmentu. Použité chemické sloučeniny zajistí, že těsně po začlenění každé nové báze do řetězce DNA je přímo z místa začlenění uvolněn určitý druh signálu, který je následně zachycen technickým vybavením přístroje. Nejpoužívanější podobou signálu je světlo, existují však i technologie využívající detekci uvolněných protonů H^+ [11]. Zmíněný princip v různých obměnách implementují všechny v praxi používané technologie – přístroje značky Illumina (v dnešní době jednoznačně nejpopulárnější), Ion Proton firmy Life Technologies, Roche 454 (v současnosti se již přestává používat), ABI SOLiD (místo syntézy komplementárního vlákna využívá ligaci krátkých fragmentů) či přístroj RS II firmy Pacific Biosciences. Ve fázi vývoje jsou i přístroje využívající k určení sekvence DNA zcela odlišné přístupy, ovšem k jejich rutinnímu nasazení v praxi zatím stále nedošlo (asi nejslibnější novou technologií disponuje firma Oxford Na-

nopore – sekvenování je založeno na detekci změn v elektrickém proudu procházejícím přes mikroskopické póry, kterými jsou translokovány molekuly DNA).

Při NGS experimentech je důležité určit požadovanou tzv. hloubku (depth, někdy označováno také jako pokrytí – coverage, či hloubka pokrytí – depth of coverage). Jedná se o průměrný počet kopií vzorku DNA, které sekvenováním získáme. Například při hloubce 30krát by se měl s největší pravděpodobností každý úsek sekvenované DNA vyskytovat v 30 různých readech, tedy informací o tom, jaká báze se na konkrétním místě nachází, dostaneme v 30 kopiích. Větší pokrytí jednak zajistí eliminaci chyb přístrojů, které se vždy nevyhnutelně vyskytují, jednak zvýší citlivost metody – pokud sekvenujeme DNA ze směsi geneticky odlišných buněk, je možno vyšším pokrytím dosáhnout detekce vzácných variant, které se vyskytují pouze ve zlomku zkoumaných buněk. Na rozdíl od ideální představy ovšem pokrytí v praxi nebývá ani zdaleka rovnoměrné. Při průměrném pokrytí 30krát budou pravděpodobně stále existovat úseky, o nichž nebudeme mít žádné nebo téměř žádné informace, sekvence jiných oblastí bude naopak obsažena ve stovkách readů. Tato nevyváženost může být způsobena mnoha různými faktory, jako jsou rozdílná míra amplifikace pomocí PCR, rozdíly v účinnosti hybridizačních sond při cíleném sekvenování či vliv repetitivních oblastí.

Nejčastější aplikace sekvenování

První sekvenační projekty měly za cíl sestavit do té doby neznámé genomy různých organismů. Takový přístup nazýváme *de novo* sekvenování genomu. V případě, že referenční sekvence genomu zkoumaného organismu byla již dříve sestavena, hovoříme o resekvenování. Referenční sekvence jsou dnes k dispozici pro mnoho organismů včetně člověka, což umožňuje široké využití resekvenování. Cílem celogenomového resekvenování je hledání krátkých variant v kódujících oblastech genů i v těch nekódujících, např. pro-

motorových a regulačních oblastech, případně detekce rozsáhlých chromozomových přestaveb a hledání strukturních variací typu CNV (copy number variations).

Další častou podobu experimentu představuje exomové sekvenování, při kterém je sekvenována pouze DNA kódujících úseků – exonů. Sekvenační knihovna je v tomto případě vytvořena separováním fragmentů genomové DNA pomocí hybridizace s fragmenty obsahujícími sekvence komplementární k exonové DNA. Tato metoda tedy slouží primárně k detekci somatických mutací a polymorfizmů v kódujících oblastech genů. Výhodou metody je značná úspora kapacity i ceny oproti sekvenování celého genomu.

V některých případech je třeba určit sekvenci pouze několika málo genů či jejich částí. V takových situacích je použito tzv. cílené (targeted) sekvenování, při kterém je izolována, amplifikována a osekvenována pouze DNA z přesně definovaných oblastí. Cílené sekvenování má důležité klinické aplikace v onkologické diagnostice. Menší počet přesně definovaných úseků je totiž možno za relativně nízkou cenu osekvenovat do velké hloubky, běžná je i hloubka více než 1 000krát. Lze tak detekovat i somatické mutace v komplexním biologickém vzorku, jakým je vzorek nádoru obsahující směs zdravých a nádorových buněk. Citlivost této metody umožňuje detekovat mutace s frekvencí četnosti pod 1 %, což je citlivost, které klasické Sangerovo sekvenování zdaleka nedosahuje.

Velmi rozšířená aplikace NGS je i sekvenování RNA, které se využívá pro kvantitativní i kvalitativní analýzu mRNA, miRNA nebo cílenou sekvenaci variabilních oblastí ribozomální RNA. V tomto experimentu je izolována buď celková RNA, nebo pomocí hybridizačních metod specifická buněčná RNA (např. miRNA nebo mRNA). Pomocí reverzní transkripce je RNA přepsána do cDNA, která je následně osekvenována. Metoda je využívána především k měření intenzity exprese jednotlivých genů, k detekci sestřihových variant a genových fúzí. Teoreticky je možno transkriptomovým sekvenováním detekovat

i germinální a somatické mutace. Tato možnost se však příliš nevyužívá, jelikož sekvenování DNA je pro tento účel vždy přesnější [12].

Bioinformatické přístupy v sekvenování

Bioinformatika je nezbytná součást všech fází vyhodnocení sekvenačních dat, od zpracování signálu v přístroji po finální studium výsledků.

Zpracování dat experimentu resekvenování

Ať jde o celogenomové, exomové či cílené resekvenování, základní postup zpracování dat je vždy stejný. Nejdřív je třeba mapovat všechny ready na referenční genom, tedy najít pokaždé tu část referenční sekvence, která odpovídá sekvenci fragmentu. V dalším kroku je potřeba nalézt a spočítat všechny odlišnosti nasekvenované DNA od referenční sekvence či rozdíly mezi jednotlivými ready mapovanými na stejnou oblast genomu. Na základě pokročilých statistických výpočtů je určena pravděpodobnost, s jakou se na pozicích vyskytují skutečné polymorfismy a s jakou pravděpodobností jde jen o chyby v sekvenaci či v mapování readů. V případě cíleného sekvenování v diagnostice je požadovaným výstupem často pouze informace o přítomnosti či nepřítomnosti známých variant, ve výzkumu jsou data o variantách dále zpracovávána dalšími metodami, např. se snahou odlišit řídící (driver) od následných (passenger) mutací v nádorových buňkách.

Referenční genom

Přestože se na referenčním lidském genomu pracuje již od roku 1990, kompletní a přesná sekvence stále není známa. Problém je především s určením správného počtu kopií ve vysoce repetitivních oblastech, např. v okolí centromer chromozomů. Důvodem je nedostatečná délka sekvenačních readů – v případě mnohonásobného opakování krátkého úseku DNA, kdy je výsledná repetice podstatně delší než ready, které umí přístroje vytvořit, je sice možné získat ready začínající levou hranicí repetitivní oblasti a jiné ready končící její pravou hranicí, všechny ready mezi těmito oblastmi však budou

vzhledem k repetitivní povaze oblasti téměř nebo zcela totožné. Počet readů lze k určení délky repetice využít jen velmi omezeně, takže jediná informace, kterou takto získáme, bude fakt, že repetitivní oblast je více než dvakrát delší než jeden read. Další problémy nastávají u větších skupin sekvenčně velmi podobných genů a pseudogenů, jako jsou např. geny čichových receptorů. Pokud jsou např. rozdíly v sekvenci genů tak vzácné, že jeden sekvenační read nese pouze jeden (bodový) rozdíl, není možné skládáním readů určit, do kterého z genů který rozdíl patří.

Díky pokrokům v technologii sekvenování se délka readů i jejich přesnost neustále zvětšují, a proto se i sekvence referenčního genomu neustále vyvíjí. První verze referenčního genomu obsahovala 150 000 regionů s neznámou sekvencí. Devatenáctá verze z roku 2009 už obsahovala pouze 357 takových mezer. Nejnovější verze, známá jako hg38 nebo GRCh38, pochází z prosince roku 2013 a mimo jiné jako první obsahuje i přibližné odhady počtu centromerických repetitivních [13].

Mapování na referenční genom

Hledání pozice na referenční sekvenci, která přísluší sekvenci readu, je obtížné. Nejjednodušší způsob, jak k němu přistoupit, je porovnat read postupně se všemi pozicemi v genomu. Takový přístup by pro genom délky a a read délky b vyžadoval přibližně $a \times b$ porovnání bází. Situace je ovšem ještě složitější, protože jednoduchým porovnáním všech možných pozic nebereme v úvahu možnost existence mezer – pokud by read obsahoval malou delecii či inerci, jeho správnou pozici bychom tímto způsobem vůbec nenašli. Existují ovšem algoritmy, které dokážou najít optimální zarovnání sekvencí včetně mezer taktéž s použitím $a \times b$ kroků. Problém mapování na referenční genom je ovšem tak rozsáhlý, že ani tyto algoritmy nelze jednoduše využít. Pokud bychom např. provedli resekvenování lidského genomu s hloubkou 20krát, získali bychom zhruba 600 milionů readů o délce 100 bp. Pro namapování každého z nich by bylo potřeba asi 3×10^{11} kroků, dohromady, tedy $1,8 \times 10^{20}$ porovnání nukleotidů. Sou-

časné procesory pracují s frekvencí okolo 4 GHz, tudíž provedou 4×10^9 tiků za sekundu. Kdyby procesor zvládl v jednom tiků vykonat jedno porovnání nukleotidů, trvalo by mapování genomu $4,5 \times 10^{10}$ sekund, tedy 1 427 let.

Proto se při mapování používá několik technik výrazně zkracujících potřebný čas. Hlavní technika je indexování. Nad sekvencí genomu je vytvořen index čili rejstřík. Ten je potom využit při prohledávání genomu velmi podobným způsobem, jakým člověk využívá rejstřík v knihách. Tvorba indexu je náročná, ale stačí jej pro každý genom vytvořit jednou a poté je možno jej použít pro všechna budoucí mapování. V současnosti nej-používanější technikou tvorby rejstříku je tzv. Burrowsova-Wheelerova transformace, která je využívána mimo jiné také v kompresi dat. Další urychlení je dosaženo snížením požadavků na přesnost zarovnání genomu a readu – nehledá se vždy optimální zarovnání, což postup velmi urychlí, ovšem za cenu možnosti výskytu malého množství chybně namapovaných readů [14].

Určování variant

Ve chvíli, kdy jsou ready namapovány na referenční genom, je možno určit přesnou sekvenci DNA celého vzorku. V nej-jednodušším případě bodového polymorfismu v podobě substituce by (u heterozygotního organismu) měly v místě homozygotního genotypu obsahovat všechny ready namapované k danému úseku genomu stejný nukleotid, v místě heterozygotního by polovina readů měla obsahovat jednu variantu a polovina druhou. Situaci však komplikuje fakt, že sekvenační přístroje produkují nezanedbatelné množství chyb a jak již bylo zmíněno, některé ready mohou být chybně zarovnané. V důsledku těchto faktorů tak mohou být určeny falešně pozitivní varianty v místech, kde se ve skutečnosti nevyskytují. Aby byla pravděpodobnost chyby snížena, využívá se pokročilé statistiky (v případě bodových mutací jde typicky o bayesovské metody) k určení pravděpodobnosti výskytu skutečné varianty a chyby [15]. Ke zpřesnění výsledků může také posloužit analýza více vzorků zároveň – může např. existovat varianta,

která je vzácná nebo se vyskytuje v oblasti s typicky nízkou hloubkou pokrytí, a proto se v každém vzorku jeví spíše jako chyba přístroje. Výskyt ve více nezávislých vzorcích ovšem potvrzuje, že se jedná o skutečnou variantu, jelikož pravděpodobnost opakování stejné chyby je malá [16].

V případě nádorových vzorků je situace komplikovanější, protože DNA často pochází z komplexní směsi geneticky odlišných buněk. Je proto třeba využít sekvenování s velkou hloubkou a upravit parametry statistických metod, protože i bodové rozdíly v malé části readů mohou znamenat skutečnou mutaci, která by jinak mohla být nesprávně považována za chybu sekvenačního přístroje. Pro odlišení somatických mutací od zárodečných variant je vhodné sekvenovat kromě nádorové tkáně i zdravou, která poslouží jako negativní kontrola.

Určování krátkých delecí a inzercí je náročnější problém než určování bodových substitucí, protože v místech, kde se vzorek liší délkou od referenčního genomu, je větší pravděpodobnost chybně namapovaných readů. Situace se často řeší lokálním provedením časově náročnějšího a přesnějšího zarovnání readů pouze v místech možných delecí a inzercí. U nádorových vzorků je situace opět komplikovanější, ze stejných důvodů jako v případě bodových substitucí.

Nejnáročnější úkol je detekce rozsáhlejších strukturních variací, jako jsou delece, změny počtu kopií (CNV) či translokace. Izolovanou událost většího rozsahu je možno v dobře definovaném vzorku detekovat na základě porovnání teoretické a skutečné hloubky pokrytí v postižené oblasti. Pokud je k některé části referenčního genomu namapováno nezvykle mnoho readů, mohl být tento úsek ve vzorku amplifikován. Je-li naopak např. hloubka pokrytí některého chromozomu poloviční než u ostatních, může se jednat o monoploidii. Další možnost je využít informace získané speciálním protokolem sekvenování (techniky nazývané paired-end a mate-pair sequencing). Tento postup využívá technických možností některých sekvenačních přístrojů,

které jsou schopny každý fragment DNA číst z obou stran. Pokud např. fragmentujeme sekvenovanou DNA na úseky dlouhé 1 000 bází, přístroj bude schopen přečíst 100 bází z každého konce fragmentu. Ready pocházející z jednoho fragmentu potom vytvoří pár. Jelikož délka fragmentů DNA byla 1 000 bází, můžeme předpokládat, že mezi koncem prvního a začátkem druhého readu z jednoho páru by vždy mělo ležet 800 bází. Najdeme-li po namapování na referenční genom ready z jednoho páru v neobvyklé vzdálenosti, můžeme určit, že v oblasti 800 bází mezi konci readů došlo ke strukturní změně [17].

V některých situacích mohla určitá část sekvenovaného genomu projít tolika strukturními změnami, že ready, které z ní pocházejí, není vůbec možno namapovat na referenční genom, protože rozdíl skutečné sekvence proti referenční je příliš velký. V těchto případech je často jedinou šancí pokusit se takové značně degenerované oblasti vzorku sestavit z readů *de novo*, tedy použít metody, které se běžně používají k prvotnímu určení sekvence genomu neznámého organismu.

Obecně lze říci, že určování variant v genomech, které se příliš neliší od referenční sekvence, je v současné době poměrně dobře zvládnutý problém. Situace je ovšem odlišná v případě rakovinných buněk, které jsou často geneticky nestabilní a jejich genomy podléhají velkému množství rozsáhlých změn. Určení správné sekvence u takových vzorků je obecně velmi obtížné a cesta k jeho řešení zatím není u konce. Aplikace v onkologické praxi se omezují především na hledání předem známých anotovaných mutací v úzké skupině genů pomocí cíleného sekvenování s velkou hloubkou. Existují komerčně dostupné tzv. panely pro testování nejběžnějších mutací v několika genech, z nichž některé jsou dodávány i s bioinformatickým řešením šitým na míru konkrétnímu problému. Začínají tak být k dispozici metodiky založené na NGS, které jsou přesně definované od sběru vzorku po zpracování dat, a mají tak šanci konkurovat jiným, v klinické praxi už dobře ukotveným metodám.

Zpracování experimentu sekvenování transkriptomu

Při zpracování dat ze sekvenování mRNA je opět první nutný krok mapování readů na referenční genom, které je ovšem složitější než v případě sekvenování DNA. Důvodem je sestřih transkriptu. RNA je izolována a sekvenována až po sestřihu, tím pádem se v jednom readu mohou vyskytnout vedle sebe oblasti, které jsou v genomu odděleny dlouhým intronem. Mapování mRNA proto umožňuje vložení mezery reprezentující intron do libovolného místa readu a kromě sofistikovaných algoritmů pro hledání správného rozdělení readů mezi exony využívá i anotovaný referenční transkriptom. Situaci nadále komplikuje možnost alternativního sestřihu RNA – v transkriptu může dojít např. k vystřižení jednoho exonu společně se sousedními introny. Části readů sahající přes hranici sestřihu je potom třeba namapovat na dva exony, které spolu v genomu nesousedí [18].

Pokud je cílem experimentu hledat genové fúze, situace se dále komplikuje. V důsledku fúze se totiž do jednoho readu mohly dostat oblasti, které nejsou v genomu odděleny pouze kratšími oblastmi intronů – může se jednat i o velmi vzdálené regiony, nebo dokonce o oblasti z různých chromozomů. Při fúzích navíc může dojít k inverzím, které změni orientaci jedné ze spojených sekvencí. Algoritmy hledající genové fúze proto nejdříve identifikují ready, které není možno namapovat běžným způsobem. Ty potom rozdělí na kratší fragmenty a snaží se namapovat tyto fragmenty nezávisle, bez omezení jejich vzájemných pozic. Opětovným spojením fragmentů se získá informace o možných fúzích. Čím víc readů je namapováno obdobným způsobem do dvou oblastí genomu, tím větší je pravděpodobnost, že zde došlo ke genové fúzi. Na závěr je ještě třeba odfiltrovat všechny potenciálně falešné nálezy fúze sekvenčně podobných oblastí – ready mohly být namapovány z části na jednu, z části na jinou oblast genomu, ale pokud jsou toto např. oblasti dvou sekvenčně velmi podobných genů, je pravděpodobnější, že jde o chybu mapování a ready ve skutečnosti pochází

celé buď z jednoho, nebo z druhého genu [19].

Nejčastějším cílem sekvenování transkriptomu je určení míry exprese jednotlivých genů. Po namapování software spočítá, kolik readů se mapovalo na který gen a tuto hodnotu normalizuje na délku genu a celkový počet readů. Výsledkem je hodnota označovaná jako RPKM (reads per kilobase per million), popř. FPKM (fragments per kilobase per million, tato hodnota se používá u paired-end sekvenování). Jedná se o číslo vypočtené nezávisle pro každý gen, které určuje míru jeho exprese. V případě sekvenování buněčných linií nebo laboratorně pěstovaných organismů to může být dostačující výsledek, ovšem v případě experimentů s klinickými vzorky lidských tkání bývá většinou cílem spíše porovnání hladiny exprese mezi dvěma tkáněmi, např. zdravou a nádorovou [20]. Je proto potřeba provést a zpracovat dva experimenty, každý pro jeden druh tkáně a výsledky porovnat. Situaci komplikuje potenciálně vysoká míra variability mezi klinickými vzorky. Problém je způsoben tím, že hladina exprese některých genů je přirozeně silně variabilní, zatímco u jiných genů je velmi přísně regulována. Velký rozdíl v hladině exprese jednoho genu tak může být biologicky méně významný než řádově menší rozdíl v hladině exprese jiného genu [21]. Řešení spočívá ve sběru více dat a v pokročilé statistice. Experiment je potřeba replikovat – zpracovat několik nezávislých vzorků z obou tkání. Na základě rozdílů mezi hodnotami exprese v rámci vzorků z jednoho druhu tkáně je potom stanovena úroveň variability exprese každého genu a teprve poté jsou porovnány hodnoty mezi tkáněmi a výsledná významnost rozdílů v expresi je určena s přihlédnutím k naměřené variabilitě [22,23]. Přestože replikování experimentu značně zvyšuje jeho cenu, je to nespíš jediný použitelný přístup, protože na výsledky experimentů bez dostatečné míry replikace se nelze spolehnout [24].

Závěr

NGS je v současné době hojně využíváno ve výzkumu a postupně si nachází cestu i do klinické praxe. Aplikace v kli-

nické molekulární onkologii jsou zatím přes slibné prognózy poměrně omezené, mimo jiné z důvodu nedostatku přenositelných a dobře validovaných protokolů a metod zpracování sekvenčních dat. Sestavování a interpretace genetické informace nádorových buněk patří k vůbec nejsložitějším úkolům moderní genomiky a vývoj nových bioinformatických metod v této oblasti tak bude pro jejich uplatnění v klinické praxi naprosto nezbytný.

Literatura

1. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* 1944; 79(2): 137–158.
2. Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1953; 18: 123–131.
3. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12): 5463–5467.
4. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(2): 560–564.
5. Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822): 860–921.
6. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem* 2013; 6: 287–303. doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628.
7. Yanhu L, Lu W, Li Y. The principle and application of the single-molecule real-time sequencing technology. *Yi Chuan* 2015; 37(3): 259–268. doi: 10.16288/j.ycz.14-323.
8. Fleischmann RD, Adams MD, White O et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995; 269(5223): 496–512.
9. Sutton GG, White O, Adams MD et al. TIGR assembler: a new tool for assembling large shotgun sequencing projects. *Genome Sci Technol* 1995; 1(1): 9–19.
10. Xuan J, Yu Y, Qing T et al. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett* 2013; 340(2): 284–295. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.025.
11. Koubová L, Vojtěšek B, Vyzula R. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S61–S68. doi: 10.14735/amko2014S61.
12. Chien-Yueh L, Yu-Chiao C, Liang-Bo W. Common applications of next-generation sequencing technologies in genomic research. *Transl Cancer Res* 2013; 2(1): 33–45.
13. Human Genome Assembly Data [homepage on the Internet]. *Genome Reference Consortium, Great Britain*; [updated 2014 January 2; cited 2015 March 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/data>.
14. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009; 25(14): 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
15. McKenna A, Hanna M, Banks E et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010; 20(9): 1297–1303. doi: 10.1101/gr.107524.110.
16. Nielsen R, Paul JS, Albrechtsen A et al. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat Rev Genet* 2011; 12(6): 443–451. doi: 10.1038/nrg2986.

17. Chen K, Wallis JW, Mclellan MD et al. BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation. *Nat Methods* 2009; 6(9): 677–681. doi: 10.1038/nmeth.1363.
18. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009; 25(9): 1105–1111. doi: 10.1093/bioinformatics/btp120.
19. Kim D, Salzberg SL. TopHat-fusion: an algorithm for discovery of novel fusion transcripts. *Genome Biol* 2011; 12(8): R72. doi: 10.1186/gb-2011-12-8-r72.
20. Trapnell C, Williams BA, Pertea G et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 2010; 28(5): 511–515. doi: 10.1038/nbt.1621.
21. Hansen KD, Wu Z, Irizarry RA et al. Sequencing technology does not eliminate biological variability. *Nat Biotechnol* 2011; 29(7): 572–573. doi: 10.1038/nbt.1910.
22. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010; 26(1): 139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
23. Auer PL, Doerge RW. Statistical design and analysis of RNA sequencing data. *Genetics* 2010; 185(2): 405–416. doi: 10.1534/genetics.110.114983.
24. Liu Y, Zhou J, White KP. RNA-seq differential expression studies: more sequence or more replication? *Bioinformatics* 2014; 30(3): 301–304. doi: 10.1093/bioinformatics/btt688.

IntegRECAMO: úspěšná realizace projektu OP VK

IntegRECAMO: Intellectual Anchor je projekt Regionálního centra aplikované molekulární onkologie (RECAMO) Masarykova onkologického ústavu (MOÚ) financovaný z prostředků Evropského sociálního fondu prostřednictvím Operačního Programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost (reg. č. CZ.1.07/2.3.00/20.0097). Projekt byl řešen v období od 1. 7. 2013 do 30. 6. 2015.

Projekt IntegRECAMO byl realizován v rámci centra RECAMO MOÚ, které vzniklo za podpory OP VaVpI (CZ.1.05/2.1.00/03.0101) v roce 2010 a od roku 2015 je spolufinancováno projektem RECAMO2020 (LO1413) NPU I MŠMT. Hlavním cílem centra RECAMO je úzká spolupráce vědců zabývajících se základním výzkumem v oblasti nádorové biologie s lékařskými specialisty a rychlá aplikace nových poznatků základního výzkumu do klinické praxe. Klíčovým aspektem celkové strategie projektu je pak zefektivnit využití získaných výsledků výzkumu včasným zahájením spolupráce s aplikační sférou. Konečným cílem projektu je přenést poznatky základního výzkumu do podoby klinicky použitelných markerů, které mohou přispět ke zlepšení péče o pacienta.

Partnerem projektu IntegRECAMO byla Masarykova univerzita (MU), resp. její pracoviště věnující se problematice spojené s nádorovou biologii na Lékařské a Přírodovědecké fakultě. Spolupráce s MU je formálně ustanovena i ve statutu MOÚ, které je školicím pracovištěm pro pregraduální i postgraduální studenty MU v oblasti medicíny a přírodních věd; zaměstnanci MOÚ

se podílí na výuce na Lékařské a Přírodovědecké fakultě MU a jsou školiteli a vedoucími diplomových a dizertačních prací.

Projekt IntegRECAMO podpořil integraci špičkových tuzemských a zahraničních výzkumných pracovníků do týmu RECAMO, přenesení jejich zkušeností na mladé české vědce a vytvoření podmínek pro interakce v oboru na mezinárodní úrovni. Projekt IntegRECAMO umožnil zapojení studentů a akademických pracovníků do výzkumu centra RECAMO a posílil vzájemnou spolupráci organizací stáží členů týmu a studentů MU na zahraničních pracovištích. Od začátku projektu bylo realizováno 20 krátkodobých a dlouhodobých stáží pracovníků na předních evropských pracovištích zabývajících se problematikou onkologického výzkumu. Stáže umožnily edukaci pracovníků v oblasti nových technologií, případně jejich zavedení na pracoviště RECAMO a nově získané výsledky společného výzkumu budou základem publikací v renomovaných vědeckých časopisech.

Projekt IntegRECAMO byl dále zaměřen na přímou edukaci pracovníků MOÚ a MU v oblastech souvisejících s onkologickým výzkumem i v oblastech podporujících výzkum a vývoj (VaV). V rámci IntegRECAMO bylo celkem zorganizováno 30 odborných workshopů zaměřených na konkrétní oblast nádorové biologie, na nichž přednášeli domácí i zahraniční specialisté v oboru. V rámci dvou „Dnů otevřených dveří“ se odborná i laická veřejnost mohla seznámit s výzkumem v RECAMO a prohlédnout si prostory laboratoří RECAMO v nově rekonstruovaném Morávkově pavilonu MOÚ.

Především pro mladé vědecké pracovníky a studenty byly organizovány dvě „Letní školy IntegRECAMO“ s ústředními tématy „Metody základního a aplikovaného výzkumu v onkologii“ a „Aplikovaný klinický onkologický výzkum“. Náplň těchto týdenních intenzivních kurzů tvořily přednášky z konkrétních oblastí nádorové biologie, kurz biostatistické analýzy s možností praktického hodnocení vlastních naměřených biologických dat i exkurze na pracoviště aplikační sféry zabývající se oblastí spojené s biotechnologií a výzkumem. O odborné náplni Letní školy IntegRECAMO 2013 informuje práce s názvem „Knowledge transfer at the RECAMO Summer School of 2013“ autorů M. Sheard a L. Zdražilová Dubská publikovaná v časopisu Klinická onkologie v roce 2014.

Pod záštitou IntegRECAMO byly organizovány tři ročníky (2013, 2014, 2015) symposia s mezinárodní účastí „RECAMO joint meeting – Through Cancer towards Applied Molecular Oncology“. Pracoviště RECAMO konferenci tradičně pořádá již od roku 2010 a je určena především pro mladé začínající vědce zabývající se problematikou molekulární onkologie, kteří tak kromě prezentace výsledků svého výzkumu mají příležitost navázat spolupráci s ostatními pracovišti.

V roce 2015 projekt podpořil organizaci konference „Laboratorní diagnostika v onkologii 2015“, pořádanou již tradičně MOÚ společně s Lékařskou fakultou MU pod záštitou České asociace sester. Konference je primárně určena pro zdravotní laboranty a další pracovníky v klinických laboratořích. Setkání je zaměřeno na on-



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

kologickou diagnostiku a specifické aspekty laboratorní diagnostiky u onkologického pacienta napříč specializacemi laboratorní medicíny.

Kromě pořádání odborných seminářů zaměřených na konkrétní problematiku z oblasti nádorové biologie se projekt IntegRECAMO věnoval i dalšímu vzdělávání pracovníků výzkumu a vývoje organizací 19 workshopů na témata řízení projektů VaV včetně managementu

kvality ve výzkumných laboratořích, šíření výsledků vědy a výzkumu do praxe, transferu technologií a osvojování si znalostí o ochraně, ohodnocování a správě duševního vlastnictví.

Projekt IntegRECAMO: Intellectual Anchor maximálně naplnil primární vytyčené cíle spočívající v zapojení expertů do výzkumných aktivit RECAMO, dále ve smyslu široké vědecké spolupráce pro-

střednictvím studijních pobytů a také ve smyslu pokrytí dosud nerealizovaných edukačních aktivit v oblasti VaV v onkologii. V úspěšných aktivitách projektu IntegRECAMO budeme nadále pokračovat (www.recamo.cz).

*RNDr. Lenka Zdražilová Dubská, Ph.D.
garant projektu IntegRECAMO*

V Brně 12. 7. 2015

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Časopis České onkologické společnosti a Slovenskej onkologickej spoločnosti
The Journal of the Czech and Slovak Oncological Societies

REDAKČNÍ RADA

Výkonná redakční rada (Brno)

vedoucí redaktor

doc. MUDr. Vuk Fait, CSc.

MUDr. Petr Čoupek
doc. MUDr. Lenka Foretová, Ph.D.
doc. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.

výkonný redaktor

doc. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

MUDr. Ivo Kocák, Ph.D.
MUDr. Jiří Novák
prof. MUDr. Aleš Rejthar, CSc.

doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.
prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.

Širší redakční rada

prof. MUDr. Zdeněk Adam, CSc., Brno
MUDr. Otakar Bednařík, Brno
doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D., Praha
prof. MUDr. David Cibula, CSc., Praha
MUDr. Karel Cwiertka, Ph.D., Olomouc
doc. MUDr. Ladislav Dušek, Ph.D., Brno
prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc., Praha
doc. MUDr. David Feltl, Ph.D., Ostrava
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Olomouc
prof. MUDr. Roman Hájek, CSc., Ostrava
prof. MUDr. Ľudovít Jurga, DrSc., Trnava
doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc., Bratislava
prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., Praha
prof. MUDr. Ivan Koza, DrSc., Bratislava

assoc. prof. Jeong Eon Lee, M.D., Ph.D., Seoul
doc. MUDr. Jozef Madiak, CSc., Bratislava
prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc., Brno
doc. MUDr. Michal Mego, Ph.D., Bratislava
prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D., Olomouc
doc. MUDr. Beata Mladosičová, CSc., Bratislava
MUDr. Rudolf Nenutil, CSc., Brno
doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D., Praha
prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc., Bratislava
doc. RNDr. Martina Ondrušová, Ph.D., Bratislava
prof. Yeon Hee Park, M.D., Ph.D., Seoul
prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc., Praha
prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D., Brno
doc. MUDr. Luděk Pour, Ph.D., Brno

doc. MUDr. Igor Puzanov, Nashville
prof. MUDr. Lukáš Rob, CSc., Praha
prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc., Praha
prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D., Hradec Králové
prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc., Brno
prof. MUDr. Martin Smrčka, Ph.D., Brno
MUDr. Tomáš Svoboda, Ph.D., Plzeň
MUDr. Tomáš Šálek, Bratislava
prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D., Brno
doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D., Brno
prof. MUDr. Anna Vašků, CSc., Brno
prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc., dr. h. c., Brno
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc., Brno
doc. MUDr. Mária Wagnerová, CSc., Košice

Čestní členové redakční rady

prof. MUDr. Josef Bilder, CSc., Brno
prof. Sándor Eckhardt, Budapešť
prof. Jan Klasterský, Brusel

prof. MUDr. Josef Koutecký, DrSc., Praha
prof. RNDr. Jan Kovařík, DrSc., Brno
prof. MUDr. Zdeněk Mechl, CSc., Brno

MUDr. Jaroslav Němec, CSc., Brno
doc. MUDr. Ivan Pleško, DrSc., Bratislava
MUDr. Viliam Ujházy, DrSc., Bratislava

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2015

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně.

Registrační značka MK ČR 5158. ISSN 0862-495X. ISSN pro on-line přístup 1802-5307.

On-line verze je přístupná na adrese www.linkos.cz nebo www.klinickaonkologie.cz.

Časopis Klinická onkologie je uveden na Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR, schváleném Radou pro výzkum a vývoj vlády ČR.

Nakladatel: Ambit Media, a.s., Klicperova 604/8, 150 00 Praha 5-Smíchov, tel./fax: +420 222 352 573/572.

Odpovědná redaktorka: Mgr. Simona Nováková, e-mail: simona.novakova@ambitmedia.cz.

Adresa redakce: Ambit Media, a.s., Media Hall, Bidláky 20, 639 00 Brno.

Grafická úprava: Karel Zlevor. Jazyková korektura: Mgr. Alena Šmídová.

Vychází 6krát ročně. Předplatné na rok 2015 činí 540 Kč (22 eur).

Informace o předplatném podává a objednávky předplatitelů přijímá: e-mail: předplatne@ambitmedia.cz.

Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá: Mgr. Blanka Turínová, e-mail: blanka.turinova@ambitmedia.cz, tel.: +420 724 811 983.

Rukopisy vkládejte do redakčního systému: <http://redakce.ambitmedia.cz/ko>; případné dotazy směřujte na e-mail klinickaonkologie@mou.cz

Redakce časopisu Klinická onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, e-mail: klinickaonkologie@mou.cz.

Pokyny pro autory naleznete na www.linkos.cz v sekci časopisu nebo na www.klinickaonkologie.cz.

Toto číslo vychází 15. 9. 2015.

