

NOVÉ POZNATKY Z MOLEKULÁRNEJ BIOLÓGIE GERMINATÍVNYCH TUMOROV

UPDATES IN MOLECULAR BIOLOGY OF GERM CELL TUMORS

MEGO M.

NÁRODNÝ ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, KLENOVA 1, 833 10 BRATISLAVA, SLOVENSKO

Abstract: Germinatívne tumory (GT) sú nádory senzitívne na systémovú chemoterapiu, s možnosťou vyliečenia až 80% pacientov v metastatickom štádiu. Poznanie príčiny senzitivity GT na molekulárnej úrovni, môže byť prínosné aj v liečbe iných metastatických nádorov. Autori sa v práci sústreďujú na najnovšie pokroky v oblasti molekulárnej biológie germinatívnych nádorov. Hoci presný mechanizmus nádorovej transformácie nie je známy, množstvo dôležitých génov bolo identifikovaných ako p53, c-KIT, cyklín D2, EGFR, GRB7, VEGF. Napriek vysokej úspešnosti liečby častí pacientov ochoreniu nakoniec podľahne. Identifikácia mechanizmov rezistencie u GT na molekulárnej úrovni a ich ovplyvnenie modernou liečbou na báze monoklonálnych protilátok a targetovej liečby malými molekulami môže ďalej zlepšiť prežívanie postihnutých pacientov.

Kľúčové slová: germinatívny tumor, chemosenzitivita, angiogenéza, EGFR, cyklín, c-KIT

Summary: Germ cell tumors (GCTs) are malignancies sensitive to systemic chemotherapy. About 80% patients with metastatic disease are cured. The understanding of GCT's sensitivity to chemotherapy on molecular level could be of value in the development of new treatment strategies for other metastatic tumors as well. In this work, the authors are focusing on novel knowledge in the field of GCT's molecular biology. Although the exact mechanism of all processes involved in the tumor transformation are not fully understood, many genes were identified that are involved in this process, e.g. p53, c-KIT, cyclin D2, EGFR, GRB7, VEGF. Despite the existence of highly successful treatment of GCT, there are patients who ultimately succumb to their disease. Identification of exact molecular mechanisms is important in the development of new targeted therapies seeking to increase the patient's survival.

Key words: germ-cell tumor, chemosensitivity, angiogenesis, EGFR, cyclin, c-KIT

Germinatívne tumory (GT) sú najčastejšou malignitou mužov medzi 20 až 30 rokom života. Ich incidencia má stúpajúcu tendenciu. Predstavujú malignitu dobre reagujúcu na chemoterapiu, s možnosťou vyliečenia až 80% pacientov v metastatickom štádiu. Napriek tomu, že sa väčšina pacientov s metastatickým germinatívnym nádorom vylieči, u malého percenta sa choroba stáva chemorezistentná a pacienti jej podľahnú. Sú to hlavne pacienti s postihnutím viscerálnych orgánov iných ako pľúca, pacienti s extragonadálnym postihnutím a pacienti s výrazne zvýšenými nádorovými markermi (AFP - alfafetoproteín, b-HCG – humánný choriogonadotropín) (1). Charakterizácia nádoru na molekulárnej úrovni predstavuje významný pokrok v onkológií, ktorý umožňuje individualizáciu liečby. Aj v oblasti germinatívnych nádorov dochádza v súčasnosti k pribúdaniu poznatkov na genetickej úrovni.

Histologicky sa germinatívne tumory sa rozdeľujú do dvoch základných skupín; seminómov a neseminómov. Oba podtypy pochádzajú zo spoločnej totipotentnej zárodočnej bunky. Seminómy si zachovávajú morfológiu spermatogónií, kým neseminómy majú znaky embryonálnej (embryonálny karcinóm, teratóm), a extraembryonálnej diferenciácie (nádor žltokového vaku, choriokarcinóm) (2).

Vzniku GT predchádza väčšinou karcinóm in situ (CIS). Takmer 100% CIS lézií progreduje do invazívnych lézií. Pre spoločný pôvod seminómov a neseminómov svedčí cytologicky identická lézie karcinóm in situ (2).

V súčasnosti existujú dva modely, ktoré popisujú vznik GT. Podľa Skakkebaeka a kol. je spúšťačom parakrinná stimulácia fetálnych gonocytov. Táto stimulácia sa uskutočňuje prostredníctvom faktora stimulujúceho kmeňové bunky - SCF (stem cell factor), ktorý sa viaže na receptor kódovaný protoonkogénom c-KIT (viď nižšie). Takto stimulované gonocyty unikajú normálnemu vývoju smerom k spermatogóniám a dávajú

vznik CIS. Druhý model vychádza zo zvýšeného počtu kópií 12p chromozómu v germinatívnych nádoroch, zvýšenej expresie cyklínu D2 v CIS a nadmernej expresii divokého typu p53 (wild type p53). Podľa tohto modelu dochádza k chybné výmene chromatíd počas meiotického cross-overu na úrovni spermatocyty. Toto vedie k zdvojeniam 12p chromozómu, s následnou zvýšenou expresiou cyklínu D2, ktorého gén je lokalizovaný práve na 12p chromozóme. Takto zmenená bunka unikne apoptóze vďaka onkogénemu efektu cyklínu D2. Dochádza k chybné reinciácii bunkového cyklu a ku genómovej instabilite (3, 4, 5).

Existuje genetická predispozícia k vzniku germinatívnych nádorov. Epidemiologické štúdie ukázali, že súrodenci majú 8-10 krát vyššie riziko vzniku GT v porovnaní s bežnou populáciou. Deti postihnutých majú asi 4 – krát vyššie riziko. Zatiaľ bol identifikovaný jeden gén, zvyšujúci riziko k vzniku GT. Nachádza sa na chromozóme Xq27 – TGCT1 (testicular germ cell susceptibility gene 1). Tento gén je zodpovedný za predispozíciu ku kryptorchizmu. Pravdepodobne však existujú aj ďalšie gény susceptibility, ktoré však doteraz neboli identifikované (6,7).

Chemosenzitivita GT a mechanizmy rezistencie

Základom liečby testikulárnych nádorov je kombinovaná chemoterapia na báze cisplatiny a etoposidu, teda látok, pôsobiacich mechanizmom poškodenia DNA. Bunky derivované z testikulárnych nádorov sú dobre citlivé na podanie DNA poškodzujúcich cytostatík. Je však známe, že aj iné nádory ako napríklad urotelové sú spočiatku citlivé na chemoterapiu na báze platiny, ale časom dochádza u nich k selekcií rezistentných klonov. V laboratórnych podmienkach sú bunky z germinatívnych nádorov 2 – 4 x citlivejšie v porovnaní s bunkami iných tumorov na rôzne cytostatiká a žiarenie. Vystáva otázka, či takýto relatívne malý rozdiel in vitro sa môže pre-

mietnuť do výrazne odlišného klinického efektu? Ako príklad môže posloužiť rozdiel medzi bunkami nádoru močového mechúra a bunkami GT. Dávka cisplatinu schopná zničiť nádor obsahujúci 1012 germinatívnych buniek, čo predstavuje asi 1kg tumor, by bola schopná zničiť len približne 103 až 104 buniek nádoru močového mechúra. (8, 9, 10, 11).

Čo je príčinou takejto senzitivita GT? Skúmali sa rozdiely vo frekvenciách mutácií medzi testikulárnymi a chemorezistentnejšími nádormi, rozdiely medzi transportnými systémami, v detoxifikačných systémoch bunky avšak výraznejšie odlišnosti sa nepodarilo zistiť (12, 13). V posledných rokoch pribudli ďalšie poznatky na molekulárnej úrovni.

DNA opravné mechanizmy

Keďže cisplatin je DNA poškodzujúce cytostatikum, schopnosť bunky prežiť závisí od jej schopnosti opraviť DNA. Významnú úlohu v reparačných mechanizmoch predstavuje nukleotidový excízný reparačný systém (**NER – nucleotid excision repair system**). V experimente sa zistilo, že kým bunky napríklad urotelového nádoru sú schopné opravy väčšiny poškodenej DNA, u testikulárných nádorov zostáva DNA po podaní platiny poškodená (Bedford, 1988, Hill, 1994). Príčinou je výrazne znížená aktivita NER systému. In vitro štúdie poukazujú, že GT majú zníženú aktivitu až 3 proteínov zúčastnených na oprave DNA a to **XPA, ERC1-XPF a DNA ligáza III**. Práve táto skutočnosť je pravdepodobne jednou z príčin zvýšenej senzitivity GT na pôsobenie cytostatík (14, 15).

Mikrosatelitová instabilita predstavuje rozdiely v dĺžke krátkych repetitívnych sekvencií v genóme, a venuje sa jej pozornosť predovšetkým v súvislosti s kolorektálnym a ovariálnym karcinómom. Jej príčinou je mutácia v niektorom gène zúčastnenom na oprave DNA ako napríklad **MLH1, MSH2, MSH6**. Mayer so spolupracovníkmi zistili, že u 11 chemorezistentných nádorov bol mutovaný jeden (46% vs. 6%) alebo viac (36% vs. 0%) týchto génov v porovnaní s chemosenzitivnými nádormi. Mutácie v reparačných génoch vedú k nahromadeniu mutácií v celom genóme, čo v konečnom dôsledku vedie k vzniku rezistentnému fenotypu (16). Mayer a kol. skúmali tiež úlohu systémov zabraňujúcich kumulácií cytostatík v bunke ako **P-glykoproteínu, MRP** (multiple resistance protein), **LRP** (lung resistance protein) avšak nezistili rozdiel medzi chemorezistentnými a chemorefraktérnymi GT. Výnimkou bola vyššia pozitivita MRP, LRP u zreľých teratómov, ktorú potvrdil aj vo svojej práci aj Mandoki (17,18). Zároveň expresia LRP bola spojená s rezistenciou na liečbu a horším prežívaním pacientov (18).

EGFR/ HER-2/neu

Expresia epidermálneho rastového faktora a jeho receptora (EGFR) je v mnohých nádoroch spojená s horšou prognózou, čo do určitej miery súvisí s redukovanou pohotovosťou buniek k apoptóze. Táto expresia sa v posledných rokoch skúmala aj u testikulárných nádorov. Približne 20 - 25% neseminómov má zvýšenú expresiu EGFR resp. HER-2-neu imunohistochemickým vyšetrením (19-23). Len v jednej z týchto štúdií sa overoval výsledok imunohistochemie aj fluorescentnou in situ hybridizáciou (FISH) (23), ktorá však tento výsledok nepotvrdila. Zvýšená expresia HER-2 a EGRF je prítomná oveľa častejšie u pokročilých metastatických nádorov. Madani zistil, že z 23 chemorefraktérnych pacientov expimovalo EGRF až 65% (19). Kollmannsberger analyzoval biopsie od 32 pacientov z toho 22 chemorezistentných avšak expresiu EGFR len 20% pacientov, bez vzťahu k odpovedi na liečbu (24). Vo väčšine prác bola expresia EGFR spojená s produkciou b-HCG, a bola častejšia u choriokarcinómu, resp. buniek syncytiotrofoblastu. Títo pacienti majú aj zvyčajne horšiu prognózu (20,21,25). Seminómy nevykazovali expresiu EGFR /HER-2, čo opäť koreluje s ich lepšou odpoveďou na liečbu a celkovo lepšou prognózou. Použitie inhibítorov EGFR, by mohla byť jedna z možností ako ovplyvniť prognózu časti pacientov. V literatúre je

popísaná kazuistika objektívnej odpovede na trastuzumab u chemorefraktérneho germinatívneho tumoru (26).

GRB7 je adaptorová molekula, ktorá okrem iného cez Src-2 doménu interaguje s cytoplazmatickou doménou receptora pre rastový faktor EGFR2. Podiela sa na prenose signálu do bunky. Jej zvýšená expresia môže mať pre bunku podobné následky ako nadmerná expresia samotného EGFR. Zvýšený prepis GRB7 sa zaznamenal u karcinómu prsníka, ezofágu a žalúdka. Skotheim a kol. zistili jej zvýšenú expresiu pomocou cDNA microarray techniky u 15 germinatívnych tumorov (27). Podobne ako v prípade EGFR, aj expresia GRB7 bola zvýšená hlavne u neseminómov (27, 28).

c-KIT je protoonkogén kódujúci transmembránový tyrozínkinázový receptor, ktorý zohráva úlohu aj v normálnej spermatogenéze. Exprimuje sa do 12 týždňa na fetálnych germinatívnych buniek. Membránovo sa vyskytuje u CIS a väčšiny seminómov, ale absentuje u neseminómov, kde je však zvýšene exprimovaný jeho ligand SCF (29). Mutácie c-KIT sú okrem gastrointestinálnych stromálnych tumorov, chronickej myeloidnej leukémie a mastocytózy prítomné tiež u 12 - 25% seminómov vychádzajúcich zo semeníkov a u 50% primárnych mediastinálnych seminómov (30-32). Mutácie citlivé na podanie STI-571 (Gleevec) však tvoria len menšiu časť z nich. Spektrum mutácií mediastinálnych a testikulárných seminómov sa ukazuje ako odlišné. Treba však rešpektovať nedostatočnú veľkosť doteraz analyzovaných súborov. Loojenga a kol. zistili prítomnosť somatickej mutácie c-KIT v 17 exone, kódovanej 816 u 93% pacientov s bilaterálnym tumorom testis, v porovnaní s 1% u unilaterálnych tumorov (33). Podobne Rapley a kol. zistili štatisticky významný rozdiel medzi somatickou mutáciou c-KIT u unilaterálnych a bilaterálnych tumorov. Analýza 240 rodokmeňov s dvoma a viac prípadmi GT ukázala neprítomnosť zárodočnej mutácie. Uvedené výsledky ukazujú, že somatické mutácie c-KIT sú zahrnuté v určitom percente prípadov sporadických, ale aj familiárných GT. Podporuje to tiež hypotézu, že ku c-KIT mutáciám dochádza primárne počas embryogenézy, keďže primordiálne germinatívne bunky s c-KIT mutáciou sú prítomné v oboch semeníkoch. Tento výsledok môže mať aj priamy klinický význam, pretože pacienti s touto mutáciou sú kandidátmi na profylaktickú liečbu s cieľom predísť bilaterálnemu nádoru (28).

Cyklín D2 je proteín úzko zapojený do regulácie bunkového cyklu. Viazá sa na cyklín-dependentné kinázy (cdk). Touto väzbou vytvára aktívny komplex regulujúci tumor supresorový gén pRB (retinoblastóm) a kontroluje tak G1-S bod bunkového cyklu. Jeho prítomnosť je potrebná pre normálnu spermatogenézu, avšak významnú úlohu zohráva aj patogeneze GT. Gén kódujúci cyklín D2 je lokalizovaný na krátkom ramene chromozómu 12. Takmer 100% GT má zvýšený počet kópií 12p, či už cestou izochromozómu 12, v ktorom sú fúzované 2 krátke ramená chromozómu 12 alebo formou tandemovej duplikácie 12p. Tento chromozómový marker je už prítomný v CIS. Svedčí to o tom, že táto aberácia je skorým javom v testikulárnej onkogenéze. Schmidt zistil zvýšenú expresiu cyklínu D2 u 69% GT, pričom 41% nádorov zároveň vykazovala zvýšenú expresiu cdk4 (34). Analýza inhibítorov cdk nepriniesla jednoznačné výsledky v porovnaní s cyklínom D2 a cdk4 (35,36).

Angiogenéza je dôležitá súčasť rastu a progresie nádorov. U germinatívnych nádorov boli analyzované viaceré angiogénne faktory ako napríklad vaskulárny endotelialný rastový faktor, (**VEGF**), angiogenetický protoonkogén **est-1**, ďalej gény **flt, flk**, thymidine phosphorylase platelet-derived endothelial cell growth factor (**TP – PD-ECGF**) a **mikrovaskulárna denzita**. V publikovaných prácach bola korelácia medzi metastatickým nádorom, expresiou VEGF, protokogénom ets-1 a mikrovaskulárnou denzitou. Uvedené proteíny boli významne častejšie exprimované u nádorov s teratómovou komponentou a neseminómov v porovnaní so seminómami (37-39). Vzhľadom na dostupnosť inhibítorov angiogenézy

(bevacizumab) a toxicitu neprekryvajúcu sa s konvenčnou chemoterapiou stojí za zváženie ich použitie u pacientov s expresiou týchto faktorov.

Apoptóza. Väčšina cystostatík zabíja bunky aktiváciou apoptózy. To, či k nej naozaj dôjde závisí aj od samotnej bunky. Len samotné spustenie apoptózy vedie k eradikácii malígneho bunkového klonu. Niekoľko génov zohráva kľúčovú úlohu v procese apoptózy, predovšetkým p53, BCL-2, BAX, BCL-X(L). Tieto gény boli predmetom intenzívneho výskumu aj u GT.

Úloha **p53** u GT sa extenzívne študovala. TP53 je tumor supresorový gén, ktorého normálna funkcia je kľúčová z hľadiska udržania integrity genómu a je dôležitý z hľadiska indukcie apoptózy po poškodení DNA chemoterapiou. Je mutovaný vo viac ako 50% ľudských malígnií. Na druhej strane v prevažnej väčšine GT je p53 nemutovaný s vysokou hladinou, v porovnaní s inými tkanivami, relatívne nižšou u zreých teratómov (40). Predpokladalo sa že práve funkčný p53 u GT môže byť zodpovedný za výbornú odpoveď na chemoterapiu. Mutácia p53 môže viesť k neschopnosti spustiť apoptotickú odpoveď a následnú rezistenciu na cytostatiká. Houldsworth a kol. zistili zvýšenú frekvenciu mutácií p53 v biopických vzorkách u chemorezistených pacientov (41). Zistila sa korelácia medzi apoptotickým indexom a divokým typom p53 (17). Na druhej strane je popísaných aj mnoho chemorezistených GT bez mutácie p53, preto je pravdepodobné, že existujú aj alternatívne mechanizmy rezistencie (42). Vysoká expresia p53 v GT súvisí skôr s prirodzenou náchylnosťou germinatívnych buniek k apoptóze, ale nevysvetľuje senzitivitu k chemoterapii na báze platiny. Inaktivácia p53 vo forme mutácií, alebo zvýšenej degradácií napr. cestou protoonkogén mdm-2 (viď nižšie), má len parciálny význam pri vzniku rezistencie na chemoterapiu (42).

Ďalší faktor, ktorý ovplyvňuje spustenie apoptózy po celulárnom poškodení sú gény BCL rodiny. Je známe, že zvýšená expresia **BCL-2** chráni bunky pred apoptózou, avšak definitívna odpoveď závisí od pomeru proapoptotických a antiapoptotických molekúl. GT vykazujú nízke hladiny antiapoptotických proteínov BCL-2, BCL-X(L) a relatívne vysoké hladiny proapoptotického **BAX**, čo tiež vysvetľuje chemosenzitivitu GT (43). V experimente umelo zvýšená expresia BCL-2 nevedla k prevencii apoptózy, ale k zníženiu hladiny BCL-X(L) čo paradoxne viedlo k pro-apoptotickému efektu (44).

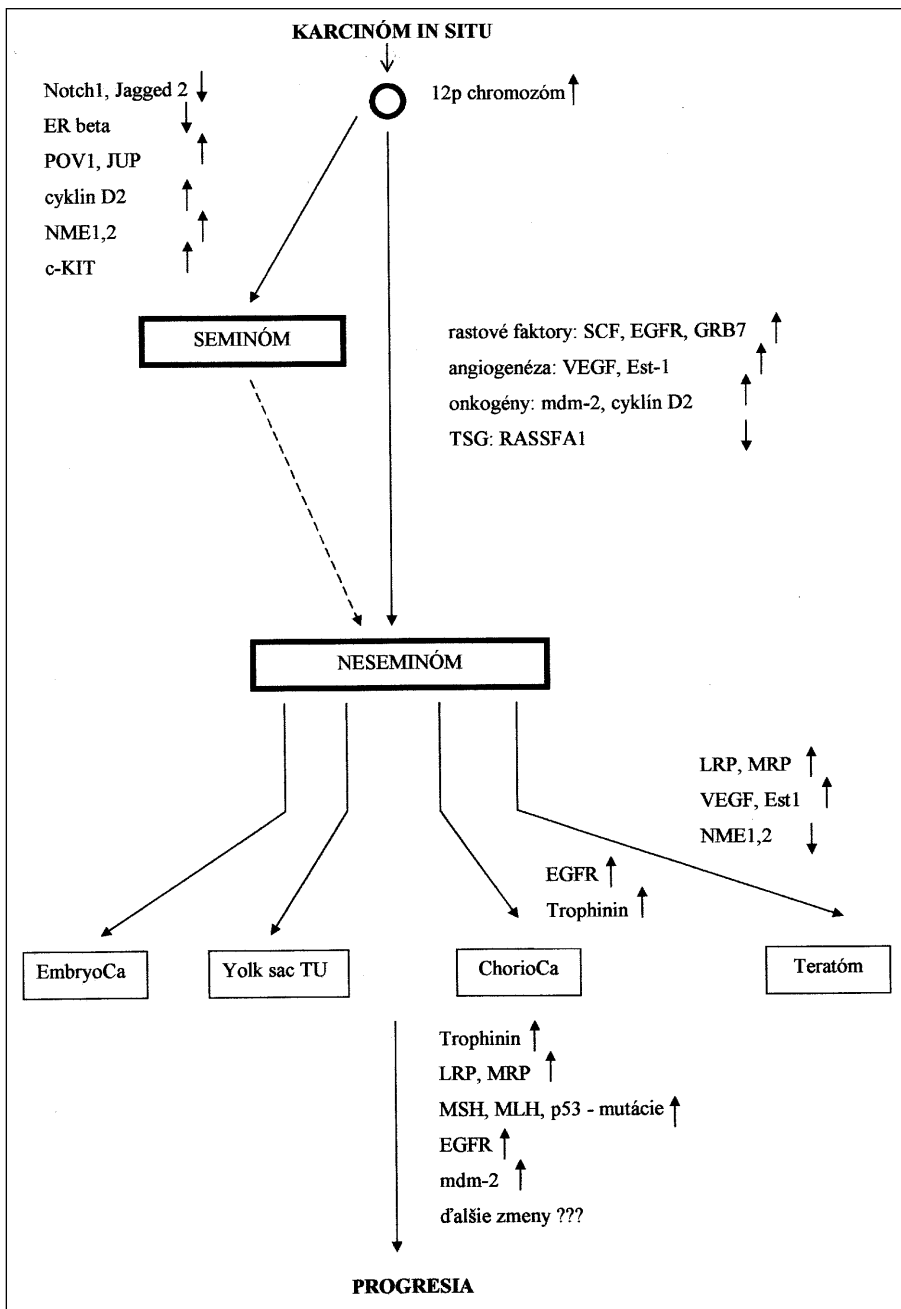
Ďalšie gény

U GT sa tiež zistovala prítomnosť celého radu ďalších génov (Tabuľka č. 1 a 2). V súčasnosti však väčšina týchto výsledkov ešte nemá

priamy klinický dopad, a interpretácia ich prítomnosti resp. neprítomnosti v nádorovom tkanive nemá odraz v liečebnej stratégii (Obrázok č. 1).

Trophinin je membránový proteín, ktorý sa zúčastňuje na implantácii embrya v maternici. Je zodpovedný za väzbu medzi bunkou trofoblastu a endometriálnou bunkou. Embryo produkuje b-HCG, a indukuje expresiu trophoninu materskými bunkami. Vzhľadom na analógiu medzi implantáciou embrya a metastazovaním GT Hatakeyama a kol. skúmali expresiu trophoninu u germinatívnych nádorov pomocou imunohistochemie. Zistili koreláciu medzi klinickým štádiom a syntézou trophoninu, ktorý bol prítomný u 43% vzoriek od pacientov v štádiu I, 58% v štádiu II a 95% v štádiu III. Všetci pacienti s pľúcnyimi metastázami exprimovali trophonin. Transfekcia bunkovej línie derivovanej z testikulárneho nádoru (JKT-1-mock) vektorom obsahujúcim gén pre trophonin viedla k zvýšeniu invazivity týchto buniek. Inokulácia JKT-1-mock buniek s trophoninom athymickým myšiam spôsobila vznik

Obrázok č. 1: Hypotetický model progresie germinatívnych tumorov. Blížšie vysvetlenie v texte.



Tabuľka č. 1: Expressia génov zúčastnených na vzniku germinatívnych tumorov, podľa histologického nálezu.

gén	status	zdravé tkanivo	seminóm	neseminóm	embryo Ca	yolk sac TU	chorio Ca	teratóm p	b-HCG produkcia	citácia
notch1	expresia	+	-		+		+	+		50
jagged2		+	-		-		-	+		50
Trophinin		-					+		+	45
LRP		-						+		17,18
MRP		-						+		17
ERbeta		+	-		-	+	-	+	-	51
SCF		-	-/+	+						28
EGFR		-	-	20-25%			+		+	20, 21, 22
GRB7		-	-	+						23, 24, 27, 28
POV1		-	+	-						27
cyklín D2		-	++	+						34
VEGF		-	-	+				+		37,38,39
est-1		-	-	+				+		37,38,39
BCL-2		-	-	-						43
BAX		+	+	+						43
mdm-2		-	+	++						46
NME1, 2			+++	++				znižená		48
JUP			+							27
c-KIT	expresia	-	84%	-						28
c-KIT	mutácie	-	12-25%	-						30, 31, 32
RASSFA1	inaktivácia	-	40%	83%						49
pRB	inaktivácia	-	+		+					35,36

Tabuľka č. 2: Expressia génov zúčastnených na vzniku germinatívnych tumorov, podľa klinického priebehu.

gén	status	štádium I	štádium II	štádium III	pľúcne mts.	CHT senz.	CHT rez.	citácia
Trophinin	expresia	40%	58%	95%	100%			45
LRP	expresia						+	18
MSH, MLH	inaktivácia					0-6%	36-46%	17
EGFR	expresia			+			20-65%	19, 20, 21, 23, 24
mdm-2	expresia	+	++	+++				46

Vysvetlivky: mts – metastázy, CHT senz. – senzitivne na podanie chemoterapie, CHT rez. - rezistentné na podanie chemoterapie

pľúcnych metastáz, kým inokulácia týchto buniek bez trophoninu nebola spojená so vznikom metastáz (45). Tieto výsledky poukazujú, že trophonin môže byť vhodným terčom pre cielelnú protinádorovú liečbu.

Proteín p53 zvyšuje expresiu **Mdm-2** génu (ubiquitin ligase mouse double minute-2), ktorý následne zvyšuje deštrukciu p53, mechanizmom negatívnej spätnej väzby. Mdm-2 je protoonkogén, ktorý sa viaže na transaktivačnú doménu p53, čím ju jednak priamo inaktívuje, jednak spôsobuje zvýšené odbúravanie p53 v proteazóme po označení ubikvitínom. Aktivácia mdm-2 môže tak predstavovať ďalší spôsob k zníženiu aktivity p53. Mdm-2 onkogén je zvýšene exprimovaný u 56% analyzovaných GT. Jeho hladina bola vyššia z neseminómov a tiež u metastatických nádorov (46). U premaligných lézií bola prítomná len u 7% vzoriek. Tieto fakty svedčia pre význam mdm-2 v progresii na nádorový fenotyp (47).

Gény **NME1** a **NME2** kódujú transkripčné faktory (Nm23) negatívne regulujúce diferenciáciu. Neprekvapuje preto, že sa zistila ich nadmerná expresia u 65% nádorov, hlavne u seminómov, menej u embryonálnych karcinómov, kým u teratómov bola znížená (48).

Analýza ďalších génov zúčastnených regulácie bunkového cyklu ukázala že tumor supresorový gén pre retinoblastóm **pRb** vykazuje slabú expresia v CIS, seminómoch embryonálnych karcinómoch (35,36). Ďalším tumor supresorovým génom, ktorý je inaktívovaný u GT je gén **RASSF1A**. Neaktívny je u 40% seminómov a až u 83% neseminómov. Predpokladá sa, že inaktivácia tohto génu je skorým javom germinatívnej tumorigenézy (49).

Notch signálny systém reguluje procesy delenia a diferenciácie bunky. Expressia receptora **Notch 1** a jeho ligandu **Jagged 2** je prí-

tomná v zdravom tkanive semeníkov a u teratómov. U seminómom je neprítomná, kým embryonálny karcinóm a choriokarcinóm exprimujú Notch 1 receptor (50) avšak jeho ligand nie.

Pohlavné hormóny, predovšetkým expozícia estrogénom je spojená so zvýšeným rizikom vzniku germinatívnych nádorov. Ich efekt sa uskutočňuje prostredníctvom receptorov. Estrogénový receptor alfa nie je prítomný v normálnom tkanive semeníkov ani u GT. **Estrogénový receptor beta** je syntetizovaný v zdravom tkanive, nádoroch žltkového vaku a teratómoch. Naopak jeho syntéza je výrazne znížená u seminómov, embryonálnych karcinómov a zmiešaných germinatívnych nádorov (51). Giwercman a kol. sledovali prítomnosť repetitívnych sekvencií CAG a CGN v géne kódujúcom receptor pre androgény. Dĺžka CAG repetícií bola signifikantne vyššia u metastazujúcich nádorov (52).

Skotheim a kol. zistili zvýšenú expresiu **JUP onkogénu** (junctional plakoglobín) patriaceho do katenínovej rodiny. Gény tejto rodiny hrajú úlohu v medzibunkovej komunikácii, adhéziách cez väzbu na kadheríny, tvoria tiež súčasť cytoskeletu bunky. Onkogénny potenciál JUP génu sa realizuje cez vplyv na Wnt signálnu dráhu, ktorá zohráva významnú úlohu predovšetkým v kolorektálnej karcinogéze. Jej význam v patogeneze GT ostáva nejasný. Expressia JUP je prítomná u seminómov. Taktiež premaligne intratubulárne neoplázie boli JUP pozitívne. Podobne aj ďalší proteín – **POV1 (prostate cancer overexpressed gene)** sa vysoko exprimuje u seminómov, avšak nie u neseminómov ani v normálnom tkanive. Predpokladá sa, že ide o gén, uplatňujúci sa vo včasných štádiách vzniku seminómu. Analogicky prekurzorové lézie karcinómu prostaty majú zvýšenú expresiu POV1. Bližšia funkcia tohto génu ešte nie je dostatočne objasnená (53).

Záverom môžeme konštatovať, že napriek vysokej účinnosti chemoterapie u pacientov s metastatickým germinatívnym nádorom časť pacientov ochoreniu podľahne. Použitie liečby na báze monoklonálnych protilátok, a targetovej liečby malými molekulami u hematologických malignít, karcinómu prs-

níka, kolorektálneho karcinómu pomohlo zlepšiť prognózu pacientov s týmito nádormi. Možno predpokladať, že poznanie a charakterizácia germinatívnych nádorov na génovej a molekulárnej úrovni umožní podobný cieleňý zásah do ich patogenézy s následným klinickým benefitom pre pacienta.

Literatúra

1. Bosl GJ, Geller NL, Cirrincione C, Vogelzang NJ, Kennedy BJ, Whitmore WF Jr, Vugrin D, Scher H, Nisselbaum J, Golbey RB.: Multivariate analysis of prognostic variables in patients with metastatic testicular cancer. *Cancer Res.* 43, 1983, 3403-3407
2. Ulbright T.: Germ cell neoplasms of the testis. *Am J Surg Pathol.* 17, 1993, 1075-1091
3. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Carlsen E, Petersen PM, Giwercman A, Andersen AG, Jensen TK, Andersson AM, Muller J. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS.* 106., 1998, 3-11
4. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Muller J. Carcinoma in situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursors of all types of germ cell tumors except spermatocytoma. *Int J Androl.* 10, 1987, 19-28
5. Chaganti RSK, Houldsworth J. The cytogenetic theory of the pathogenesis of human adult male germ cell tumors. *APMIS.* 106, 1998, 80-83
6. Kawakami T, Okamoto K, Sugihara H, Hattori T, Reeve AE, Ogawa O, Okada Y.: The roles of supernumerical X chromosomes and Xist expression in testicular germ cell tumors. *J Urol.* 169, 2003, 546-1552
7. Holczak MF, Rapley EA, Hoekstra HJ, Sleifer DT, Nolte IM, Sijmons RH.: Genetic predisposition to testicular germ-cell tumors. *Lancet Oncol.* 5, 2004, 363 - 371
8. Oosterhuis JW, Andrews PW, Knowles BB, Damjanov I.: Effects of cisplatinum on embryonal carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer.* 34, 1984, 133-139
9. Walker MC, Parris CN, Masters JRW, Differential sensitivities to chemotherapeutic drugs between testicular and bladder cancer cells, *J Natl Cancer Inst.* 79, 1987, 213-216
10. Pera MF, Friedlos F, Mills J, Roberts JJ.: Inherent sensitivity of cultured human embryonal cells to adducts of cis-diaminedichloroplatinum (II) on DNA. *Cancer Res.* 47, 1987, 6810 - 6813
11. Fry AM, Chresta CM, Davies SM, Walker MC, Harris AL, Hartley JA, Masters JR, Hickson ID.: Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51, 1991, 6592-6595
12. Parris CN, Walker MC, Masters JRW, Arlett CF.: Inherent sensitivity and induced resistance to chemotherapeutic drugs and irradiation in human cancer cell lines: relationship to mutation frequencies. *Cancer Res.* 50, 1990, 7513-7518
13. Masters JRW, Koberle B.: Curing metastatic cancer: Lessons from testicular germ-cell tumours. *Nature reviews.* 3, 2003, 517-525
14. Koberle B, Masters JRW, Hartley JA, Wood RD.: Reduced repair of cisplatin-induced DNA damage in testicular germ cell tumours due to specific protein defect. *Curr Biol.* 9, 1999, 273-276
15. Cleaver JE, Karplus K, Kashani-Sabet M, Limoli CL.: Nucleotide excision repair a legacy of creativity. *Mutat Res.* 485, 2001, 23-26
16. Mayer F, Gillis AJ, Dinjens W, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH. Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res.* 62, 2002, 2758-2760
17. Mayer F, Stoop H, Scheffer GL, Scheper R, Oosterhuis JW, Looijenga LH, Bokemeyer C. *Clin Cancer Res.* Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. 9, 2003, 767-773
18. Mandoky L, Gecezi L, Doleschall Z, Bodrogi I, Csuka O, Kasler M, Bak M. Expression and prognostic value of the lung resistance-related protein (LRP) in germ cell testicular tumors. *Anticancer Res.* 24, 2004, 1097-104.
19. Madani A, Kemmer K, Sweeney C, Corless C, Ulbright T, Heinrich M, Einhorn L. Expression of KIT and epidermal growth factor receptor in chemotherapy refractory non-seminomatous germ-cell tumors. *Ann Oncol.* 14, 2003, 873-880
20. Mandoky L, Gecezi L, Bodrogi I, Toth J, Bak M.: Expression of HER-2/neu in testicular tumors. *Anticancer Res.* 23, 2003, 3447 - 3451
21. Moroni M, Veronese S, Schiavo R, Carminati O, Sorensen BS, Gambacorta M, Siena S.: Epidermal growth factor receptor expression and activation in nonseminomatous germ cell tumors. *Clin Cancer Res.* 7, 2001, 2770 - 2775
22. Shuin T, Misaki H, Kubota Y, Yao M, Hosaka M.: Differential expression of protooncogenes in human germ cell tumors of the testis. *Cancer.* 73, 1994, 1721 - 1727
23. Soule S, Baldridge L, Kirkpatrick K, Cheng L, Gilbert JL, Smith LR, Thurston VC, Vance GH, Einhorn L, Miller K.: HER-2/neu expression in germ cell tumors. *J Clin Pathol.* 55, 2002, 656-658
24. Kollmannsberger C, Mayer F, Pressler H, Koch S, Kanz L, Oosterhuis JW, Looijenga LH, Bokemeyer C.: Absence of c-KIT and members of the epidermal growth factor receptor family in refractory germ cell cancer. *Cancer.* 95, 2002, 301-308
25. Hechelhammer L, Storkel S, Odermatt B, Heitz PU, Jochum W.: Epidermal growth factor receptor is a marker for syncytiotrophoblastic cells in testicular germ cell tumors. *Virchows Arch.* 443, 2003, 28-31
26. Kollmannsberger C, Pressler H, Mayer F, Kanz L, Bokemeyer C.: Cisplatin-refractory, HER2/neu-expressing germ-cell cancer: induction of remission by the monoclonal antibody Trastuzumab. *Ann Oncol.* 10, 1999, 1393-1394
27. Skotheim RI, Abeler VM, Nesland JM, Fossa SD, Holm R, Wagner U, Florenes VA, Aass N, Kallioniemi OP, Lothe RA. Candidate genes for testicular cancer evaluated by in situ protein expression analyses on tissue microarrays. *Neoplasia.* 5, 2003, 397 - 404
28. Rapley EA, Hockley S, Warren W, Johnson L, Huddart R, Crockford G, Forman D, Leahy MG, Oliver DT, Tucker K, Friedlander M, Phillips KA, Hogg D, Jewett MA, Lohynska R, Daugaard G, Richard S, Heidenreich A, Gecezi L, Bodrogi I, Olah E, Ormiston WJ, Daly PA, Looijenga LH, Guilford P, Aass N, Fossa SD, Heimdal K, Tjulandin SA, Liubchenko L, Stoll H, Weber W, Einhorn L, Weber BL, McMaster M, Greene MH, Bishop DT, Easton D, Stratton MR.: Somatic mutations of KIT in familial testicular germ cell tumours. *Br J Cancer.* 90, 2004, 2397 - 2401
29. Rajpert-de Meyts E, Skakkebaek NE. Expression of the c-kit protein product in carcinoma in situ and invasive testicular germ cell tumors. *Int J Androl.* 17, 1994, 85-92
30. Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, McGreevey L, Haley A, Griffith D, Cummings OW, Wait C, Town A, Heinrich MC. KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol.* 164, 2004, 305-313
31. Przygodski RM, Hubbs AE, Zhao FQ, O'Leary TJ.: Primary mediastinal seminomas: evidence of single and multiple KIT mutations. *Lab Invest.* 82, 2002, 1369-1375
32. Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Saito K. Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. *Cancer Sci.* 94, 2003, 486-491
33. Looijenga LH, de Leeuw H, van Oorschot M, van Gurp RJ, Stoop H, Gillis AJ, de Gouveia Brazao CA, Weber RF, Kirkels WJ, van Dijk T, van Lindern M, Valk P, Lajos G, Olah E, Nesland JM, Fossa SD, Oosterhuis JW. Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Res.* 63, 2003, 7674-7678
34. Schmidt BA, Rose A, Steinhoff C, Strohmeyer T, Hartmann M, Ackermann R.: Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors. *Cancer Res.* 61, 2001, 4214-4221
35. Bartkova J, Thullberg M, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J.: Lack of p19 INK4d in human testicular germ-cell tumours contrasts with high expression during normal spermatogenesis. *Oncogene.* 19, 2000, 4146-4150
36. Jones RH, Vasey PA. New directions in testicular cancer; molecular determinants of oncogenesis and treatment success. *Eur J Cancer.* 39, 2003, 147-156
37. Adam M, Schmidt D, Wardelmann E, Wernert N, Albers P.: Angiogenic protooncogene ets-1 induced neovascularization is involved in the metastatic process of testicular germ cell tumors. *Eur Urol.* 44, 2003, 329 - 336
38. Fukuda S, Shirahama T, Imazono Y, Tsushima T, Ohmori H, Kayajima T, Take S, Nishiyama K, Yonezawa S, Akiba S, Akiyama S, Ohi Y.: Expression of vascular endothelial growth factor in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer.* 85, 1999, 1323 - 1330
39. Jones A, Fujiyama C, Turner K, Fuggle S, Cranston D, Turley H, Valtola R, Bicknell R, Harris AL.: Angiogenesis and lymphangiogenesis in stage 1 germ cell tumours of the testis. *BJU Int.* 86, 2000, 80 - 86
40. Lutzker SG, Levine AJ.: A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells os inactivated either by DNA damage or cellular differentiation. *Nat Med.* 2, 1996, 804-810
41. Houldsworth J, Xiao H, Murty VV, Chen W, Ray B, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS.: Human germ cell tumour resistance to TP53 mutation. *Oncogene.* 16, 1998, 2345-2349
42. Kersemaekers AM, Mayer F, Molier M, van Weeren PC, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH.: Role of p53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol.* 20, 2002, 1551-1561
43. Chresta CM, Masters JR, Hickman JA.: Hypersensitivity of human testicular tumours to etoposide induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer Res.* 56, 1996, 1834-1841
44. Arriola EL, Rodriguez-Lopez AM, Hickman JA, Chresta CM. Bcl-2 overexpression results in reciprocal downregulation of Bcl-X(L) and sensitizes human testicular germ cell tumours to chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene.* 18, 1999, 1457-1464
45. Hatakeyama S, Ohyama C, Minagawa S, Inoue T, Kakinuma H, Kyan A, Arai Y, Suga T, Nakayama J, Kato T, Hachubi T, Fukuda MN. Functional correlation of trophinin expression with the malignancy of testicular germ cell tumor. *Cancer Res.* 140, 2004, 4257-62.
46. Bak M, Gecezi L, Institioris E, Eid H, Bodrogi I.: The clinical value of mdm-2 (proto-oncogene) expression in testicular cancer, Correlation with tumor progression. *Orv Hetil.* 140, 1999, 1837-1840
47. Datta MW, Macri E, Signoretti S, Renshaw AA, Loda M. Transition from in situ to invasive testicular germ cell neoplasia is associated with the loss of p21 and gain of mdm-2 expression. *Mod Pathol.* 14, 2001, 437-442
48. Schmidt B, Ackermann R, Hartmann M, Strohmeyer T.: Alterations of metastasis suppressor gene nm23 and proto-oncogene c-myc in human testicular germ cell tumors. *J Urol.* 158, 1997, 2000-2005
49. Honorio S, Agathangelou A, Wernert N, Rothe M, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. *Oncogene.* 22, 2003, 461-466
50. Hayashi T, Yamada T, Kageyama Y, Kihara K. Expression failure of the notch signaling system is associated with the pathogenesis of testicular germ cell tumor. *Tumour Biol.* 25, 2004, 99-105
51. Pais V, Leav I, Lau KM, Jiang Z, Ho SM. Estrogen receptor-beta expression in human testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res.* 9, 2003, 4475-4482
52. Giwercman A, Lundin KB, Eberhard J, Stahl O, Cwikiel M, Cavallin-Stahl E, Giwercman YL. Linkage between androgen receptor gene CAG trinucleotide repeat length and testicular germ cell cancer histological type and clinical stage. *Eur J Cancer.* 40, 2004, 2152-2158
53. Skotheim RI, Monni O, Mousseis S, Fossa SD, Kallioniemi OP, Lothe RA, Kallioniemi A.: New insights into testicular germ cell tumorigenesis from gene expression profiling. *Cancer Res.* 62, 2002, 2359-2364