

KLINICKÁ ONKOLOGIE

RECAMO2020:
cestou výzkumu rakoviny k aplikované molekulární onkologii III

RECAMO2020:
through Cancer Research towards Applied Molecular Oncology III

Michalová E., Hrstka R. et al



Editorial 2019

Vážení čtenáři,

je tomu již téměř deset let, kdy bylo Masarykovým onkologickým ústavem (MOÚ) založeno Regionální centrum aplikované molekulární onkologie (RECAMO), a to díky dotaci 281 744 872 Kč (financováno z 85 % z fondů EU a z 15 % ze státního rozpočtu ČR) v letech 2010–2014. Jejím poskytovatelem byl Evropský fond pro regionální rozvoj a státní rozpočet ČR cestou Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace projektu číslo CZ.1.05/2.1.00/03.0101. V roce 2015 pak projekt RECAMO přešel v podobě fyzicky již vybudovaného a fungujícího centra na nový, navazující projekt RECAMO2020 (č. projektu LO1413) podpořený Národním programem udržitelnosti I o celkové finanční podpoře ve výši 114 470 000 Kč, s čerpáním poskytnuté podpory ze státního rozpočtu do 31. 12. 2019 s významnou spoluúčástí mateřské instituce, MOÚ. Oba projekty byly zaměřeny na moderní onkologický výzkum prováděný s využitím nově vybudované výzkumné infrastruktury RECAMO (www.recamo.cz). Významným milníkem vývoje RECAMO bylo následné vybudování edukačního centra RECAMO/ELU v prostorách terasy Švejdova pavilonu MOÚ, což reflektovalo potřebu navýšení prostorových kapacit ústavu pro výuku studentů všech stupňů vč. výuky postgraduální, a dále intenzivně se rozvíjející mezinárodní spolupráce s řadou evropských organizací (OECI, BBMRI-ERIC, ECRIN-ERIC a další).

Masarykův onkologický ústav, dlouhodobý člen OECI (Organization of European Cancer Institutes), je institucí zaujímající již po několik desetiletí přední místo v komplexní léčbě a výzkumu rakoviny a v současné době představuje největší komplexní onkologické centrum v ČR. RECAMO bylo od svého vzniku koncipováno jako integrální organizační jednotka ústavu, kterou tvoří multidisciplinární skupina odborně různě zaměřených výzkumných pracovníků a lékařských specialistů. Jejich společným cílem je klinická aplikace informací získaných studiem definovaných oblastí výzkumu nádorů. RECAMO se věnuje širokému rozmezí aktivit – od výzkumu v oblastech nádorové biologie, patologie, regulace buněčné proliferace, imunobiologie, příčin vzniku a vývoje nádorového onemocnění nebo buněčné odpovědi na vnější poškození přes vývoj potenciálních screeningových anebo diagnostických metod či nových látek s potenciálním protinádorovým účinkem až po klinická hodnocení fáze I/II. RECAMO dlouhodobě rozvíjí inovativní a vysoce kvalitní výzkum v oblasti molekulární onkologie s cílem aplikovat získané výsledky v rychle se vyvíjejícím prostředí personalizované onkologie. Z dlouhodobých výzkumných aktivit lze jmenovat např. studium chaperonů a ko-chaperonů nebo úlohu proteinů rodiny p53 v nádorech.

V souhrnu lze konstatovat, že RECAMO od počátku usiluje o a) transparentní onkologický výzkum zaměřený na kvalitu s potenciálem praktické aplikace, b) součinnost výzkumných infrastruktur, jako jsou banky biologického materiálu BBMRI (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure) a akademická klinická hodnocení CZECRIN s výzkumnými aktivitami zaměřenými na řešení konkrétních výzkumných otázek, c) mezinárodní konkurenceschopnost, která přitáhla pozornost mnoha domácích i zahraničních vědeckých pracovníků nejvyšší úrovně a jejímž výsledkem je řada výsledků publikovaných v prestižních odborných časopisech (viz www.recamo.cz).

*Za výzkumný i realizační tým
doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D.
výkonný ředitel RECAMO*



RECAM 

Regionální centrum
aplikované molekulární
onkologie



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Obsah | Contents

Editorial 2019	3S3
Méně časté mutace EGFR v kontextu léčby nemalobuněčného karcinomu plic	3S6
Uncommon EGFR Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Impact on the Treatment Bílek O., Holánek M., Berkovcová J., Horký O., Kazda T., Čoupková H., Špelda S., Kristková L., Zvaríková M., Podhorec J., Bořilová S., Bohovicová L., Zdražilová-Dubská L.	
CRISPR-Cas9 jako nástroj v terapii nádorových onemocnění	3S13
CRISPR-Cas9 as a Tool in Cancer Therapy Zatloukalová P., Krejčíř R., Valík D., Vojtěšek B.	
Syntetická letalita – její současné využití a potenciál v onkologické léčbě	3S19
Synthetic Lethality – Its Current Application and Potential in Oncological Treatment Bortlíková L., Müller P., Vojtěšek B., Rak V., Svoboda M.	
Pokroky ve využití organokovových sloučenin při vývoji protinádorových léčiv	3S25
Progress in the Utilisation of Organometallic Compounds in the Development of Cancer Drugs Skoupilová H., Hrstka R.	
Souhrn aktuálních poznatků o úloze estrogenového receptoru α v nádorové buněčné signalizaci	3S34
Overview of Current Findings about the Role of Oestrogen Receptor α in Cancer Cell Signalling Pathways Voňka P., Hrstka R.	
Glykoproteiny v sérech onkologických pacientů	3S39
Glycoproteins in the Sera of Oncological Patients Hernychová L., Uhrík L., Nenutil R., Novotný M. V.	
Glykozylácia ako dôležitý regulátor funkcie protilátok	3S46
Glycosylation as an Important Regulator of Antibody Function Uhrík L., Hernychová L., Vojtěšek B.	
Výskum ubikvitinácie proteínov v onkológii	3S56
Protein Ubiquitination Research in Oncology Faktor J., Pjechová M., Hernychová L., Vojtěšek B.	
Dlouhé nekódující RNA – současné možnosti detekce a využití v klinické praxi	3S65
Long Non-Coding RNAs – Current Methods of Detection and Clinical Applications Moráňová L., Bartošík M.	
Interakce onkogenních virových proteinů s proteiny rodiny p53	3S72
Oncogenic Viral Protein Interactions with p53 Family Proteins Brychtová V., Hrabal V., Vojtěšek B.	
Kooperace genomických, transkriptomických a proteomických metod v detekci mutovaných proteinů	3S78
Cooperation of Genomic, Transcriptomics and Proteomic Methods in the Detection of Mutated Proteins Zavadil Kokáš F., Faktor J., Vojtěšek B.	

Méně časté mutace *EGFR* v kontextu léčby nemalobuněčného karcinomu plic

Uncommon *EGFR* Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Impact on the Treatment

Bílek O.^{1,2}, Holánek M.¹, Berkovcová J.³, Horký O.³, Kazda T.⁴, Čoupková H.¹, Špelda S.¹, Kristková L.¹, Zvaríková M.¹, Podhorec J.^{1,2}, Bořilová S.¹, Bohovicová L.¹, Zdražilová Dubská L.^{1,2}

¹Klinika komplexní onkologické péče, LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno

²Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

³Oddělení onkologické patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴Klinika radiační onkologie, LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Mutace genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor – EGFR) hrají důležitou roli v patogenezi nemalobuněčného karcinomu plic. Protože se jedná o alterace často ovlivnitelné cílenou léčbou, představuje jejich detekce součást běžné klinické praxe. U pacientů s aktivačními mutacemi *EGFR* bylo dosaženo výrazného zlepšení léčebných výsledků pomocí cílené léčby tyrozinkinázovými inhibitory. Diagnostickým standardem mutací *EGFR* jsou v současné době metody založené na polymerázové řetězové reakci, zejména kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase. V posledních letech roste význam sekvenování nové generace. EGFR obsahuje čtyři domény: extracelulární s vazebným místem ligandu, transmembránovou doménu, cytoplazmatickou tyrozinkinázovou katalytickou doménu a C-terminální doménu. Klíčové struktury tyrozinkinázové domény zodpovědné za aktivaci a přenos signálu jsou kódovány v rámci exonů 18–21 na 7. chromozomu. Mutace *EGFR* jsou vysoce heterogenní. Asi 90 % mutací *EGFR* tvoří delece exonu 19 a bodová mutace L858R v exonu 21. Jsou označovány za „klasické“ mutace. Přibližně 10% podíl z celkového počtu mutací připadá na méně časté alterace genu pro EGFR. Vzhledem k nízké incidenci nemalobuněčného karcinomu plic s méně častými mutacemi je stále třeba nových informací o jejich prediktivním významu. Většinu dosavadních dat o méně častých mutacích tvoří retrospektivní analýzy a hodnocení menších souborů. **Cíl:** Cílem tohoto přehledového článku je shrnout možnosti diagnostiky a léčby nemalobuněčného karcinomu plic s méně častými mutacemi *EGFR*.

Klíčová slova

nemalobuněčný karcinom plic – receptor pro epidermální růstový faktor – tyrozinkinázové inhibitory – cílená léčba – mutace *EGFR*

Práce byla podpořena MŠMT – NPU I – LO1413 a MZ ČR – RVO (MOU, 00209805).

This work was supported by the MEYS – NPS I – LO1413 and MH CR – 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 recommendation for biomedical papers.



doc. RNDr. Lenka Zdražilová-Dubská, Ph.D.

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

Obdrženo/Submitted: 2. 6. 2019

Přijato/Accepted: 26. 8. 2019

doi: 10.14735/amko2019356

Summary

Background: Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations play an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. Because these alterations are so-called targetable mutations, their identification is important in daily clinical practice. The diagnostic standard of *EGFR* mutations is currently based on polymerase chain reaction methods, particularly the quantitative real-time polymerase chain reaction. In recent years, new generation sequencing has become increasingly important. In patients with *EGFR* mutations, a significant improvement in therapeutic outcomes was achieved with the administration of targeted therapy using tyrosine kinase inhibitors. EGFR is composed of four domains: extracellular with a ligand binding site, a transmembrane domain, a cytoplasmic tyrosine kinase catalytic domain, and a C-terminal domain. The key structures of the tyrosine kinase domain responsible for signal activation and transmission are encoded within exons 18–21 on chromosome 7. *EGFR* mutations are highly heterogeneous. About 90% of *EGFR* mutations are deletions of exon 19 and point mutation L858R in exon 21. These are referred to as 'classic' mutations. Approximately 10% of the total number of *EGFR* mutations is attributable to less frequent alterations in the *EGFR* gene. Due to the low incidence of non-small cell lung cancer with less frequent *EGFR* mutations, information on their predictive significance is still incomplete. Most of the data for the treatment of cases with uncommon mutations were gathered from retrospective analyses and evaluations of small cohorts. **Purpose:** The aim of this review is to summarise the current options for diagnosing and treating non-small cell lung cancer patients with uncommon *EGFR* mutations.

Key words

non-small cell lung cancer – epidermal growth factor receptor – tyrosine kinase inhibitors – molecular targeted therapy – *EGFR* mutations

Úvod

Incidence bronchogenního karcinomu v ČR je 49,2/100 000 žen a 82,6/100 000 mužů. Nemalobuněčný karcinom plic (non-small cell lung cancer – NSCLC) tvoří převážnou většinu (85 %) těchto závažných plicních malignit [1]. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem je kouření. Endogenní rizikové faktory jsou méně časté [2]. Významný onkogenní potenciál mají specifické řídicí genové mutace (driver mutations – mutace přímo poskytující buňce selektivní růstovou výhodu), které dělí NSCLC na molekulárně definované podjednotky a svědčí o vysoké heterogenitě onemocnění. S tím souvisí dramatický rozvoj možností systémové léčby v posledním desetiletí, protože se často jedná o alterace ovlivnitelné cílenou léčbou (targetable mutations). U pacientů s aktivními mutacemi genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor – EGFR) nebo přestavbou *ALK* či *ROS1* bylo dosaženo výrazného zlepšení léčebných výsledků [3,4]. Mezi další terapeutické cíle patří B-RAF, c-met, RET a další [5–7]. Zásadní přínos znamenalo zařazení imuniterapie do léčby NSCLC, zejména inhibitory PD-1 a PD-L1 [8].

V roce 2003 byly publikovány první práce popisující léčebný efekt inhibice EGFR tyrozinkinázovými inhibitory (TKI) [9,10]. Význam mutací *EGFR* jako prediktoru dobré odpovědi na léčbu TKI byl popsán Lynchem et al a Paezem et al

v roce 2004 [11,12]. Studie fáze III Iressa Pan-Asia Study publikovaná v roce 2009 prokázala mimořádný klinický benefit gefitinibu (léčebná odpověď (response rate – RR) 72,1 vs. 1,1 %) u pacientů s mutací *EGFR* [13]. Následně studie EURTAC přinesla podobné léčebné výsledky u erlotinibu [14]. Četnost mutací *EGFR* u adenokarcinomů je v kavkazské populaci udávána 10–15 %, u asijských pacientů až 50 %. Častější výskyt je u žen a nekuřáků. Asi 90 % mutací *EGFR* tvoří delece exonu 19 (del19) a bodová mutace L858R v exonu 21. Jsou označovány jako „klasické“ mutace [15,16].

Pacienti s *EGFR* mutovaným NSCLC v klinickém stadiu IIIB, IV jsou standardně léčeni TKI 1. generace (gefitinib, erlotinib) či 2. generace (afatinib). Klinické studie fáze III prokázaly zlepšení doby do progresu (progression-free survival – PFS) a objektivní odpovědi na léčbu (overall response rate – ORR) [17–24]. V souhrnné analýze studií Lux-Lung 3 a Lux-Lung 6 bylo navíc prokázáno prodloužení celkového přežití (overall survival – OS) pacientů s del19 léčených afatinibem [25]. Léčba je nicméně komplikována rozvojem sekundární rezistence k léčbě TKI 1. a 2. generace, která je ve více než 50 % případů spojena s výskytem bodové mutace T790M v exonu 20. Rezistenci mutace T790M překonává TKI 3. generace osimertinib [26,27]. Přibývají informace osvětlující další mechanismy poskytující nové léčebné cíle, zejména rezistentní mutace C797S v exonu 20,

dále mutace *PI3KCA*, *KRAS*, *BRAF* amplifikace *MET*, fúze *RET* či *FGFR* [28]. Další příčinou rezistence se ukazují být epigenetické změny. Podle preklinických studií vykazovaly buněčné linie s hypermetylací promotoru *EGFR* nižší citlivost ke gefitinibu. Tato oblast zůstává předmětem výzkumu [29].

Mutace *EGFR* jsou vysoce heterogenní. Vzhledem k nízké incidenci NSCLC s méně častými mutacemi je stále třeba nových informací o jejich prediktivním významu. Klinické studie zpravidla randomizovaly či primárně hodnotily pouze pacienty s klasickými mutacemi. Většinu dosavadních dat o méně častých mutacích tedy tvoří retrospektivní analýzy a hodnocení malých souborů. Pouze čtyři velké prospektivní studie zahrnovaly i pacienty s primárně diagnostikovanými méně častými mutacemi definovanými jako všechny mutace s výjimkou del19 a L858R. V těchto studiích představovaly přibližně 10% podíl z celkového počtu mutací *EGFR* [17,18,23,24]. Cílem tohoto přehledového článku je shrnout možnosti diagnostiky a léčby NSCLC pacientů s méně častými mutacemi *EGFR*.

Aktivace EGFR a mechanismus účinku TKI

Receptor pro epidermální růstový faktor obsahuje čtyři domény: extracelulární s vazebným místem ligandu, transmembránovou doménu (alpha helix), cytoplazmatickou tyrozinkinázovou (TK)

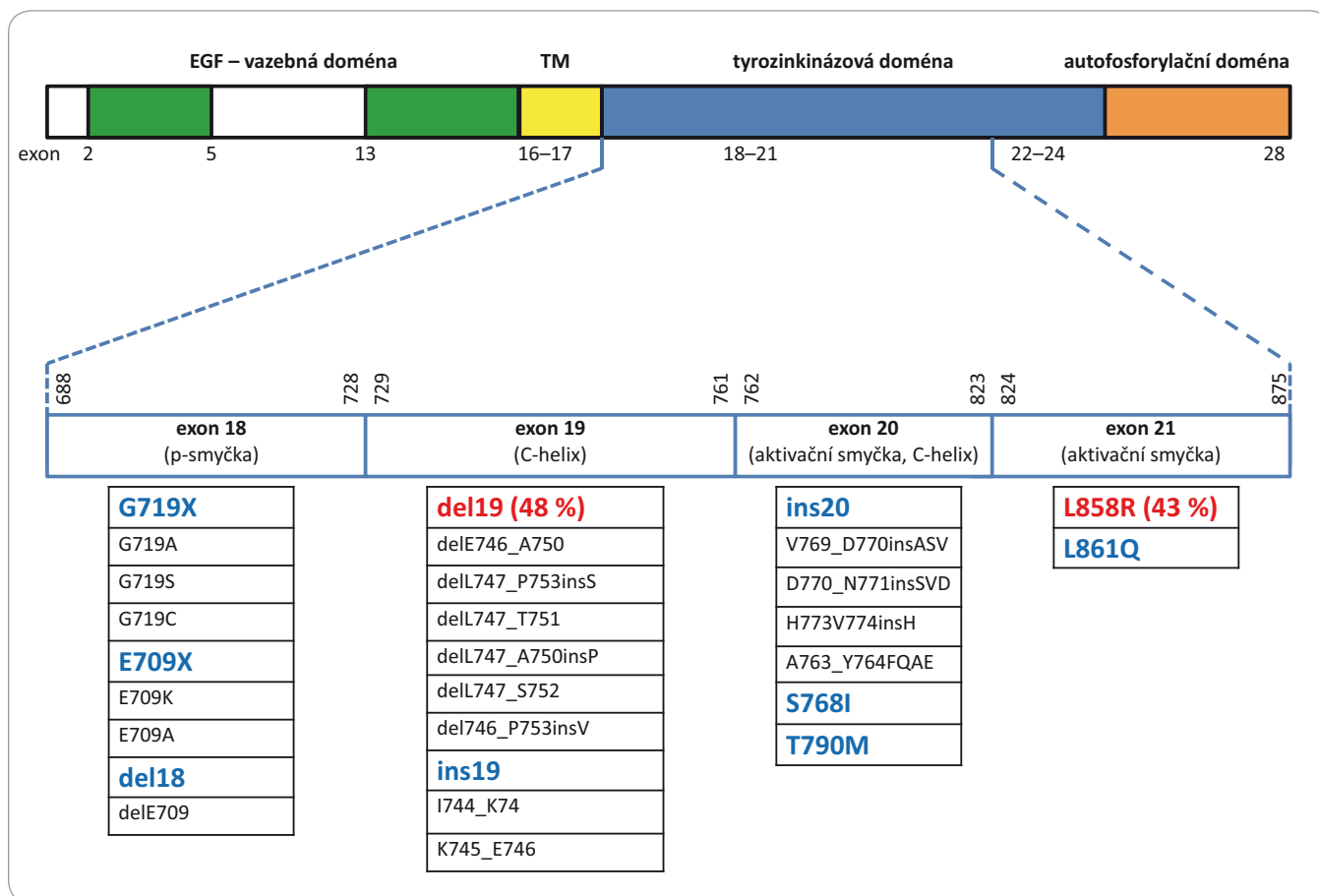


Schéma 1. Schéma shrnující nejčastěji detekované mutace genu *EGFR* u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Červeně jsou vyznačeny „klasické“ mutace.

TM – transmembránová doména

katalytickou doménu a C-terminální doménu zodpovědnou za další přenos signálu [30]. Kinázová aktivita je regulována konformací katalytické domény. Aktivovaná kináza je schopna transportovat fosfát z ATP na peptidový substrát C-terminálního konce a umožnit tak přenos signálu. Za vytvoření či zrušení těchto podmínek jsou zodpovědné klíčové struktury TK domény, jako je aktivační smyčka (activation loop) či C-helix. V případě aktivované kinázové domény je aktivační smyčka extendována z vazebné štěrby ATP (cleft) a umožní navázání peptidového substrátu, zatímco katalytické glutamátové residuum C-helixu zformuje iontovou interakci s lizinovými residui, která koordinují α a β fosfáty ATP. V inaktivní formě aktivační smyčka dramaticky mění svou konformaci, aby zabránila navázání peptidového substrátu, zatímco C-helix je odtažen glutamátovými

rezidui [31]. Navázání ligandu epidermálního růstového faktoru (EGF) umožní vznik asymetrické dimerizace dvou kináz. Následná autofosforylace tyrozinových zbytků v intracelulárním konci EGFR iniciuje tvorbu proteinových komplexů zodpovědných za transdukcii signálu prostřednictvím signálních drah, zejména RAS/MAPK a PI3K/AKT, a dalších. Výsledkem je ovlivnění exprese genů podporujících buněčnou proliferaci, přežití a migraci [32]. V případě mutované kinázy se dimerizace jako primární mechanismus aktivace nejeví. Je upřednostněn trvale aktivní stav domény, což vede ke zvýšené aktivitě receptoru a zvýšení onkogenního rizika.

Klíčové struktury TK domény zodpovědné za aktivaci a přenos signálu jsou kódovány v rámci exonů 18–21 na 7. chromozomu. Mutace detekované v těchto exonech představují 98 % mu-

tací v *EGFR* a mohou vést k aktivaci TK domény bez přítomnosti ligandu [16]. Vyskytují se ve formě: a) krátkých delecí, zejména v rámci exonu 19; b) bodových substitucí nukleotidů; c) inzercí, popř. duplikací [33]. Je možný komplexní výskyt více než jedné mutace v různých exonech [34]. V posledních letech byly rovněž popsány případy chromozomálních aberací ve smyslu duplikací či fúzních translokací, které se ukazují být využitelné jako terapeutické cíle [35,36].

Klasické mutace *EGFR* (del19 a L858R) snižují afinitu kinázy k ATP, čímž je zajištěna vyšší afinita k TKI [37]. TKI 1. generace, gefitinib a erlotinib, se reverzibilně vážou na vazebné místo ATP a blokují fosforylacii mutované i nemutované kinázy [38]. Vyšší afinita TKI k mutované kináze je příčinou vysoké léčebné odpovědi. TKI 2. generace afatinib se ireverzibilně váže na vazebné místo ATP

receptoru *EGFR*, Her-2 a Her-4 [39]. Přibližně v 50 % případů dochází k rozvoji sekundární mutace T790M, která obnovuje preferenční afinitu kinázy k ATP, což je příčinou nižší účinnosti a rezistence TKI 1. generace [40]. Afatinib v preklinických modelech vykazoval jistou míru účinku i za přítomnosti T790M, bylo však zapotřebí vysokých dávek, kterých nelze s ohledem na související toxicitu v klinické praxi dosáhnout [41]. Osimertinib, ireverzibilní inhibitor *EGFR*, Her-2 a Her-4, strukturálně překonává rezistenci T790M a obnovuje afinitu k vazebné štěrbině ATP ve srovnání s nemutovaným *EGFR* [42]. Další molekuly TKI 3. generace jsou ve fázi klinického zkoušení [43]. Schéma 1 znázorňuje přehled mutací exonu 18–21 genu *EGFR*.

Diagnostika mutací *EGFR*

Detekce mutace *EGFR*, přestavby genu *ALK*, *ROS1*, exprese PD-L1 jsou součástí standardní diagnostiky NSCLC. Mutaci *EGFR* lze diagnostikovat z formalínem fixované, parafinizované tkáně nebo z cytologických preparátů, popř. izolací volné cirkulující DNA (cfDNA) z periferní krve [44].

V minulosti se využívalo Sangerovo sekvenování exonů 18–21, metoda je vysoce specifická, s možností záchytu nových mutací, je však limitována nízkou senzitivitou s potřebou minimálně 20% zastoupení mutovaných nádorových buněk v analyzovaném vzorku [45]. Neprovádí se ani imunohistochemické testování specifickými protilátkami kvůli nižší detekční výkonnosti ve srovnání s jinými metodami [46].

V současné době jsou standardem metody založené na polymerázové řetězové reakci (polymerase chain reaction – PCR), zejména kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) vyznačující se výrazně vyšší senzitivitou, řádově je nutné pouze 1% zastoupení mutované alely ve vzorku [44]. Jsou však detekovány pouze mutace, pro které byl navržen příslušný test. V Masarykově onkologickém ústavu je využíván diagnostický kit cobas® *EGFR* Mutation Test v2 (Roche, Basilej, Švýcarsko). Test detekuje bodové mutace G719X v exonu 18, del19, inserce v exonu 20 (ins20), bodové mutace S768I a T790M v exonu 20 a bodové

mutace L858R a L861Q v exonu 21. Průměrnou mezí detekce metody jsou 4 % nádorových buněk s mutací *EGFR*. Není-li k dispozici histologický materiál, je možné stanovení z tekuté biopsie (liquid biopsy) izolací extrabuněčné nádorové DNA (cfDNA) z odběru krve [47]. Mutační analýza cfDNA může být provedena rovněž pomocí qPCR, vhodnější je však použití tzv. digitální PCR. Digitální PCR umožňuje absolutní kvantifikaci, protože porovnává skutečné množství templátové DNA, jejíž každá molekula je v jedné kapénce, ve které probíhá samostatná PCR reakce. Metoda je minimálně o řád senzitivnější než qPCR a umožňuje rovněž kvantifikaci amplifikovatelné DNA [48]. Nejčastějším využitím mutační analýzy z tekutých biopsií je detekce rezistentní mutace T790M ve vzorku. To, jestli detekujeme i původní aktivační mutaci, zároveň slouží jako vnitřní kontrola reprezentativnosti získaného vzorku.

V posledních letech roste význam sekvenování nové generace, které je využitelné k detekci bodových mutací, amplifikací i chromozomálních přestavb v rámci celého genomu [49]. Citlivost detekce frekvencí mutovaných alel dosahuje až 0,1 % v závislosti na hloubce sekvenace [50].

Léčba NSCLC s méně častou mutací *EGFR*

Inserce exonu 20

Ins20 představují největší podíl méně častých mutací. Vyskytují se pouze u 1,5–2,5 % všech NSCLC, ale představují přibližně 10 % (1–17 %) pacientů s mutací *EGFR*. Podobně jako u klasických mutací jsou ins20 diagnostikovány zejména u žen, nekuřáků a asijské populace. Nejčastěji detekované mutace zahrnují D770_N771insNPG, V769_D770insASV, D770_N771insSVD, H773_V774insH a další [51].

Ins20 strukturálně ovlivňují aktivační smyčku (activation loop) a navazující C-terminální konec C-helixu. Výsledkem inserce je nejčastěji fixace C-helixu „klínem“, kterým je zabráněno vytvoření zevní deaktivující konformace kinázy a je trvale upřednostněn aktivovaný stav. Na rozdíl od klasických mutací však zpravidla nedochází ke snížení afi-

nity k ATP, vazebná afinita k TKI je tedy v těchto případech podobná nemutovanému *EGFR* a výsledkem je primární rezistence k současně používaným TKI [37].

Je k dispozici řada retrospektivních studií hodnotících menší soubory pacientů léčených TKI 1. a 2. generace [52–54]. Jediná prospektivní data vyplývají z post hoc analýzy studií Lux-Lung 2, Lux-Lung 3 a Lux-Lung 6, která ukázala, že u 23 pacientů s ins20 genu *EGFR* byla ORR na afatinib pouze 8,7 %, medián času do progresu (mPFS) 2,7 měsíce a medián celkového přežití (mOS) 9,2 měsíce. U těchto pacientů byly zaznamenány lepší výsledky léčby chemoterapií [55]. Vyšší míra odpovědi na chemoterapii byla pozorována také v dalších retrospektivních studiích [56].

Podobně jako del19 jsou také ins20 vysoce heterogenní. Ukázalo se, že proximální lokalizace inserce může ovlivnit vazebnou kinetiku léčiva a ATP. Yasuda et al studovali strukturu široké skupiny inserčních mutací exonu 20 a *in vitro* citlivost k TKI 1. generace. Naprostá většina ins20 vykazovala rezistenci k TKI. Výjimku tvořila proximální inserce A763_Y764insFQEA, která vykazovala vysokou citlivost k erlotinibu. Tato inserce strukturálně posouvá C-helix v N koncovém směru. Zdá se, že ins20 mezi kodony 769–775 neindukují tvorbu klínu na C-terminálním konci C-helixu a není zvýšena vazebná afinita ATP. Předpokládá se, že proximální inserce vedou k podobným strukturálním změnám ve vazebné štěrbině ATP jako v případě klasické mutace L858R [53].

Prediktivní význam dobré léčebné odpovědi inserce A763_Y764insFQEA byl opakovaně popsán v klinické praxi. Klughmmera et al popsali částečnou regresi onemocnění ve druhé linii léčby erlotinibem trvající 17,5 měsíce a OS 24 měsíců [57]. Dále byl zaznamenán léčebný efekt v případě inserce V769_D770insASV (PFS 19,8 měsíce, OS 24 měsíců) a N771delinsKPP (PFS 8 měsíců a OS 10 měsíců) [52,56]. Jsou k dispozici i data léčby NSCLC s ins20 osimertinibem, van Veggel et al prezentovali retrospektivní analýzu 18 pacientů, ORR 5,6 %, mPFS 3,6 měsíce [58]. Jsou zkoušeny nové molekuly cílící na překonání rezistence ins20. Příkladem je inhibitor

HSP90 (heat shock protein 90) luminespib, který v rámci studie fáze II u méně předléčených pacientů dosáhl ORR 21 % a mPFS 5,1 měsíce [59]. Nejen u NSCLC přináší slibné výsledky *EGFR*-TKI 3. generace poziotinib, probíhá studie fáze II (NCT03066206).

Bodové mutace exonu 20

Další mutací je S768I, tvoří cca 1 % mutací *EGFR*. Často se objevuje v kombinaci s jinou mutací, zejména L858R a G719X [51]. V retrospektivních studiích s TKI 1. generace byla zaznamenána částečná odpověď s ORR 20–33 % v případě samostatného výskytu S768I, výrazně lepší výsledky byly u komplexních mutací. Chen et al uvádějí mPFS 2,7 měsíce [60,61]. V post hoc analýze Lux-Lung 2, Lux-Lung 3 a Lux-Lung 6 byla zaznamenána 100% odpověď na léčbu afatinibem, PFS 14,7 měsíce, avšak u 7 z 8 pacientů byla zachycena komplexní mutace s L858R a G719X [55]. Jsou k dispozici i data s osimertinibem, ve studii fáze II byla u 8 pacientů s S768I zaznamenána ORR 37,5 %, ve 2 případech se jednalo o kombinovanou mutaci [62].

Bodová mutace T790M je cca v 50 % případů příčinou sekundární rezistence po léčbě TKI 1. a 2. generace. Primární výskyt se odhaduje na 1 % mutací *EGFR*. V analýze studií Lux-Lung u pacientů léčených afatinibem bylo dosaženo ORR 14,3 %, mPFS 2,9 měsíce a mOS 9,2 měsíce [55]. V současné době je v případě primární či sekundární detekce T790M indikována léčba TKI 3. generace osimertinibem, ORR ve 2. linii léčby 71 %, v 1. linii 80 % [26,27].

Byla popsána řada dalších velmi vzácných mutací exonu 20. U některých byly zaznamenány odpovědi na TKI, např. V765A, V774A či T783A, PFS však byl krátký [63].

Bodové mutace exonu 18

Mutace exonu 18 představují 3–4 % mutací *EGFR* [51]. Strukturálně ovlivňují p-smyčku TK domény (p-loop) [37]. Nejčastěji se jedná o Gly719X, záměnu glycinu za serin, alanin nebo cystein. Většina informací o výskytu pochází z malých retrospektivních studií a kazuistik [52,64,65]. Častý je výskyt v rámci komplexní mutace. Chiu et al publiko-

vali soubor 76 pacientů s G719X léčených TKI 1. generace, bylo dosaženo ORR 36,8 % a mPFS 6,3 měsíce. Výrazně lepších výsledků bylo dosaženo u kombinovaných mutací, zejména G719X + S768I (ORR 50 %) a G719X + L819Q (ORR 89 %) [66]. Analýza studií Lux-Lung prokázala výrazný benefit afatinibu s ORR mPFS 13,8 měsíce a mOS 26 měsíců, avšak více než polovina pacientů měla komplexní mutaci [55]. V rámci retrospektivní jednoramenné studie bylo hodnoceno 19 pacientů léčených osimertinibem, ORR 52,6 %, 6měsíční PFS 72,4 %, ve 4 případech se jednalo o komplexní mutaci s del19 nebo L858R [62].

Další velmi vzácnou bodovou mutací exonu 18 je E709X. Wu et al publikovali soubor 18 pacientů léčených TKI 1. generace, ORR 50 %, mPFS 6,2 měsíce. U většiny pacientů byla zachycena komplexní mutace, u těchto byla zaznamenána dobrá léčebná odpověď. U 5 pacientů se samostatnou mutací E709 léčebná odpověď nebyla [67]. Byl zaznamenán dobrý efekt léčby afatinibem s mediánem doby do selhání léčby delším než 12 měsíců, jednalo se však pouze o 4 pacienty s komplexní mutací L858R nebo G719A [68].

Mutace L861Q v exonu 21

Předpokládá se, že bodová mutace L861Q na exonu 21 představuje 2 % mutací *EGFR* [51]. Podobně jako L858R kóduje oblast aktivační kličky kinázy (activation loop) [31]. Mírou léčebného efektu se L861Q blíží klasickým mutacím. Chiu et al publikovali skupinu 54 pacientů léčených 1. generací TKI, bylo dosaženo ORR 40 % a PFS 8,1 měsíce [66]. Afatinib v analýze studií Lux-Lung dosáhl ORR 54 %, mPFS 8,2 měsíce, čtvrtina pacientů měla komplexní mutaci. Ahn et al prezentovali 9 pacientů léčených osimertinibem, ORR 77,8 %, 6měsíční PFS dosahovalo 74,1 měsíce, ve 2 případech se jednalo o komplexní mutaci s G519A v exonu 18 [62].

Komplexní mutace

Komplexní mutace tvoří až 14 % diagnostikovaných mutací *EGFR* [69]. Mutace mohou být v rámci tumoru zastoupeny heterogenně, proto se předpokládá význam dostatečného množství diagnostického materiálu [70]. Nej-

lepších léčebných výsledků bylo podle očekávání dosaženo v případě souběžného výskytu s klasickými mutacemi [34,64,71–73]. Wu et al popsali soubor 32 pacientů s komplexními mutacemi léčených TKI 1. generace. V této studii bylo dosaženo ORR 56 %, mPFS 3,5 měsíce a mOS 8,5 měsíce, lepší výsledky byly zaznamenány u pacientů s klasickou mutací [64]. Přínos léčby afatinibem hodnotila post hoc analýza studií Lux-Lung, nebyl zaznamenán rozdíl v léčebné odpovědi komplexních a jednotlivých mutací. Bylo dosaženo ORR 100 % a mPFS 14,7 měsíce, ale ve většině případů byla diagnostikována kombinace s klasickou mutací [55]. V případě kombinace T790M s citlivou mutací může být dosaženo léčebného efektu TKI 1. a 2. generace [55]. V současné době je však u těchto pacientů indikována léčba 3. generace TKI osimertinibem [27].

Závěr

Léčba TKI přináší výrazné zlepšení léčebných výsledků a kvality života u většiny pacientů s mutací *EGFR*. Je stále třeba nových dat týkajících se diagnostiky a léčby vzácných mutací. Mnohé z nich vykazují dobrou citlivost k léčbě TKI 1. a 2. generace, TKI 3. generace zatím mají pouze omezená data. Zejména mutace G719X, S768I a L861Q vykazovaly velmi dobrou citlivost k léčbě afatinibem. Naopak ins20 vykazuje v naprosté většině případů primární rezistenci k TKI, výjimkou se zdají být některé proximální inzerce, u nichž byl byla léčba TKI přínosná. Řada mutací je detekována velmi vzácně a léčebná odpověď byla publikována pouze na úrovni kazuistik. Zdokonaluje se diagnostika mutací, vedle standardní qPCR roste význam sekvenování nové generace, které se stává komerčně dostupné a umožňuje výrazně hlubší detekci využitelnou např. v rámci specifikace ins20. Mezi standardní detekční metody patří „tekutá biopsie“, zavedení digitální PCR výrazně zlepšuje její senzitivitu. Pokračují snahy o překonání primární a sekundární rezistence.

Literatura

1. Dušek L, Mužík J, Kubásek M et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. [online]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>.

2. Molina JR, Yang P, Cassivi SD et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(5): 584–594. doi: 10.4065/83.5.584.
3. Rosas G, Ruiz R, Araujo JM et al. ALK rearrangements: biology, detection and opportunities of therapy in non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2019; 136: 48–55. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.02.006.
4. Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ et al. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol* 2019; 131. doi: 10.1093/annonc/mdz131.
5. Planchard D, Smit EF, Groen HJ et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18(10): 1307–1316. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30679-4.
6. Wang W, Wang H, Lu P et al. Crizotinib with or without an EGFR-TKI in treating EGFR-mutant NSCLC patients with acquired MET amplification after failure of EGFR-TKI therapy: a multicenter retrospective study. *J Transl Med* 2019; 17(1): 52. doi: 10.1186/s12967-019-1803-9.
7. Bronte G, Ulivi P, Verlicchi A et al. Targeting RET-rearranged non-small-cell lung cancer: future prospects. *Lung Cancer (Auckl)* 2019; 10: 27–36. doi: 10.2147/LCTT.S192830.
8. Bilek O, Bohovicová L, Demlová R et al. Non-small cell lung cancer – from immunobiology to immunotherapy. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 4): 78–87. doi: 10.14735/amko20164578.
9. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* 2003; 21(12): 2237–2246. doi: 10.1200/JCO.2003.10.038.
10. Kris MG, Natale RB, Herbst RS et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2003; 290(16): 2149–2158. doi: 10.1001/jama.290.16.2149.
11. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350(21): 2129–2139. doi: 10.1056/NEJMoa040938.
12. Paez JG, Jänne PA, Lee JC et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304(5676): 1497–1500. doi: 10.1126/science.1099314.
13. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361(10): 947–957. doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
14. Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(3): 239–246. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
15. Fiala O, Pešek M, Fínek J et al. EGFR mutations in patients with advanced NSCLC. *Klin Onkol* 2012; 25(4): 267–273. doi: 10.14735/amko2012267.
16. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* 2007; 98(12): 1817–1824. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00607.x.
17. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361(10): 947–957. doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
18. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010; 362(25): 2380–2388. doi: 10.1056/NEJMoa0909530.
19. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 121–128. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.
20. Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(3): 239–246. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
21. Zhou C, Wu YL, Chen G et al. Final overall survival results from a randomised, phase III study of erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802). *Ann Oncol* 2015; 26(9): 1877–1883. doi: 10.1093/annonc/mdv276.
22. Wu YL, Zhou C, Liang CK et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann Oncol* 2015; 26(9): 1883–1889. doi: 10.1093/annonc/mdv270.
23. Wu YL, Zhou C, Hu CP et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(2): 213–222. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70604-1.
24. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2013; 31(27): 3327–3334. doi: 10.1200/JCO.2012.44.2806.
25. Yang JC, Wu YL, Schuler M et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol* 2015; 16(2): 141–151. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71173-8.
26. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2017; 376(7): 629–640. doi: 10.1056/NEJMoa1612674.
27. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 378(2): 113–125. doi: 10.1056/NEJMoa1713137.
28. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF et al. Assessment of resistance mechanisms and clinical implications in patients with EGFR T790M-positive lung cancer and acquired resistance to osimertinib. *JAMA Oncol* 2018; 4(11): 1527–1534. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2969.
29. Li XY, Wu JZ, Cao HX et al. Blockade of DNA methylation enhances the therapeutic effect of gefitinib in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2013; 29(5): 1975–1982. doi: 10.3892/or.2013.2298.
30. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(6): 637–643. doi: 10.1016/S1357-2725(99)00015-1.
31. Kumar A, Petri ET, Halmos B et al. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(10): 1742–1751. doi: 10.1200/JCO.2007.12.1178.
32. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18): 5268–5272. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1554.
33. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* 2006; 118(2): 257–262. doi: 10.1002/ijc.21496.
34. Hata A, Yoshioka H, Fujita S et al. Complex mutations in the epidermal growth factor receptor gene in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010; 5(10): 1524–1528. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181e8b3c5.
35. Gallant JN, Sheehan JH, Shaver TM et al. EGFR kinase domain duplication (EGFR-KDD) is a novel oncogenic driver in lung cancer that is clinically responsive to afatinib. *Cancer Discov* 2015; 5(11): 1155–1163. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0654.
36. Konduri K, Gallant JN, Chae YK et al. EGFR fusions as novel therapeutic targets in lung cancer. *Cancer Discov* 2016; 6(6): 601–611. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0075.
37. Eck MJ, Yun CH. Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804(3): 559–566. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.12.010.
38. Riely GJ, Politi KA, Miller VA et al. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(24): 7232–7241. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0658.
39. Li D, Ambrogio L, Shimamura T et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 2008; 27(34): 4702–4711. doi: 10.1038/onc.2008.109.
40. Yu HA, Arcila ME, Hellmann MD et al. Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Ann Oncol* 2014; 25(2): 423–428. doi: 10.1093/annonc/mdt573.
41. Miller VA, Hirsh V, Cadranel J et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(5): 528–538. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70087-6.
42. Jänne PA, Yang JC, Kim DW et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(18): 1689–1699. doi: 10.1056/NEJMoa1411817.
43. Romero D. Poziotinib for uncommon ERBB mutations. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15(7): 404. doi: 10.1038/s41571-018-0038-7.
44. Sheikine Y, Rangachari D, McDonald DC et al. EGFR testing in advanced non-small-cell lung cancer, a mini-review. *Clin Lung Cancer* 2016; 17(6): 483–492. doi: 10.1016/j.clcl.2016.05.016.
45. Warth A, Penzel R, Brandt R et al. Optimized algorithm for Sanger sequencing-based EGFR mutation analyses in NSCLC biopsies. *Virchows Arch* 2012; 460(4): 407–414. doi: 10.1007/s00428-012-1219-x.
46. Ragazzi M, Tamagnini I, Bisagni A et al. Diamond: immunohistochemistry versus sequencing in EGFR analysis of lung adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2016; 69(5): 440–447. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203348.
47. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V et al. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients. *Lung Cancer* 2017; 107: 100–107. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.04.026.
48. Zhu G, Ye X, Dong Z et al. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Mol Diagn* 2015; 17(3): 265–272. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.01.004.
49. Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S et al. Next-generation sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: advantages and challenges. *Cancers (Basel)* 2015; 7(4): 2023–2036. doi: 10.3390/cancers7040874.
50. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA et al. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *PLoS One* 2015; 10(10): e0140712. doi: 10.1371/journal.pone.0140712.

51. O'Kane GM, Bradbury PA, Feld R et al. Uncommon EGFR mutations in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2017; 109: 137–144. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.04.016.
52. Beau-Faller M, Prim N, Ruppert AM et al. Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network. *Ann Oncol* 2014; 25(1): 126–131. doi: 10.1093/annonc/mdt418.
53. Yasuda H, Park E, Yun CH et al. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med* 2013; 5(216): 216ra177. doi: 10.1126/scitranslmed.3007205.
54. Chen D, Song Z, Cheng G. Clinical efficacy of first-generation EGFR-TKIs in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR exon 20 mutations. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 4181–4186. doi: 10.2147/OTT.S108242.
55. Yang JC, Sequist LV, Geater SL et al. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol* 2015; 16(7): 830–838. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00026-1.
56. Naidoo J, Sima CS, Rodriguez K et al. Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: clinical outcomes and response to erlotinib. *Cancer* 2015; 121(18): 3212–3220. doi: 10.1002/cncr.29493.
57. Klughammer B, Brugger W, Cappuzzo F et al. Examining treatment outcomes with erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer whose tumors harbor uncommon EGFR mutations. *J Thorac Oncol* 2016; 11(4): 545–555. doi: 10.1016/j.jtho.2015.12.107.
58. van Veggel B, van der Wekken A, Hashemi S et al. Osimertinib treatment for patients with EGFR exon 20 insertion positive non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2018; 29 (Suppl 8): 493–547. doi: 10.1093/annonc/mdy292.
59. Piotrowska Z, Costa DB, Oxnard GR et al. Activity of the Hsp90 inhibitor luminespib among non-small-cell lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions. *Ann Oncol* 2018; 29(10): 2092–2097. doi: 10.1093/annonc/mdy336.
60. Chen D, Song Z, Cheng G. Clinical efficacy of first-generation EGFR-TKIs in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR exon 20 mutations. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 4181–4186. doi: 10.2147/OTT.S108242.
61. Chang MH, Ahn HK, Lee J et al. Clinical impact of amphiregulin expression in patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) wild-type nonsmall cell lung cancer treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* 2011; 117(1): 143–151. doi: 10.1002/cncr.25560.
62. Ahn MJ, Cho JH, Sun JM et al. An open-label, multicenter, phase II single arm trial of osimertinib in non-small cell lung cancer patients with uncommon EGFR mutation (KCSG-LU15-09). *J Clin Oncol* 2018; 36 (Suppl 15): 9050–9050. doi: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.9050.
63. Chou TY, Chiu CH, Li LH et al. Mutation in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor is a predictive and prognostic factor for gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(10): 3750–3757. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1981.
64. Wu JY, Yu CJ, Chang YC et al. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on “uncommon” epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(11): 3812–3821. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3408.
65. Čoupková H, Vyzula R. Afatinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer with rare EGFR (in exon 18-T179X) mutation – a case report. *Klin Onkol* 2018; 31(5): 380–383. doi: 10.14735/amko2018380.
66. Chiu CH, Yang CT, Shih JY et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor treatment response in advanced lung adenocarcinomas with G719X/L861Q/S768I mutations. *J Thorac Oncol* 2015; 10(5): 793–799. doi: 10.1097/JTO.0000000000000504.
67. Wu JY, Shih JY. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on uncommon E709X epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 6137–6145. doi: 10.2147/OTT.S118071.
68. Heigener DF, Schumann C, Sebastian M et al. Afatinib in non-small cell lung cancer harboring uncommon EGFR mutations pretreated with reversible EGFR inhibitors. *Oncologist* 2015; 20(10): 1167–1174. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0073.
69. Kobayashi S, Canepa HM, Bailey AS et al. Compound EGFR mutations and response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *J Thorac Oncol* 2013; 8(1): 45–51. doi: 10.1097/JTO.0b013e3182781e35.
70. Peng L, Song ZG, Jiao SC. Efficacy analysis of tyrosine kinase inhibitors on rare non-small cell lung cancer patients harboring complex EGFR mutations. *Sci Rep* 2014; 4: 6104. doi: 10.1038/srep06104.
71. Baek JH, Sun JM, Min YJ et al. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small cell lung cancer except both exon 19 deletion and exon 21 L858R: a retrospective analysis in Korea. *Lung Cancer* 2015; 87(2): 148–154. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.11.013.
72. Čapková L, Kalinová M, Tichá I et al. Detekce EGFR mutací v cirkulující nádorové DNA (ctDNA) v plazmě – mezilaboratorní porovnání referenčních laboratoří v České republice. *Klin Onkol* 2018; 31(5): 353–360. doi: 10.14735/amko2018392353.
73. Svatoň M, Pešek M, Baxa J et al. Pacientka se třemi EGFR mutacemi – postupný rozvoj rezistence na předchozí cílenou léčbu. *Klin Onkol* 2018; 31(1): 53–58. doi: 10.14735/amko201853.

CRISPR-Cas9 jako nástroj v terapii nádorových onemocnění

CRISPR-Cas9 as a Tool in Cancer Therapy

Zatloukalová P., Krejčíř R., Valík D., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Editace genomu využívající CRISPR-Cas9 se v průběhu krátké doby zařadila mezi základní metody biologického výzkumu. Tento nedávno objevený mechanismus adaptivní antivirové obrany bakterií se podařilo přizpůsobit potřebám vědy a učinit z něj tak neocenitelný nástroj v manipulaci s DNA. K rozšíření metody přispěla především její jednoduchost a spolehlivost, s jakou ji lze využít. Pod pojmem editace genomu rozumíme úpravy genomové DNA cílené s přesností na jeden pár bází. V jednoduchosti zaměření enzymu na cílovou sekvenci se CRISPR-Cas9 zásadním způsobem liší od předchozích technologií. Na poli výzkumu nádorových onemocnění umožnil CRISPR-Cas9 vývoj řady modelových systémů vhodných pro studium karcinogeneze a testování léčiv. Z terapeutického hlediska našel CRISPR-Cas9 uplatnění v oblasti imunoterapie, a to zejména při *ex vivo* genetických modifikacích T lymfocytů pacienta. **Cíl:** Terapeutický potenciál CRISPR-Cas9 v léčbě nádorových onemocnění se nyní snaží ověřit několik klinických studií. Na základě těchto studií jsme v článku shrnuli strategie použité při přípravě terapeutických nástrojů použitelných v protinádorové terapii. **Závěr:** Technologie CRISPR-Cas9 se ukazuje jako nepostradatelná v oblasti základního výzkumu při studiu funkce jednotlivých genů v procesu karcinogeneze. Využití metody v protinádorové terapii je více problematické. Před vlastní klinickou praxí je potřeba provést ještě řadu optimalizací týkajících se účinnosti, bezpečnosti a specificity CRISPR-Cas9.

Klíčová slova

CRISPR-Cas9 – imunoterapie – klinická studie

Summary

Background: Genome editing using CRISPR-Cas9 has become one of the basic methods of biological research over a short period of time. This recently discovered system of adaptive immunity of bacteria has been adapted to the needs of science and has become a valuable tool for DNA manipulation. Its simplicity and reliability have contributed to widespread use of the method. Genome editing refers to targeted modifications of genomic DNA with single base pair accuracy. CRISPR-Cas9 differs significantly from previous technologies in the simplicity of directing the enzyme to the target sequence. In the field of cancer research, CRISPR-Cas9 has enabled the development of a number of models for the study of carcinogenesis and drug testing. From a therapeutic point of view, CRISPR-Cas9 has been applied in the field of immunotherapy, especially in *ex vivo* genetic modifications of the T-cells of patients. **Aim:** Currently, several clinical trials are trying to verify the therapeutic potential of CRISPR-Cas9. Based on these studies, we have summarised the strategies used in the preparation of therapeutic tools useful in cancer therapy. **Conclusion:** CRISPR-Cas9 appears to be crucial in basic research, particularly in the study of the function of individual genes involved in carcinogenesis. However, it will still be necessary to optimise the efficacy, safety and specificity of CRISPR-Cas9 before it is used in clinical practice.

Key words

CRISPR-Cas9 – immunotherapy – clinical trial

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported 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 recommendation for biomedical papers.



Mgr. Pavlína Zatloukalová, Ph.D.

Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: pavlina.zatloukalova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 6. 2019

Přijato/Accepted: 6. 8. 2019

doi: 10.14735/amko20193513

Úvod

Technologie editace genomu s využitím systému CRISPR-Cas9 je v biologickém výzkumu již natolik rozšířená, že bychom jen těžko hledali oblast, která ji nevyužívá. Přitom ještě před 10 lety byl pojem CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) známý jen úzkému okruhu mikrobiologů, kteří jej objevili jako systém adaptivní imunity bakterií. Když se však podařilo objasnit mechanismus, jakým CRISPR-Cas9 brání opakované infekci bakterie fágem, vyšel najevo obrovský potenciál tohoto systému pro vědu. V roce 2013 byl představen CRISPR-Cas9 optimalizovaný pro využití v lidských buňkách [1,2] a ihned se začal šířit do laboratoří po celém světě rychlostí typickou pro revoluční objevy, a to i navzdory skutečnosti, že tento nástroj nepřinesl v principu nic, čeho by nebylo možné dosáhnout pomocí dřívějších technologií. Systém CRISPR-Cas9 nebyl první a není jedinou technikou umožňující tzv. editaci genomu [3]. K jeho rozšíření přispěla především jednoduchost, s jakou jej lze používat. Jedná se o jednoduchou a spolehlivou metodu, která do té doby nebyla dostupná a s jejímž příchodem bylo možno naplno využít potenciál ostatních technologií.

Pod pojmem editace genomu rozumíme úpravy genomové DNA cílené s přesností na jeden pár bází. Přesnost je přitom klíčová a umožňuje zasahovat do DNA způsobem, kterým lze dosáhnout požadovaných změn. Na molekulární úrovni mají systémy pro editaci genomu podobu enzymů, které dokážou rozštěpit DNA v místě dané sekvence (jedná se tedy o nukleázy, konkrétně DNázy). Známe celou řadu nejrůznějších DNáz štěpících více či méně specifické sekvence DNA. O editaci genomu však mluvíme pouze tehdy, pokud využíváme enzymy, které jsou naprogramovatelné tak, aby specificky štěpily námi zvolenou libovolnou sekvenci. V jednoduchosti zaměření enzymu na cílovou sekvenci se tak CRISPR-Cas9 zásadním způsobem liší od předchozích technologií ZFN (zinc-finger nucleases) a TALEN (transcription activator-like effector nucleases) [3,4].

Mechanismus editace genomu metodou CRISPR-Cas9

Systém CRISPR-Cas9 běžně používaný v laboratorní praxi se skládá ze dvou komponent – proteinu Cas9 (CRISPR associated protein 9) fungujícího jako nukleáza a specifické malé molekuly RNA nazývané se sgRNA (single-guide RNA). Ta se váže na Cas9 a odpovídá za jeho navedení na cílovou sekvenci. Na základě komplementarity bází mezi cílovou DNA a sgRNA dochází k rozpoznání sekvence a k jejímu následnému štěpení. Enzym Cas9 štěpí vždy jen takovou sekvenci, která je komplementární k jeho sgRNA. Vytvoření vhodné sgRNA představuje jednoduchou, rutinní záležitost a adaptace celého systému pro štěpení jakékoliv sekvence je nenáročná s ohledem na čas, materiál nebo know-how laboratoře [1].

CRISPR-Cas9 lze využít především k modulaci exprese genu, a to jak k aktivaci, tak jeho inhibici (schéma 1A) [5]. Vyřazení funkce genu v buňce můžeme dosáhnout pouhým rozštěpením řetězce DNA v místě vybraného genu. Dvouřetězcové zlomy v DNA jsou v lidské buňce nejčastěji opravovány pomocí mechanismu nehomologního spojování konců, které však vede často ke vzniku mutací v podobě krátkých inzercí nebo delecí v místě zlomu. Mutace pak mají za následek vznik nefunkčního genového produktu, a to jak na úrovni proteinu, tak nekódující RNA. Takto vyřazený gen nám umožňuje zkoumat jeho funkci v daném systému, např. jedná-li se o vyřazení onkogenu v nádorové buňce nebo o vyřazení nádorového supresoru v buňce zdravé.

Štěpení DNA lze také využít k opravě vybraného genu (schéma 1B). Pomocí CRISPR-Cas9 lze přímo eliminovat genetické změny vedoucí k nekontrolované proliferaci či metastazování [6]. V určité fázi buněčného cyklu má buňka k dispozici další typ oprav, a sice opravu řízenou homologní sekvencí. V tomto případě buňka využije jako templát pro opravu dvouřetězcového zlomu druhý homologní chromozom a výsledkem je dokonale opravené vlákno v původní podobě. Tento mechanismus je ale možné využít i pro vnesení změn do sekvence DNA. Pokud

do buňky vneseme spolu se systémem CRISPR-Cas9 i krátkou molekulu DNA, která má sekvenci homologní s cílovým genem lišící se pouze v místě bodové mutace, kterou chceme opravit, může tato DNA posloužit jako templát a oprava povede k nahrazení původní nefunkční varianty funkční variantou genu [7]. Tato možnost je zajímavá především pro genovou terapii. Na rozdíl od dřívějších metod genové terapie nabízí CRISPR-Cas9 přímou opravu nefunkčního genu, a nikoli pouze vnesení kopie genu, která je navíc v buňce přítomna pouze po přechodnou dobu, nebo se náhodně začlení do genomové DNA.

Další možností využití CRISPR-Cas9 je cílená epigenetická editace (schéma 1C) umožňující měnit např. histonové modifikace či DNA metylace a tím ovlivňovat expresi proteinů [8]. Vezmeme-li v úvahu množství epigenetických faktorů zahrnutých do regulace nádorových onemocnění, mohlo by zaměření se na tyto regulační mechanismy znamenat významný pokrok v terapii nádorů. Základem tohoto systému je komplex Cas9/sgRNA, ve kterém mutantní Cas9 není schopen štěpit DNA, proto funguje dohromady se sgRNA pouze jako naváděcí DNA vazebná doména. Fúzním partnerem Cas9 je potom další protein se specifickou funkcí, kterou chceme aplikovat na vybrané místo v DNA. Může se jednat např. o enzymy modifikující chromatin, které ovlivňují genovou expresi, a tím umožňují zvýšit nebo snížit množství genového produktu v buňce.

CRISPR-Cas9 v protinádorové terapii

Terapeutický potenciál CRISPR-Cas9 v oblasti protinádorové terapie byl potvrzen řadou *in vitro*, *in vivo* a *ex vivo* experimentů. Technologie CRISPR-Cas9 je nejvíce využívána v imunoterapii nádorových onemocnění, a to především v adoptivní imunoterapii, která je založená na izolaci pacientových T lymfocytů, jejich genetické modifikaci *ex vivo*, kultivaci a následném navrácení zpět do organismu, kde dojde k navození imunitní odpovědi v oblasti nádoru. Cílem genetických modifikací na T lymfocy-

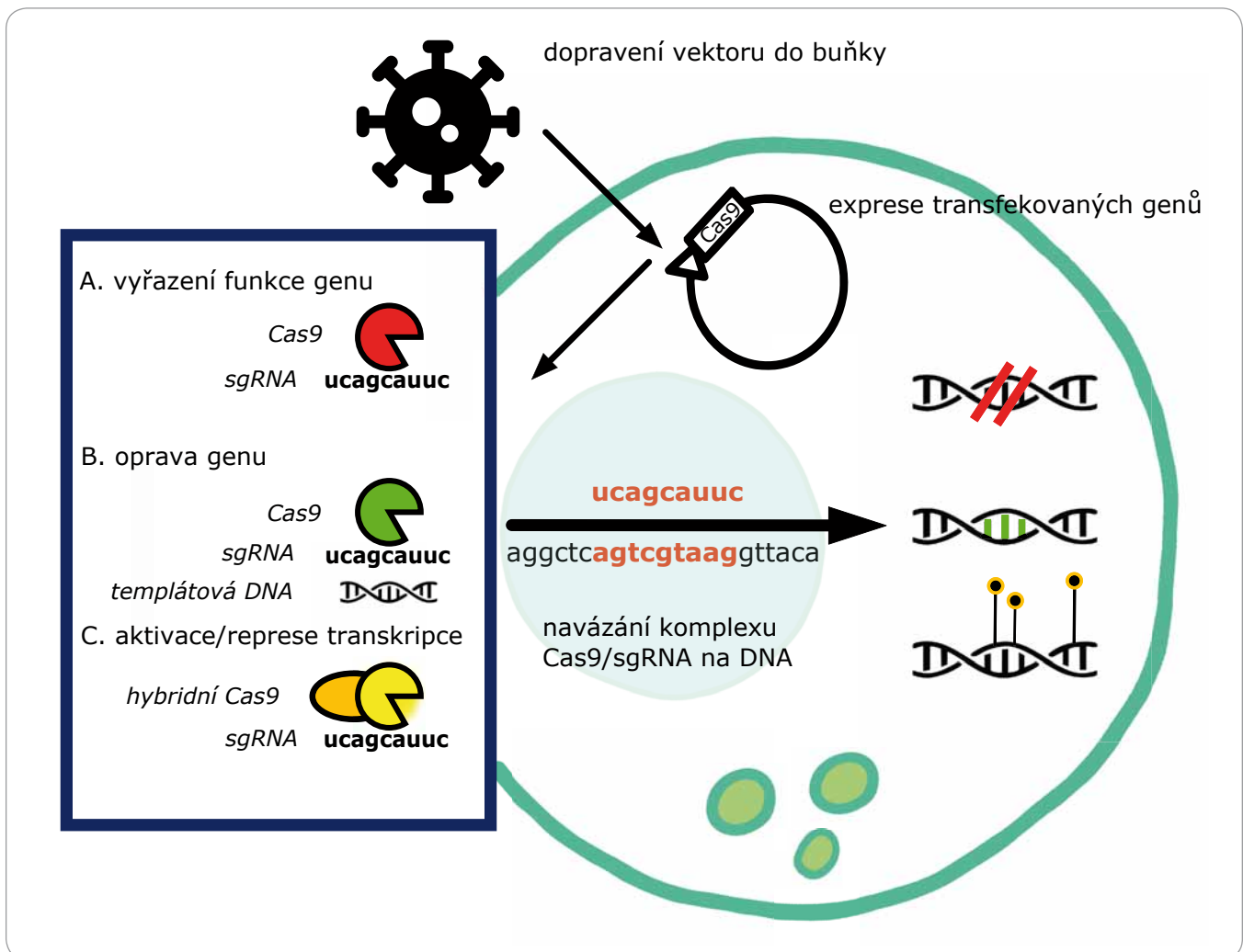


Schéma 1. Schéma mechanismů editace genomu metodou CRISPR-Cas9.
 sgRNA – single-guide RNA

tech je upevnit specifitu a zvýšit jejich afinitu k danému nádorovému antigenu, aktivovat imunitní odpověď a zároveň omezit riziko vzniku imunitní reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease – GvHD). Rozsah imunitní reakce je závislý na interakci řady různých receptorů a ligandů, které zesilují či tlumí procesy aktivace T lymfocytů. Důležitou roli v potlačení imunitní odpovědi v nádorovém mikroprostředí hrají tzv. kontrolní body imunitního systému. Za jeden z nich je považovaná interakce PD-1/PD-L1, která navozuje funkční inaktivitu lymfocytů, a tím chrání organismus před vznikem autoimunitních onemocnění [9]. Tato interakce přispívá k „vyčerpání“ (exhausting) efektorových lymfocytů, které nejsou schopné speci-

fické cytotoxické odpovědi a destrukce cílových buněk [10], což může naopak také vést k navození nádorové tolerance. K jejímu vzniku přispívá především exprese PD-L1 na povrchu nádorových buněk. Jednou z možností imunoterapie je vyřazení kontrolního bodu PD-1, a tím navození vyšší aktivity imunitního systému. Je nutno zmínit, že v současné době existují monoklonální protilátky blokuující receptor PD-1, ale i ligand PD-L1, které byly schváleny k léčbě pokročilého metastazujícího melanomu, renálního karcinomu a nemalobuněčného karcinomu plic [11,12]. T lymfocyty modifikované CRISPR-Cas9 s vyřazeným PD-1 byly použity v probíhající klinické studii (NCT02793856) (schéma 2A) provedené u pacientů s nemalobuněč-

ným karcinomem plic, u kterých selhala standardní léčba a u kterých byla zjištěna zvýšená exprese PD-L1 na nádorových buňkách. Jedná se o první studii, u které byly získány výsledky z CRISPR-Cas9 terapie. Studie je zaměřená na zhodnocení bezpečnosti a definování maximální tolerované dávky po implantaci autologních T lymfocytů modifikovaných CRISPR-Cas9 s vyřazeným PD-1 (PD-1^{-/-} T). Studie se zúčastnilo devět pacientů, dokončilo ji osm z nich. Pacienti byli zařazeni do tří skupin, s eskalací dávky 1×10^7 , 2×10^7 a 4×10^7 PD-1^{-/-} T/kg ve dvou cyklech. Z nežádoucích účinků bylo nejzávažnější nadměrné pocení (hyperhidróza) dosahující stupně 3. Dále u pacientů docházelo ke zvýšené aktivitě jaterních transamináz (ALT/AST),

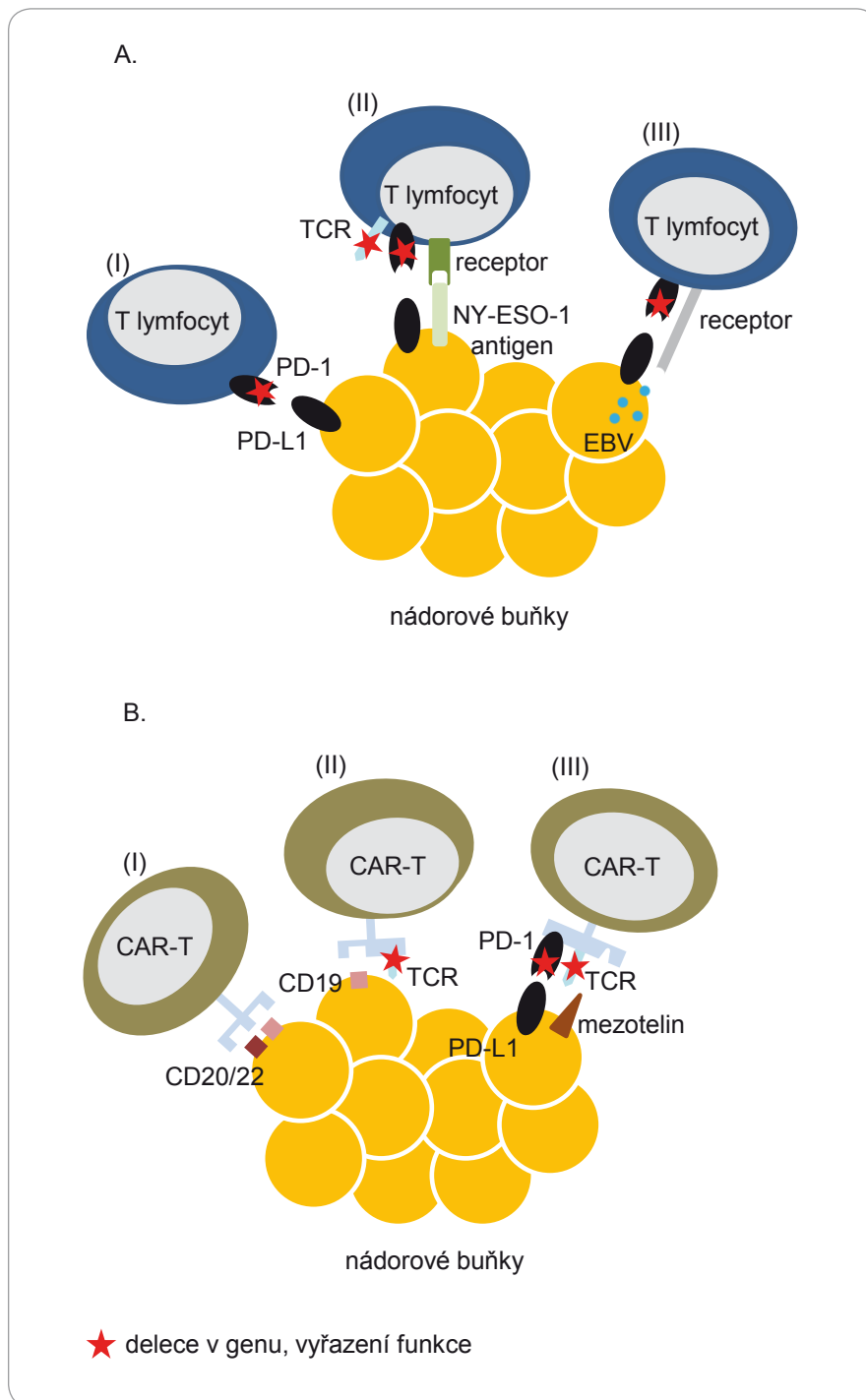


Schéma 2. Schéma terapeutické strategie.

A. CRISPR-Cas9 geneticky modifikované T lymfocyty (I) s vyřazeným PD-1, (II) s vyřazeným PD-1 a TCR a s modifikovaným receptorem selektivně se vázající na antigen NY-ESO-1, (III) s vyřazeným PD-1 a specifický se vázající k buňkám infikovaným EBV.

B. CAR-T lymfocyty (I) specifické k CD19 a CD20/22, (II) s vyřazeným TCR a specifické k CD19, (III) s vyřazeným TCR a PD-1 a specifické k mezotelinu.

TCR – T buněčný receptor, CAR – chimérický antigenní receptor

trombocytopenii, únavě či horečce, vše hodnoceno v mírné až střední závažnosti (stupeň 1–2). Jeden pacient trpěl

srdeční arytmií stupně 1, a to po dobu 42,4 týdne. Sedm pacientů odpovídalo na průběh léčby. U dvou bylo onemoc-

nění stabilizováno po dobu 18–22 týdnů a zároveň byla zjištěna větší diverzita T lymfocytů než u dalších pěti pacientů, u kterých došlo k progresi onemocnění. Kontrola onemocnění (disease control rate – DCR) po 8 týdnech byla zaznamenána ve 28,6 % a medián přežití bez progresu (progression-free survival – PFS) byl 7,6 týdne. Závěrem studie bylo konstatováno, že terapie PD-1^{-/-} T se zdá být bezpečná. Čtyři další klinické studie využívající obdobný koncept delecce PD-1 na autologních T lymfocytech byly registrovány při léčbě rakoviny prostaty (NCT02867345), močového měchýře (NCT02863913), jícnu (NCT03081715) a ledvin (NCT02867332). V další klinické studii (NCT03399448) (schéma 2A^{II}) je testováno využití T lymfocytů nesoucích tři různé genetické modifikace indukované CRISPR-Cas9 v léčbě mnohočetného myelomu, synoviálního sarkomu, myxoidního liposarkomu a melanomu. Kromě omezení exprese PD-1 bude vyřazena také část T buněčného receptoru (T-cell receptor – TCR) a vnesen modifikovaný receptor selektivně se vázající na antigen NY-ESO-1 exprimovaný na nádorových buňkách. Vyřazení TCR by mělo napomoci snížit riziko vzniku GvHD. Další klinická studie fáze I/II (NCT03044743) (schéma 2A^{III}) je registrována pro léčbu malignit asociovaných s virem Epstein a Barrové, u nichž velmi často dochází ke zvýšené expresi PD-L1. Ve studii budou využity T lymfocyty modifikované CRISPR-Cas9 s vyřazeným PD-1, které jsou specifické k buňkám infikovaným virem Epstein a Barrové. Jak již bylo zmíněno výše, k inhibici interakce PD-1/PD-L1 jsou v současné době využívány monoklonální protilátky. Přesto celý záměr s „nabuzením“ imunitního systému pomocí modifikovaných T lymfocytů vypadá velmi slibně a je další alternativou protinádorové terapie využitelnou v klinickém prostředí.

Další imunoterapeutická strategie je založena na využití modifikovaných T lymfocytů upravených *ex vivo* tak, aby exprimovaly chimérický antigenní receptor (chimeric antigen receptor – CAR). Ten je tvořen intracelulární doménou TCR, která vede k aktivaci T lymfocytů a spouští cytotoxickou odpověď, a extracelulární doménou spe-

cificky rozeznávající cílový antigen [13]. Výhodou těchto geneticky modifikovaných T lymfocytů je specifita vazby na cílový antigen bez nutnosti zpracování antigenu a jeho prezentace na hlavním histokompatibilním komplexu (major histocompatibility complex – MHC). Cílem je zajistit, aby tyto geneticky modifikované T lymfocyty rozpoznaly specifické antigeny vyskytující se na povrchu maligních buněk a eliminovaly je. Tato metodika se vyvíjí již více než 20 let [14]. V jejím průběhu vzniklo několik generací CAR a současně byly zdokonalovány metodiky bezpečného a účinného vložení CAR do autologních T lymfocytů. Původně byla používána transfekce DNA, dále pak transpozonové vektory obsahující element pro integraci, až po stabilní transdukcii T lymfocytů pomocí lentivirových vektorů [11]. Úspěšně byla testována specifita CAR-T lymfocytů k antigenu CD19, jehož exprese je omezena především na B lymfocyty a je ideálním cílovým antigenem pro hematologické malignity vycházející z B lymfocytární linie [12]. U řady pacientů velmi často dochází k relapsu onemocnění z důvodů ztráty CD19 na nádorových buňkách. Řešení nabízí probíhající klinická studie fáze I/II (NCT03398967) (schéma 2B^I), jejímž úkolem je zhodnotit proveditelnost a bezpečnost terapeutického použití CRISPR-Cas9 pro přípravu modifikovaných CAR-T lymfocytů specifických k CD19 a CD20 nebo k CD19 a CD22 u pacientů s recidivující B lymfocytární leukémií nebo s maligním B lymfomem. CD20 nebo CD22 jsou další antigenní struktury exprimované na povrchu B lymfocytů a CAR-T lymfocyty afinitní k těmto antigenům by napomohly rozpoznat nádorové buňky, u kterých došlo ke ztrátě CD19, a to rozpoznáním znaků CD20 nebo CD22.

Většina CAR-T lymfocytů je připravena z T lymfocytů jednotlivých pacientů, čímž se terapie výrazně prodlužuje a finančně prodražuje. Možností je příprava univerzálních CAR-T lymfocytů, u nichž však dochází ke zvýšení rizika vzniku GvHD. Riziko GvHD bylo výrazně sníženo u CAR editovaného pomocí CRISPR-Cas9 do receptorů $\alpha\beta$ TCR (tvořen polypeptidovými řetězci α a β) [15], které rozeznávají výhradně antigeny prezentované

na povrchu MHC molekul. V probíhající klinické studii (NCT03166878) (schéma 2B^{II}) jsou testovány CAR-T lymfocyty specifické k CD19 a s vyřazením TCR. Cílem je zjistit, zda tyto genetické modifikace T lymfocytů snižují riziko vzniku GvHD bez omezení terapeutického účinku u pacientů s recidivující B lymfocytární leukémií nebo s maligním B lymfomem. V další probíhající klinické studii (NCT03545815) (schéma 2B^{III}) jsou testovány CAR-T lymfocyty s CRISPR-Cas9 vyřazeným TCR a PD-1 (nebo CTLA-4), které se specificky vážou k mezotelinu, který je považován za povrchový antigen s vysokou expresí u řady solidních nádorů [16]. Vyřazení PD-1 nebo CTLA-4 (další kontrolní bod imunitního systému) napomáhá utlumit inhibiční mechanismy imunitního systému a podpořit jeho nabuzení v hostitelském prostředí [17].

Jediná registrovaná *in vivo* studie (NCT03057912) plánuje využít CRISPR-Cas9 k léčbě cervikálních intraepiteliálních neoplazií (CIN), které mohou vést zejména ke vzniku karcinomu děložního hrdla u žen. Hlavním kauzálním faktorem je infekce vysoce rizikovými lidskými papilomaviry (human papillomavirus – HPV), nejčastěji HPV16 a HPV18, u nichž v průběhu karcinogeneze dochází ke zvýšené expresi onkoproteinů E6 a E7. Cílem studie je eliminovat HPV přímo uvnitř lidského těla. Ženám ve věku 18–50 let s lehkou dysplazií (CIN I) a pozitivní HPV infekcí bude 2× týdně po dobu 4 týdnů aplikován na infikovaný čípek gel nesoucí konstrukty CRISPR-Cas9, které byly navrženy tak, aby omezily expresi virových proteinů E6 a E7 a tím zabránily maligní transformaci.

Závěr

Studie týkající se úprav genomu byly prováděny již od 80. let minulého století a byly víceméně neúspěšné. Jednak manipulace s DNA byly ještě do nedávna finančně i technicky náročné, navíc se požadované úseky DNA do genomu začleňovaly náhodně a nebylo možné ovlivnit, zda v cílovém místě dojde k poškození životně důležitého genu nebo nádorového supresorového genu, jehož ztráta by podpořila proces maligní transformace. Technologie editace genů zalo-

žená na CRISPR-Cas9 se tak ukázala nepostradatelnou pro vědecký pokrok. Je široce využitelná především v základním výzkumu při studiu funkce jednotlivých genů v procesu karcinogeneze. Jako více problematické se jeví využití CRISPR-Cas9 v protinádorové terapii. Je nutno podotknout, že před samotným využitím v klinické praxi bude ještě potřeba provést řadu optimalizací týkajících se účinnosti, bezpečnosti a specifčnosti metody. Budoucnost bude do značné míry záviset na schopnosti vyvinout nové varianty Cas9 stoprocentně specifické k cílové sekvenci a neovlivňující jiné buněčné procesy. V případě manipulace s buněčnými liniemi je možné tolerovat určité procento nespecifických interakcí, pokud však pracujeme s buňkami člověka/pacienta, jde o závažnou komplikaci. Bude nezbytně nutné zlepšit vnesení CRISPR-Cas9 do organismu v případě terapií *in vivo*. Nové možnosti se také otevírají v léčbě monogenně podmíněných dědičných chorob. V dnešní době již probíhá řada klinických studií hodnotících protinádorovou terapii založenou na CRISPR-Cas9 modifikacích T lymfocytů pacienta *ex vivo*. Netrpělivě jsou proto očekávány jejich výsledky, které by ujasnily možnosti využití tohoto přístupu v klinické praxi.

Literatura

- Cong L, Ran FA, Cox D et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819–823. doi: 10.1126/science.1231143.
- Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell* 2016; 164(1–2): 18–28. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.041.
- Gupta RM, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J Clin Invest* 2014; 124(10): 4154–4161. doi: 10.1172/JCI72992.
- Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* 2018; 9(1): 1911. doi: 10.1038/s41467-018-04252-2.
- Chen B, Gilbert LA, Cimini BA et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 2013; 155(7): 1479–1491. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.001.
- Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 2004; 431(7012): 1112–1117. doi: 10.1038/nature03043.
- Rouet P, Smith F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* 1994; 14(12): 8096–8106. doi: 10.1128/mcb.14.12.8096.
- Klann TS, Black JB, Chellappan M et al. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol* 2017; 35(6): 561–568. doi: 10.1038/nbt.3853.

9. Zatloukalova P, Pjehova M, Babcanova S et al. The role of PD-1/PD-L1 signaling pathway in antitumor immune response. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 4): 72–77. doi: 10.14735/amko20164S72.
10. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439(7077): 682–687. doi: 10.1038/nature04444.
11. Biffi A, Bartolomea CC, Cesana D et al. Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood* 2011; 117(20): 5332–5339. doi: 10.1182/blood-2010-09-306761.
12. Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood* 2016; 127(26): 3312–3320. doi: 10.1182/blood-2016-02-629063.
13. Xia AL, Wang XC, Lu YJ et al. Chimeric-antigen receptor T (CAR-T) cell therapy for solid tumors: challenges and opportunities. *Oncotarget* 2017; 8(52): 90521–90531. doi: 10.18632/oncotarget.19361.
14. Eshhar Z, Waks T, Gross G et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(2): 720–724. doi: 10.1073/pnas.90.2.720.
15. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 2017; 543(7643): 113–117. doi: 10.1038/nature21405.
16. Tang Z, Qian M, Ho M. The role of mesothelin in tumor progression and targeted therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; 13(2): 276–280.
17. Ren J, Zhang X, Liu X et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget* 2017; 8(10): 17002–17011. doi: 10.18632/oncotarget.15218.

Syntetická letalita – její současné využití a potenciál v onkologické léčbě

Synthetic Lethality – Its Current Application and Potential in Oncological Treatment

Bortlíková L.¹, Müller P.¹, Vojtěšek B.¹, Rak V.², Svoboda M.³

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

² Klinika radiační onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

³ Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Syntetická letalita je typ genové interakce, při níž je mutace v jednom z interagujících genů slučitelná s životaschopností buňky, ale vyřazení obou genů z funkce vede k buněčné smrti. Odhalením letálního účinku inhibitorů poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) na *BRCA1/2* mutantní buňky byl otevřen jeden z důležitých směrů vývoje cílené terapie v onkologii. Olaparib patří do skupiny inhibitorů PARP se díky tomu mohl stát prvním registrovaným léčivem fungujícím na principu syntetické letality a je nyní používán v klinické praxi hlavně v léčbě rekurentních high-grade serózních ovariálních karcinomů. Současný výzkum se zaměřuje na kombinovaný přístup, kdy by se podáním inhibitorů PARP spolu s inhibitory kináz zapojených do kontroly buněčného cyklu mohlo předcházet rezistenci k léčbě inhibitory PARP či již vzniklou rezistenci překonat. Zároveň probíhají klinické studie, které by mohly pomoci rozšířit využití inhibitorů PARP pro další typy malignit vykazující obdobný fenotyp jako mutace v genech *BRCA* (BRCAness fenotyp). Hledání dalších cílů pro vývoj nových léčiv na principu syntetické letality bylo usnadněno díky metodě CRISPR/Cas9, stále však přetrvává klíčový faktor neúspěchů screeningových experimentů, kterým je neúplná penetrance syntetické letality napříč populací buněk tumoru. **Cíl:** Záměrem této práce je poskytnout přehled současného využití principu syntetické letality v onkologické léčbě a nastínit, s jakými výzvami se nyní potýká výzkum potenciálních cílů pro vývoj nových léčiv založených na syntetické letalitě.

Klíčová slova

syntetická letalita – inhibitory PARP – olaparib – BRCAness – opravy DNA

Summary

Background: Synthetic lethality is a gene interaction where a defect in one of the interacting genes is compatible with cell viability, whereas the disruption of both genes leads to cell death. The discovery of the lethal effect of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in *BRCA1/2* mutant cells has opened an important direction in the development of targeted therapy in oncology. The PARP inhibitor olaparib has become the first registered drug for recurrent high-grade serous ovarian cancer treatment based on synthetic lethality that has reached the clinic. Current research focuses on the combination of PARP inhibitors and inhibitors of kinases, which control the cell cycle, to prevent or overcome resistance to PARP inhibitors. There are also ongoing clinical trials which examine PARP inhibitor treatment in other types of cancers including tumours presenting the so-called BRCAness phenotype. Screenings for new synthetic lethality targets which could serve as potential targets for new drug development have improved with the CRISPR/Cas9 technology, but another key problem persists in the screening efforts, namely the incomplete penetrance of synthetic lethality throughout a tumour cell population. **Purpose:** This paper summarises the current application of synthetic lethality principles in oncology and discusses the challenges in research focused on potential new drugs based on synthetic lethality.

Key words

synthetic lethality – PARP inhibitors – olaparib – BRCAness – DNA repair

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU1-LO1413. Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-33999A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413. Supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant nr. 15-33999A. All rights reserved.

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 recommendation for biomedical papers.



Mgr. Lucie Bortlíková
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: lucie.bortlikova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 31. 5. 2019

Přijato/Accepted: 19. 8. 2019

doi: 10.14735/amko20193S19

Úvod

Syntetická letalita byla popsána jako typ genové interakce, při níž je v případě defektu v jednom z interagujících genů životaschopnost buňky zachována, zatímco poškození obou genů vede k buněčné smrti [1] (schéma 1A). Poprvé byl tento koncept zaveden u modelového organismu *Drosophila melanogaster*, což vedlo k intenzivnímu zájmu o toto téma z pohledu vývojové biologie i genetiky, ale až díky několika významným pracím [2–4] vznikla myšlenka využít princip syntetické letality při vývoji nových terapeutických postupů v onkologii [5].

Z pohledu nádorové biologie se nejčastěji setkáváme se syntetickou letali-

tu ve formě indukované esenciality, mutace v genu nádorového supresoru může způsobit, že se díky ní stane jiný gen pro buňku esenciální [1] (schéma 1B). Tím se pak tento gen nebo jím kódovaný protein stává vhodným kandidátem pro cílenou farmakologickou inhibici. Na základě vztahu syntetické letality mezi oběma geny je tato inhibice fatální pouze pro nádorové buňky nesoucí mutaci v antionkogenu a u nenádorových buněk buněčná smrt nenastane [5].

Biologie nádorových buněk je však velmi komplexní a genové interakce mohou mít mnoho podob. I u syntetické letality je na základě charakteru interakce dvou genů možno rozlišovat mezi silnou a slabou syntetickou letali-

tu, přičemž silnou syntetickou letalitu není téměř vůbec možné ovlivnit změnou v dalších genech. Naopak při slabé syntetické letalitě se buňka nesoucí jinak letální mutace může vyhnout buněčné smrti vznikem nové mutace v dalším genu. Co se týče výběru genových interakcí, na které by mohla být uplatněna farmakologická inhibice za účelem protinádorové terapie, je žádoucí volit za cíl geny, které jsou ve vzájemném vztahu silné syntetické letality [1].

Inhibitory PARP

Významným spojníkem principu syntetické letality a vývoje nových terapeutických přístupů založených na inhibitory poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) byly dvě práce publikované v roce 2005 [6,7]. Obě poukázaly na vztah syntetické letality mezi PARP a geny *BRCA1* a *BRCA2* [5]. Buňky deficientní v genu *BRCA1* či *BRCA2* se ukázaly být velmi významně citlivé k inhibici PARP, která u nich vede k nestabilitě chromozomů, zastavení buněčného cyklu a postupné apoptóze [6,7].

BRCA1 a *BRCA2* jsou tumor supresorové geny, jejichž funkce je důležitá pro opravu dvouvláknových zlomů DNA pomocí homologní rekombinace (HR). Pokud jsou v zárodečné linii heterozygotně mutované, zvyšuje se pravděpodobnost vzniku různých typů karcinomů [8]. Inhibitory PARP cílí na další z typů oprav poškozené DNA, v tomto případě jednovláknových zlomů. Funkční enzymy PARP1 a PARP2 jsou zásadní pro správnou aktivaci kaskády vedoucí k opravě DNA pomocí nehomologního spojování konců (non-homologous end joining – NHEJ), a především pomocí excizní reparace bází (base excision repair – BER) tím, že se vážou do jednovláknových zlomů a postranlačně modifikují substrát syntézou poly(ADP-ribózových) řetězců, tzv. PARylací [5,8]. Inhibice PARP vede k replikačnímu stresu a zapříčiňuje tak vznik dvouvláknových zlomů, které u *BRCA* mutantních buněk nemohou být opraveny pomocí HR, což vede k zastavení buněčného cyklu a k buněčné smrti [6,9].

Nadějné výsledky, které vzešly z preklinické fáze testování inhibitorů PARP, byly dále zkoumány v klinických studiích za-

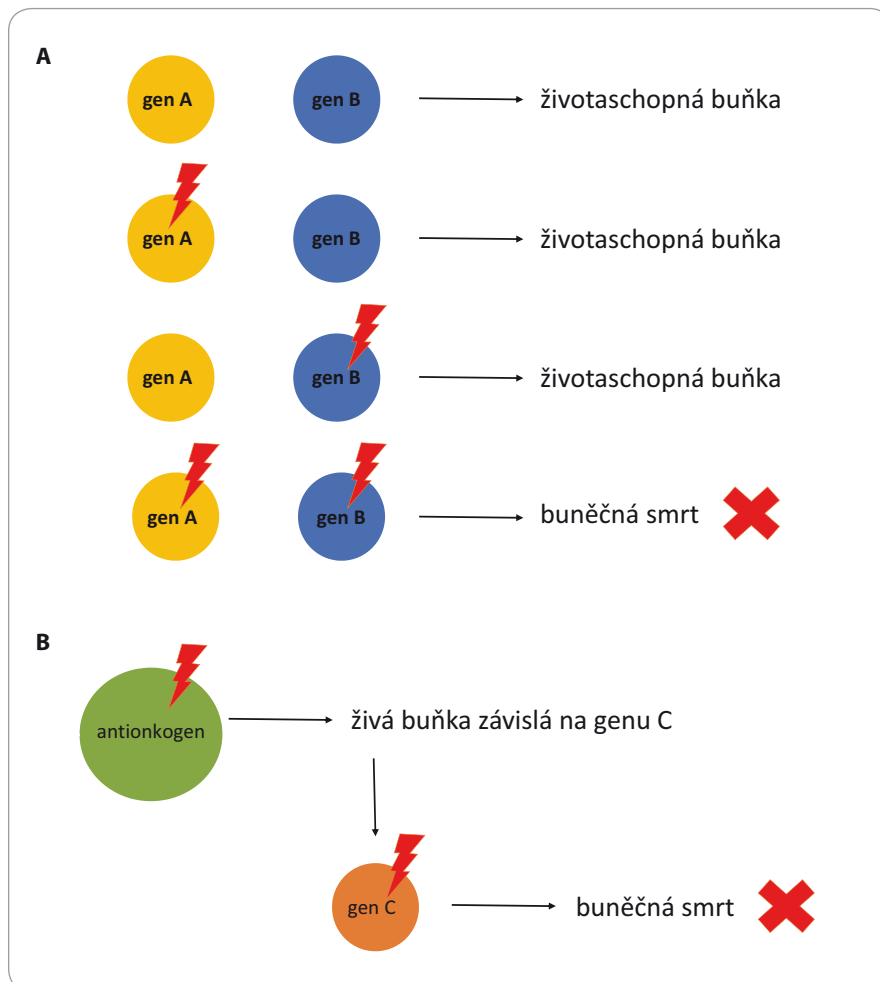


Schéma 1. Syntetická letalita.

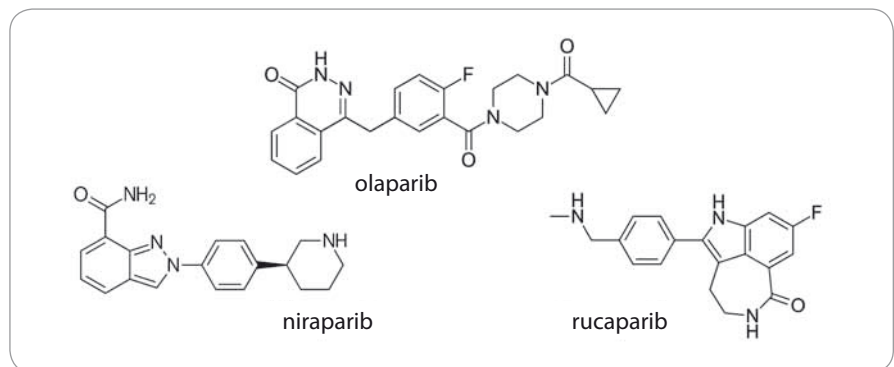
A. Klasické schéma syntetické letality mezi geny A a B – mutace v jednom z těchto dvou genů je slučitelná s přežitím buňky, mutace v obou genech způsobí buněčnou smrt.

B. Schéma syntetické letality v případě indukované esenciality – mutace v antionkogenu způsobí u buňky závislost na funkčním genu C, pokud je gen C následně také mutován či jinak inhibován, buňka není schopná přežít [1].

hrnujících pacientky s ovariálním karcinomem nesoucím mutaci v genech *BRCA1/2* [10,11]. Na základě dobré odpovědi v klinických zkouškách dostal v roce 2014 první inhibitor PARP s názvem olaparib (obr. 1) zrychlené schválení od amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (U.S. Food and Drug Administration – FDA). O něco později byl také schválen Evropskou lékovou agenturou (European Medicines Agency – EMA) [9,12]. V současné době je olaparib podle EMA registrován k udržovací léčbě po chemoterapii na bázi platiny pro dospělé pacienty s *BRCA1/2* mutantním nebo k platině citlivým (bez ohledu na *BRCA* status) rekurentním epiteliálním high-grade karcinomem ovaria, vejcovodu či peritonea. Navíc obdržel schválení od FDA také k léčbě HER2 negativního metastazujícího karcinomu prsu po prodělané chemoterapii u pacientů se zárodečnou mutací v *BRCA1/2* [9]. Dalšími registrovanými inhibitory PARP pro léčbu ovariálních karcinomů jsou také rucaparib a niraparib [5,9] (obr. 1). Objevuje se také stále více experimentálních dat zaměřených na použití inhibitorů PARP i u jiných malignit nesoucích mutaci *BRCA*, např. u karcinomu pankreatu nebo prostaty [13].

Rezistence vůči léčbě inhibitory PARP

I přes obecně dobrou odpověď na léčbu inhibitory PARP se u značné části pacientů s ovariálním karcinomem i karcinomem prsu vyskytují případy rezistence [5]. Mechanismů jejího vzniku bylo navrženo několik, přičemž velká část z nich je založena na obnovení HR u nádorových buněk [13]. V jejich nestabilním genomu mohou po inhibici oprav DNA normálně zprostředkovaných PARP vznikat reverzní mutace, které přímo obnovují funkci genu *BRCA2* [14] a na základě přirozené selekce začnou být dominantní a proliferovat hlavně ty klonové nádorových buněk, které nesou reverzní mutaci [5]. Některé práce také ukazují, že HR může být obnovena ztrátou či sníženou expresí proteinu 53BP1 (p53 binding protein 1) [15] nebo mutací *REV7* (znám také jako *MAD2L2*) (mitotic arrest deficient 2 like 2) [16]. *REV7* je součástí nedávno popsaného proteinového komplexu Shieldin, jehož další tři podjednotky



Obr. 1. Chemické struktury olaparibu, niraparibu a rucaparibu.

jsou SHLD1, SHLD2 a SHLD3. Tento komplex se shlukuje kolem dvouvláknového zlomu DNA a jako opravný mechanismus podporuje NHEJ [17,18]. Ztráta Shieldinu tedy narušuje NHEJ a podporuje rezistenci k inhibitorům PARP skrze obnovu HR u *BRCA* mutantních buněk [18,19].

U buněčných linií odvozených od nádoru tlustého střeva bylo prokázáno, že inhibitory PARP snižují expresi proteinu PARP1, čímž se zvyšuje rezistence buněk vůči těmto inhibitorům [20]. Podobně snížení endogenní hladiny proteinu PARP1 působením miRNA-210 vede k rezistenci vůči inhibitorům PARP [21,22]. Na druhou stranu je podle další studie také overexprese PARP1 u buněčné linie odvozené od karcinomu prsu spojena s rezistencí vůči olaparibu [23].

Dalším z prokázaných mechanismů rezistence vůči inhibitorům PARP u myších modelů bylo snížení intracelulární koncentrace rucaparibu, zapříčiněné jeho efluxem z buněk skrze up-regulaci BCRP/ABCG2 (breast cancer resistance protein), a P-glykoproteinu ABCB1, které jsou oba členy proteinové super-rodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérů [22,24,25].

Pro vývoj terapeutických strategií, které by vedly k překonání rezistence vůči inhibitorům PARP, však bude nutné provést další studie, jež by význam výše zmíněných mechanismů navržených na základě experimentů na myších modelech a buněčných liniích zhodnotily také u onkologických pacientů [22].

Inhibitory PARP a kontrola buněčného cyklu

Podle aktuálních poznatků ovlivňují inhibitory PARP buněčný cyklus tak, že se

zvyšující se koncentrací inhibitoru dochází k akumulaci buněk ve střední až pozdní S fázi a inhibici buněčné proliferace [26]. Pro buňky *BRCA* deficientních nádorů je zablokování PARylace olaparibem fatální pravděpodobně kvůli narušené schopnosti protekce replikační vidlice během S fáze a jejího následného kolapsu [6,7,27]. Původní model, ve kterém bylo navrženo, že inhibitory PARP způsobují tento kolaps v důsledku ustrnutí replikační vidlice [7], byl nedávno vyvrácen pomocí měření rychlosti progresu replikační vidlice. PARylace totiž za normálních okolností funguje společně s proteinem p21^{WAF} jako senzor replikačního stresu a v koordinaci s celou regulační sítí ovládanou hlavně PARP1 a proteinem p53 rychlost replikační vidličky snižuje. Ovlivnění buněk 10 μ m olaparibem po dobu 24 hod zrychlilo šíření vidlice až o 60 %, přičemž již 40% zvýšení rychlosti oproti běžnému stavu vede k poškození DNA, které je u buněk s poruchou v HR nevrátit [26].

V současné době je kladen důraz na optimalizaci kombinovaných přístupů tak, aby bylo možné vyhnout se vzniku rezistence vůči léčbě inhibitory PARP, popř. již vzniklou rezistenci překonat. Jedním z těchto přístupů je kombinace inhibitorů PARP spolu s inhibitory kináz – ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), CHEK1 (checkpoint kinase 1) nebo WEE1 (WEE1 G2 checkpoint kinase), které jsou zapojeny do kontroly buněčného cyklu [28]. ATR funguje jako centrální kontrolní bod, který v případě poškození DNA aktivuje kinázu CHEK1 a vede k celkové zástavě replikace DNA. CHEK1 dále aktivuje WEE1, která přímou fosforylací udržuje jinak

tivní cyklin dependentní kinázy CDK1/2 (cyclin-dependent kinase 1/2), a tím udržuje buňku v G1 fázi buněčného cyklu [29–31]. Použití inhibitoru jednoho z komponent této dráhy společně s inhibitorem PARP by mělo limitovat čas určený pro opravu DNA (v případě vzniku rezistence např. pomocí obnovené HR), a tím posílit replikaci poškozené DNA. Nekontrolovatelná replikace následně vede k rozsáhlému poškození DNA, které se stává pro nádorovou buňku letální. Klinické studie, které kombinují olaparib a některý z inhibitorů buněčného cyklu, jsou nyní ve fázi I či II a poskytnou důležitá data o vlivu ATR, CHEK1 a WEE1 inhibitorů na rezistenci vůči léčbě inhibitory PARP [28].

Interakce mezi ATR, CHEK1 a WEE1

Z preklinických studií navíc vyplývá, že některé z výše uvedených kináz mají mezi sebou vztah syntetické letality [32–34], což může sloužit jako logický základ pro další klinické studie, které budou testovat také kombinace jejich inhibitorů v protinádorové terapii [28]. Například buněčná linie MCF-7 odvozená od karcinomu prsu vykazovala syntetickou letalitu po společném ovlivnění látkami VE821 (inhibitor ATR) a AZD7762 (inhibitor CHEK1) [28,32]. Inhibice CHEK1 totiž vede k zesílení replikačního stresu prostřednictvím CDK2 a k většímu počtu míst s jednovláknovou DNA, což normálně vede k aktivaci ATR, která chrání replikační vidlici před kolapsem pomocí replikačního proteinu A (replication protein A – RPA) [32,35]. Použití inhibitorů ATR a CHEK1 současně vedlo u MCF-7 buněk k velkému počtu zastavených replikačních vidlic kolabujících do dvouvláknových zlomů a následně k buněčné smrti [32]. V preklinických modelech se také současná inhibice CHEK1 a WEE1 ukázala být synteticky letální [33,34].

ATR, CHEK1 i WEE1 jsou si podobné v tom, jakou zastávají funkci v signální dráze kontroly přechodu buňky z G1 fáze, avšak podle dalších prací vykazují rozdílnou funkci v ochraně replikační vidlice [36–39]. Ta může být důležitá při volbě jedné z těchto tří kináz jako vhodného cíle k inhibici v kombi-

nované terapii zaměřené na překonání rezistence vůči inhibitorům PARP. Pokud by totiž ochrana replikační vidlice byla u buněk s rezistencí k inhibitorům PARP jedním z kompenzačních mechanismů, pak by bylo důležité zvolit inhibitor buněčného cyklu, který cílí nejen na opravu DNA pomocí HR, ale i na ochranu replikační vidlice. Tím by podle posledních prací mohly být inhibitory ATR a WEE1, nikoli však CHEK1 [28].

Využití inhibitorů PARP u nádorů s BRCAness fenotypem

K dalšímu rozšíření skupiny pacientů, která by benefitovala z léčby inhibitory PARP, by mohlo vést také studium nádorů s BRCAness fenotypem. Tento pojem se užívá k definování skupiny nádorů, které nenesou germinální mutaci v *BRCA1/2*, ale s *BRCA* mutantními nádory mají totožný fenotyp, což je způsobeno defektní HR [40]. Patří mezi ně především tumory se somatickou mutací v *BRCA1/2*, s hypermetylací v *BRCA1* promotoru nebo nádory s mutací v dalších genech zapojených do opravy dvouvláknových zlomů DNA, jako je např. *ATR*, *RAD51* (*RAD51* recombinase), *PALB2* (partner and localizer of *BRCA2*) či *BRIP1* (*BRCA1* interacting protein C-terminal helicase 1). Díky defektu v HR tyto nádory mohou také vykazovat syntetickou letalitu po aplikaci inhibitorů PARP [13,40]. S rozšířením sekvenování lidských nádorů se ukázalo, že mutace genů, které mohou vykazovat BRCAness fenotyp, nese značná část high-grade serózních ovariálních karcinomů, pokročilých kastrocně rezistentních karcinomů prostaty, nádorů pankreatu a dalších typů tumorů [5,40–42]. Pro možnost využít inhibitory PARP u nádorů s tímto fenotypem je důležité stanovit biomarker, na jehož základě by bylo možné predikovat odpověď na léčbu inhibitory PARP [13]. Klinická studie I-SPY 2 testovala klasifikátor obsahující 77 genů navržený ke zhodnocení BRCA1ness fenotypu a předpovědi reakce na inhibici PARP společně s karboplatinou. Přestože autoři dokázali prokázat spojitost mezi klasifikací BRCA1ness a odpovědí pacientů na léčbu, tato studie zahrnovala jen omezený počet pacientů, takže spolehlivý biomarker, který by byl vhodný

pro klinickou praxi, v současné době ještě dostupný není [13,40,43].

Vývoj léčiv založených na syntetické letalitě

Ačkoli je koncept syntetické letality znám již dlouho a její potenciál pro protinádorovou terapii byl odhalen už před více než 10 lety, inhibitory PARP jsou stále jedinými schválenými léčivy, které fungují na principu syntetické letality [5]. I když se nyní obrací pozornost k překonání mechanismů rezistence vůči inhibitorům PARP a k rozšíření skupiny pacientů, pro které mohou být inhibitory PARP přínosné, stále je jen malá část onkologických pacientů léčena pomocí cílené terapie. Je tedy důležité hledat také nové geny, na které by se cílená léčba na principu syntetické letality mohla zaměřit [44].

V průběhu let bylo provedeno velké množství screeningů, jež měly odhalit významné syntetické letality mezi geny, které se často účastní vzniku nádorových onemocnění [5]. Že z těchto screeningů nevzešla nová úspěšná léčiva, bylo často připisováno hlavně technickým problémům jako např. RNA interferenci (RNAi), která byla používána k umlčování transkripce genů. Ačkoli novější způsob editace genů pomocí CRISPR/Cas9 metodu RNAi předčil a vyvolal novou vlnu zájmu o screeningy, pořád přetrvává další klíčový faktor, který limituje hledání syntetických letalit významných pro klinickou praxi, a tím je neúplná penetrance syntetických letalit. Termín penetrance syntetické letality označuje, jaká část klonů nádorových buněk nesoucích specifickou genovou mutaci (tj. většinou „driver“ mutaci) podlehne buněčné smrti po inhibici cílového partnera, který je s tímto genem ve vztahu syntetické letality. V ideálním případě by léčba založená na syntetické letalitě měla mít úplnou penetranci. To znamená, že inhibice synteticky letálního partnera by u všech buněk nádoru nesoucích „driver“ mutaci vedla k buněčné smrti, a to bez ohledu na molekulární pozadí (tzn. bez ohledu na výskyt dalších mutací) [44].

Pro vývoj nových léčiv založených na synteticky letální interakci genů jsou tedy nevhodnější syntetické letality vykazující vysokou penetranci. Velká část

screeningů však byla v minulosti usku-
tečena pouze na jednom definovaném
genetickém pozadí (např. na jedné bu-
něčné linii), a chybí tedy informace o tom,
jakou relevanci mají tyto synteticky le-
tální vztahy napříč jinými genetickými po-
zadími [44]. Tomu nasvědčují i výsledky
screeningu hledajícího synteticky letální
partnery proto-onkogenu *KRAS*, který vy-
užil metodu CRISPR/Cas9 u dvou buněč-
ných linií kolorektálního karcinomu, kdy
většina syntetických letalit byla identifiková-
na pouze u jedné ze dvou buněčných
linií [45]. Podobně v jiné studii, která zahr-
novala tři buněčné linie a cílila na 73 genů
zapojených do vzniku rakoviny, autoři
identifikovali asi jen 10 % syntetických le-
talit u více než jedné buněčné linie [46].

Důvodem neúplné penetrance je na
jedné straně tkáňová specifita genové
regulace a signálních drah, kdy např.
u panelu buněčných linií odvozených
od akutní myeloidní leukemie byla po-
tvrzena syntetická letalita mezi geny
PRES1 a *RAS*, ale u linií odvozených od
jiných buněčných typů po mutaci či in-
hibici obou genů k buněčné smrti ne-
dojde [44,47]. Dalším důvodem je také
heterogenita populace buněk v rámci
jednoho nádoru, kdy nemusí všechny
buňky napříč tumorem nést stejnou mu-
taci, podobně jako v případě výše zmí-
něného vzniku rezistence vůči inhibitoru
PARP pomocí reverzní mutace obnovující
u části buněk funkci genu *BRCA2* [14,44].

Limitací screeningů zaměřených na
syntetickou letalitu, které jsou provádě-
ny *in vitro* na buněčných liniích rostou-
cích v jedné vrstvě na povrchu kultivační
nádoby, je také omezená interakce mezi
buňkami. Objevený vztah syntetické le-
talit v tomto prostředí pak nemusí být
platný v rámci nádoru, kde buněčná ko-
munikace probíhá v 3D struktuře. Tento
problém by mohlo řešit použití 3D bu-
něčných kultur, případně využití myších
či xenograftových modelů, které sice
v současnosti nelze z technických dů-
vodů využít k velkým screeningům, ale
tyto bariéry mohou být s vývojem tech-
nologii poměrně brzy překonány. K větší
efektivitě při hodnocení dat ze screenin-
gových experimentů by mohlo přispět
také filtrování relevantnosti výsledků
podle již známých syntetických letalit
z jiných modelových organizmů [44].

Závěr

Objevení vztahu syntetické letality mezi
geny *PARP1* a *BRCA1/2* otevřelo cestu
léčbě cílené na tento způsob genové in-
terakce. Inhibitor PARP s názvem olaparib
je v současné době užíván v klinické
praxi s dobrými výsledky, avšak i vůči
tomuto typu léčby může vznikat rezis-
tence. Jedině pochopení jejího vzniku
může vést k úspěšnému překonání rezis-
tence. To by mohl přinést např. tes-
tovaný kombinovaný přístup, kdy jsou
společně s inhibitoru PARP podávány
také inhibitory ATR nebo WEE1. K rozší-
ření skupiny pacientů léčených inhibi-
tory PARP může v budoucnu také přispět
navržení vhodného klasifikátoru zhod-
nocujícího BRCAness fenotyp u různých
typů nádorů, jenž by umožnil predikci
odpovědi na tuto léčbu, která cílí na ná-
dorové buňky s defektní HR. Od regist-
race inhibitorů PARP se do klinické praxe
jiná léčiva fungující na principu synte-
tické letality ještě nedostala, to by mohl
pomoci změnit způsob, jakým jsou nav-
rhovány experimenty hledající nové synte-
tické letální genové interakce. Návrh
budoucích experimentů by měl mimo
jiné také zohledňovat význam studia
penetrance konkrétní syntetické leta-
lity napříč různými genetickým pozadím,
což může napovědět, jaká by mohla být
úspěšnost léčby cílené na geny v synte-
tické letálním vztahu. Využití nových
modelů jako např. 3D buněčných linií či
xenograftů může také pomoci lépe re-
prezentovat mezibuněčnou komunikaci
uvnitř tumoru a látka cílící na geny, je-
jichž synteticky letální vztah by byl po-
tvrzen i v tomto experimentálním nastave-
ní, bude mít větší šanci dostat se do
klinických studií.

Literatura

1. Ashworth A, Lord CJ, Reis-Filho J. Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell* 2011; 145(1): 30–38. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.020.
2. Hartwell LH, Szankasi P, Roberts CJ et al. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* 1997; 278(5340): 1064–1068. doi: 10.1126/science.278.5340.1064.
3. Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(9): 689–698. doi: 10.1038/nrc1691.
4. Brummelkamp TR, Bernards R. New tools for functional mammalian cancer genetics. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10): 781–789. doi: 10.1038/nrc1191.
5. Ashworth A, Lord CJ. Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors? *Nat Rev Clin*

Oncol 2018; 15(9): 564–576. doi: 10.1038/s41571-018-0055-6.

6. Farmer H, McCabe N, Lord CJ et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; 434(7035): 917–921. doi: 10.1038/nature03445.
7. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005; 434(7035): 913–917. doi: 10.1038/nature03443.
8. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science* 2017; 355(6330): 1152–1158. doi: 10.1126/science.aam7344.
9. Minchom A, Aversa C, Lopez J. Dancing with the DNA damage response: next-generation anti-cancer therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol* 2018; 10: 1–18. doi: 10.1177/1758835918786658.
10. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 2010; 376(9737): 245–251. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60893-8.
11. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol* 2011; 12(9): 852–861. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70214-5.
12. Evans T, Matulonis U. PARP inhibitors in ovarian cancer: evidence, experience and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* 2017; 9(4): 253–267. doi: 10.1177/1758834016687254.
13. Turk AA, Wisinski KB. PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside. *Cancer* 2018; 124(12): 2498–2506. doi: 10.1002/cncr.31307.
14. Sakai W, Swisher EM, Karlan BY et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* 2008; 451(7182): 1116–1120. doi: 10.1038/nature06633.
15. Jaspers JE, Kersbergen A, Boon U et al. Loss of 53BP1 causes PARP inhibitor resistance in BRCA1-mutated mouse mammary tumors. *Cancer Discov* 2013; 3(1): 68–81. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0049.
16. Xu G, Chapman JR, Brandsma I et al. REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature* 2015; 521(7553): 541–544. doi: 10.1038/nature14328.
17. Ghezraoui H, Oliveira C, Becker JR et al. 53BP1 cooperation with the REV7-shieldin complex underpins DNA structure-specific NHEJ. *Nature* 2018; 560(7716): 122–127. doi: 10.1038/s41586-018-0362-1.
18. Noordermeer SM, Adam S, Setiapputra D et al. The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature* 2018; 560(7716): 117–121. doi: 10.1038/s41586-018-0340-7.
19. Dev H, Chiang TW, Lescale C et al. Shieldin complex promotes DNA end-joining and counters homologous recombination in BRCA1-null cells. *Nat Cell Biol* 2018; 20(8): 954–965. doi: 10.1038/s41556-018-0140-1.
20. Liu X, Han EK, Anderson M et al. Acquired resistance to combination treatment with temozolomide and ABT-888 is mediated by both base excision repair and homologous recombination DNA repair pathways. *Mol Cancer Res* 2009; 7(10): 1686–1692. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0299.
21. Volinia S, Galasso M, Sana ME et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(8): 3024–3029. doi: 10.1073/pnas.1200010109.
22. Du Y, Yamaguchi H, Hsu JL et al. PARP inhibitors as precision medicine for cancer treatment. *Natl Sci Rev* 2017; 4(4): 576–592. doi: 10.1093/nsr/nwx027.
23. Gilabert M, Launay S, Ginestier C et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) overexpression in human

- breast cancer stem cells and resistance to olaparib. *PLoS One* 2014; 9(8): e104302. doi: 10.1371/journal.pone.0104302.
24. Durmus S, Sparidans RW, van Esch A et al. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1) restrict oral availability and brain accumulation of the PARP inhibitor rucaparib (AG-014699). *Pharm Res* 2015; 32(1): 37–46. doi: 10.1007/s11095-014-1442-z.
25. Vaidyanathan A, Sawers L, Gannon AL et al. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 2016; 115(4): 431–441. doi: 10.1038/bjc.2016.203.
26. Maya-Mendoza A, Moudry P, Merchut-Maya JM et al. High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature* 2018; 559(7713): 279–284. doi: 10.1038/s41586-018-0261-5.
27. Schlacher K, Wu H, Jasin, M. A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell* 2012; 22(1): 106–116. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.015.
28. Haynes B, Murai J, Lee JM. Restored replication fork stabilization, a mechanism of PARP inhibitor resistance, can be overcome by cell cycle checkpoint inhibition. *Cancer Treat Rev* 2018; 71: 1–7. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.09.003.
29. Yekezare M, Gómez-González B, Diffley JF. Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally. *J Cell Sci* 2013; 126(6): 1297–1306. doi: 10.1242/jcs.096701.
30. Mechali M. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(10): 728–738. doi: 10.1038/nrm2976.
31. Carrassa L, Damia G. DNA damage response inhibitors: mechanisms and potential applications in cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2017; 60: 139–151. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.08.013.
32. Sanjiv K, Hagenkort A, Calderon-Montano JM et al. Cancer-specific synthetic lethality between ATR and CHK1 kinase activities. *Cell Reports* 2016; 17(12): 3407–3416. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.031.
33. Magnussen GI, Emilsen E, Giller Fleten K et al. Combined inhibition of the cell cycle related proteins Wee1 and Chk1/2 induces synergistic anti-cancer effect in melanoma. *BMC Cancer* 2015; 15: 462. doi: 10.1186/s12885-015-1474-8.
34. Guertin AD, Martin MM, Roberts B et al. Unique functions of CHK1 and WEE1 underlie synergistic anti-tumor activity upon pharmacologic inhibition. *Cancer Cell Int* 2012; 12(1): 45. doi: 10.1186/1475-2867-12-45.
35. Toledo LI, Altmeyer M, Rask MB et al. ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* 2013; 155(5): 1088–1103. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.043.
36. Elvers I, Hagenkort A, Johansson F et al. CHK1 activity is required for continuous replication fork elongation but not stabilization of post-replicative gaps after UV irradiation. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(17): 8440–8448. doi: 10.1093/nar/gks646.
37. Couch FB, Bansbach CE, Driscoll R et al. ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev* 2013; 27(14): 1610–1623. doi: 10.1101/gad.214080.113.
38. Kim H, George E, Ragland R et al. Targeting the ATR/CHK1 Axis with PARP inhibition results in tumor regression in BRCA-mutant ovarian cancer models. *Clin Cancer Res* 2017; 23(12): 3097–3108. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2273.
39. Dominguez-Kelly R, Martin Y, Koundrioukoff S et al. Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J Cell Biol* 2011; 194(4): 567–579. doi: 10.1083/jcb.201101047.
40. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer* 2016; 16(2): 110–120. doi: 10.1038/nrc.2015.21.
41. Waddell N, Pajic M, Patch AM et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015; 518(7540): 495–501. doi: 10.1038/nature14169.
42. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 2015; 161(5): 1215–1228. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.001.
43. Severson TM, Wolf DM, Yau C et al. The BRCA1ness signature is associated significantly with response to PARP inhibitor treatment versus control in the I-SPY 2 randomized neoadjuvant setting. *Breast Cancer Res* 2017; 19(1): 99. doi: 10.1186/s13058-017-0861-2.
44. Ryan CJ, Bajrami I, Lord CJ. Synthetic lethality and cancer – penetrance as the major barrier. *Trends Cancer* 2018; 4(10): 671–683. doi: 10.1016/j.trecan.2018.08.003.
45. Martin TD, Cook DR, Choi MY et al. A role for mitochondrial translation in promotion of viability in K-Ras mutant cells. *Cell Rep* 2017; 20(2): 427–438. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.061.
46. Shen JP, Zhao D, Sasik R et al. Combinatorial CRISPR-Cas9 screens for de novo mapping of genetic interactions. *Nat Methods* 2017; 14(6): 573–576. doi: 10.1038/nmeth.4225.
47. Wang T, Yu H, Hughes NW et al. Gene essentiality profiling reveals gene networks and synthetic lethal interactions with oncogenic Ras. *Cell* 2017; 168(5): 890–903. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.013.

Pokroky ve využití organokovových sloučenin při vývoji protinádorových léčiv

Progress in the Utilisation of Organometallic Compounds in the Development of Cancer Drugs

Skoupilová H., Hrstka R.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Organokovové sloučeniny jsou látky, které obsahují vazbu uhlík-kov. Z biologického hlediska jsou tyto sloučeniny všeobecně považovány za látky toxické pro živé organismy. Díky tomu však současně vykazují terapeutický potenciál, především jako protinádorová nebo antimikrobiální léčiva. Jsou variabilní co do struktury, obvykle bez náboje a většinou mají lipofilní charakter. V oblasti medicíny se doposud nejvíce osvědčily deriváty platiny, především cisplatin, která je jednou z nejdéle používaných chemoterapeutických látek. Na její úspěchy se vědecká komunita snaží navázat syntézou dalších organokovových sloučenin vykazujících výraznější protinádorové účinky a současně nižší cytotoxicitu vůči zdravým tkáním. Velká pozornost je upínána zejména ke sloučeninám nesoucím atomy železa, titanu nebo ruthenia. **Cíl:** V této práci jsme se zaměřili na popis nejdůležitějších sloučenin obsahujících ve své struktuře atomy železa, titanu nebo ruthenia, které by potenciálně mohly být využity při léčbě onkologických onemocnění, a zahrnuli jsme také mechanismus účinku u některých podrobněji zkoumaných sloučenin. Uvedené sloučeniny byly úspěšně testovány v preklinických studiích vč. zvířecích modelů a některé byly testovány i v rámci klinických studií. Navzdory skutečnosti, že řada doposud testovaných organometalických látek v klinických hodnoceních neuspěla, stále je k dispozici několik kandidátů, u kterých se očekává postoupení do dalších fází klinických studií ať už samostatně, nebo jako součást kombinované chemoterapeutické léčby. Jedná se zejména o sloučeniny obsahující ruthenium, které mají vysoký potenciál použití díky své nízké cytotoxicitě, ale současně vysoké schopnosti inhibovat neoangiogenezi a tvorbu metastáz.

Klíčová slova

rakovina – chemoterapie – léčiva – organometalické sloučeniny – titan – ruthenium

Summary

Background: Organometallic compounds are chemical substances containing a carbon-metal bond. From a biological point of view, these compounds are generally considered to be toxic for living organisms. They may exert therapeutic potential, especially as anticancer or antimicrobial drugs. Their structural variability and usually uncharged and mostly lipophilic character are particularly advantageous properties. Platinum derivatives (predominately cisplatin) are the most proven advantageous agents in the medical field. The success of cisplatin has led the scientific community to focus on the synthesis of other organometallic compounds with improved anti-tumour effects and lower cytotoxicity towards healthy tissues. Close attention is focused on compounds bearing atoms of iron, titanium or ruthenium. **Purpose:** Here, we focus on summarising a description of the most important compounds containing iron, titanium or ruthenium atoms in their structure, showing potential application in cancer treatment including the mechanism of action for some of the most commonly studied compounds. The reported structures were used successfully in preclinical studies including animal models and progressed to various stages of human clinical trials. Despite the failure of some of these compounds, there are still several candidates which are expected to progress to the late stages of the clinical trials either alone or as part of combined chemotherapy. Ruthenium-containing substances in particular show high potential for utilisation in cancer treatment due to low cytotoxicity associated with the ability to block neoangiogenesis and metastasis development.

Key words

cancer – chemotherapy – drugs – organometallic compounds – titanium – ruthenium

Práce byla podpořena projekty GAČR 17-05838S, MŠMT – NPU I – LO1413 a MZ ČR-RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the projects GAČR 17-05838S, 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 recommendation for biomedical papers.



Mgr. Hana Skoupilová

Regionální centrum aplikované

molekulární onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: hana.skoupilova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 10. 7. 2019

Přijato/Accepted: 5. 8. 2019

doi: 10.14735/amko20193525

Úvod

Organokovové sloučeniny jsou obecně definovány jako látky nesoucí ve své molekule vazbu uhlík-kov. Tyto sloučeniny nacházejí široké uplatnění v chemické syntéze, neboť jsou značně reaktivní. Klasickým příkladem jsou tzv. Grignardovy (organohořečnaté) sloučeniny, které se připravují reakcí alkylohalogenidu s hořčíkem v bezvodém éteru a využívají se pro vnášení alkylového zbytku do molekuly například reakcí s karbonylovými sloučeninami. Organokovové sloučeniny jsou látky, které se vyskytují i přirozeně v přírodě, o čemž svědčí například struktura vitamínu B₁₂ obsahující centrální atom kobaltu se čtyřmi atomy dusíku pyrrolových jader vázaných spolu do porfyrinového skeletu. Za správné určení struktury vitamínu B₁₂ byla v roce 1964 udělena Nobelova cena za chemii [1]. Přestože jsou syntetické organokovové sloučeniny obecně považovány za toxické, resp. nekompatibilní s biologickými systémy, jejich možný terapeutický potenciál, především jako protinádorových nebo antimikrobiálních léčiv, dlouhodobě přitahuje zájem organometalických chemiků. Tím spíše, že organokovové sloučeniny vykazují značnou strukturní variabilitu, obvykle jsou bez náboje a poměrně lipofilní. To vše je pak umocněno reálnou potřebou vývoje nových alternativních léčiv, která by v porovnání se stávajícími léky vykazovala vyšší účinnost a minimální nežádoucí účinky. Vybrané strukturní typy organokovových sloučenin, které prokázaly potenciál pro uplatnění v lékařské chemii, jsou znázorněny na obr. 1. V této

práci jsme se zaměřili na bližší charakterizaci sloučenin obsahujících ve své struktuře železo (Fe), titan (Ti) a ruthenium (Ru).

Ferroceny

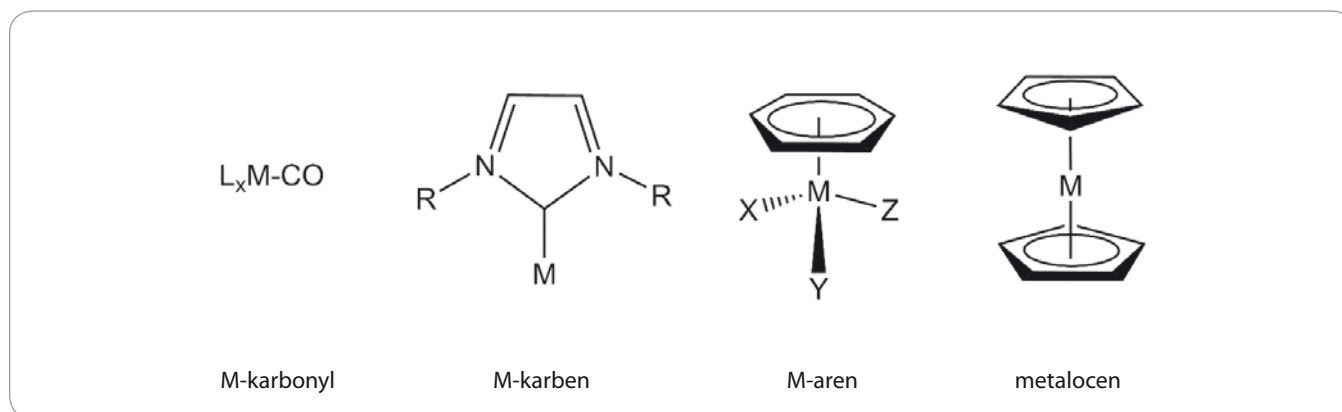
Ferroceny patří mezi tzv. metalloceny, tedy sloučeniny s obecným vzorcem (C₅R₅)₂M, které jsou tvořeny dvěma cyklopentadienylovými kruhy vázanými k atomu kovu, v tomto případě železnatému kationtu Fe²⁺. Bývají poměrně často používány při designu nových léčiv, obvykle jako náhrada za fenylové nebo alkylové skupiny, a to především z důvodu vyšší lipofility v porovnání s benzenem a lepší membránové permeability dané molekuly. Ferroceny navíc patří mezi tzv. „bezpečné molekuly“, jak dokazují testy akutní a chronické cytotoxicity u řady savčích organismů [2]. Mechanismus účinku ferrocenů zřejmě spočívá v uvolnění iontů železa, které přispívají k tvorbě kyslíkových radikálů pomocí tzv. Fentonovy reakce [3]. První a v podstatě doposud jediný derivát ferrocenu schválený v humánní medicíně je ferroceron, který byl podáván při léčbě chudokrevnosti v bývalém Sovětském svazu [4]. Při designu ferrocenů, resp. ferrocen obsahujících sloučenin, se jako nejslibnější zdá být strategie založená na systematickém začleňování ferrocenylové skupiny do struktur kandidátních nebo již známých léčiv, což se pak může významně odrazit na jejich molekulárních vlastnostech. Tento přístup vedl mj. i k objevení ferrocifenu, který se nachází ve fázi preklinického testování jako potenciální protinádorové léčivo, nebo an-

timalarika ferroquinu, který je ve II. fázi klinického testování [5].

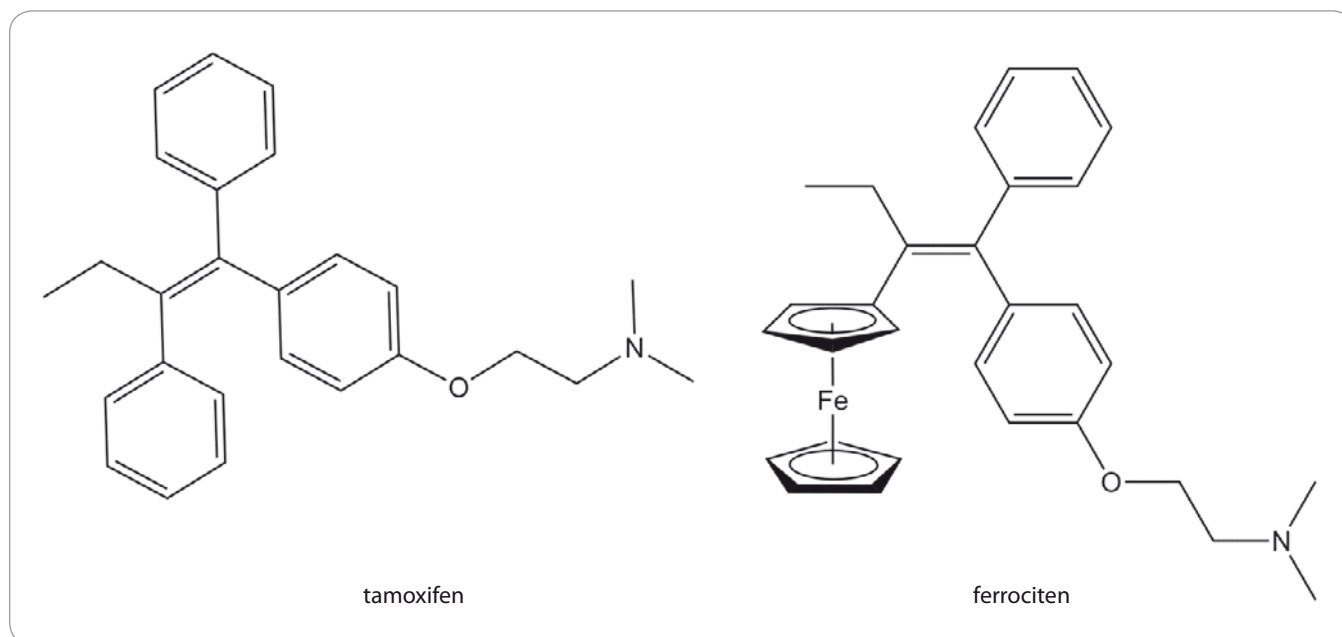
Ferrocifeny

Ferrocifeny představují skupinu sloučenin odvozených od struktury tamoxifenu, u kterého byl nahrazen jeden fenylový kruh ferrocenem (obr. 2). Tamoxifen je důležitým medikamentem především při léčbě karcinomu prsu (99,5% tvoří ženy), ale i dalších malignit, které jsou pozitivní na estrogenové receptory (ER) α. Mechanismus účinku tamoxifenu spočívá v inhibici ER, přičemž se jedná o tzv. selektivní modulátor estrogenového receptoru, což znamená, že se v různých tkáních může chovat rozdílně. Tamoxifen se po podání v lidském těle oxiduje na hydroxytamoxifen, který se váže na ER a soutěží tak o vazebné místo s přirozenými ligandy, jako je například 17β-estradiol. Na rozdíl od přirozených ligandů, které vazbou na ER iniciují translokaci receptoru do jádra, kde působí jako pro-onkogenní transkripční faktor, tamoxifen tuto aktivaci ER inhibuje (pro více informací viz článek Voňka et al [6]).

Ferrocifeny byly připravovány jako organokovové analogy tamoxifenu s cílem uchovat jeho schopnost vázat se na ER a tím jej inhibovat, ale současně zesílit protinádorové účinky díky přítomnosti cytotoxického ferrocenylového zbytku. Tento záměr se skutečně podařil, protože v porovnání s hydroxytamoxifenem mohou ferrocifeny indukovat tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů, což zřejmě představuje hlavní mechanismus cytotoxického účinku [7]. Díky tomu pak ferrocifeny mohou účinně inhibovat



Obr. 1. Strukturní typy organokovových sloučenin s protinádorovým účinkem.



Obr. 2. Strukturální vzorce tamoxifenu a ferrocifenu.

i proliferaci buněk, které nemají funkční ER [8]. Ferrocifeny jsou navíc značně selektivní, neboť vykazují 100–200krát vyšší antiproliferativní aktivitu vůči nádorovým buňkám v porovnání s buňkami nenádorovými [9].

Sloučeniny titanu jako protinádorová léčiva

Oproti sloučeninám obsahujícím železo, které jako protinádorová léčiva prozatím nepřekonalu preklinické testy, jsou sloučeniny s centrálním atomem titanu úspěšnější, neboť postoupily až do klinických studií fáze I a fáze II.

Titanocen dichlorid

Prvním z aktivních titanocenů byl titanocen dichlorid (Cp_2TiCl_2) (obr. 3) syntetizovaný Wilkinsonem a Birminghamem již v roce 1954 [10]. Jednalo se o první neplatínovou sloučeninu vykazující vysokou cytotoxicitu *in vivo* proti implantovaným Ehrlichovým nádorům u myši, přičemž léčebná účinnost přesáhla 80 %, aniž by byla pozorována vysoká toxicita, jako tomu bylo při podání cisplatinu [11]. Právě tyto slibné preklinické výsledky vedly v roce 1993 k zahájení klinických studií fáze I. Závěry prokázaly léčebný efekt u pacientů s adenokarcinomy, nemalobuněčným karcinomy plic i nádory močového měchýře. Po podání však

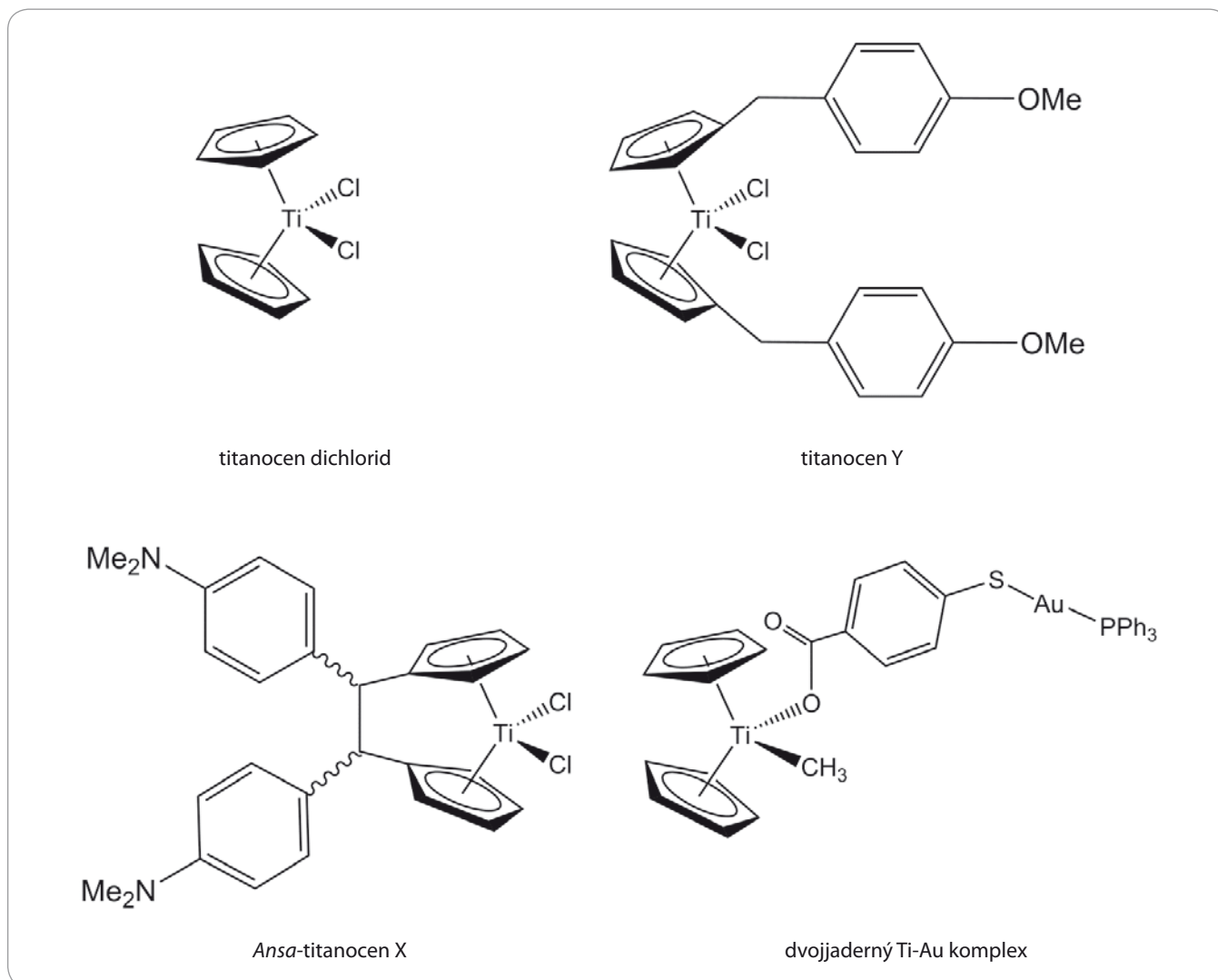
byly pozorovány také nežádoucí vedlejší účinky, zejména gastrointestinální a neurologické problémy a poškození jater a ledvin [12,13]. Několik klinických studií fáze II bylo následně provedeno na pacientech s metastatickým karcinomy ledvin, resp. prsu [14,15]. Částečná regrese byla pozorována pouze u dvou případů s metastatickým karcinomy prsu. U pacientů s nádory ledvin nebyl pozorován žádný ústup onemocnění [14]. Tyto studie tudíž nebyly považovány za úspěšné a další klinické studie Cp_2TiCl_2 byly ukončeny z důvodu primární nefrotoxicity, nízké účinnosti a také kvůli špatné rozpustnosti sloučeniny a její hydrolytické nestabilitě za fyziologických podmínek. Později byl titanocen dichlorid podroben další řadě laboratorních studií, které prokázaly slibnou protinádorovou účinnost *in vitro* v buněčných liniích [16–19] i *in vivo* na zvířecích modelech [20]. Studie však byly prováděny zejména z důvodů identifikace molekulárního mechanismu účinku titanocen dichloridu uvnitř buněk. Ve srovnání s cisplatinou byl potvrzen jako silnější růstový inhibitor [17], který způsobuje zástavu buněčného cyklu v pozdní S fázi až časně G₂ fázi spolu s navozením buněčné smrti nezávislé na buněčném cyklu. Christodoulou et al zjistili, že po ošetření buněk titanocen dichloridem do-

chází v buněčné linii A2780 pocházející z karcinomu vaječníku k akumulaci proteinu p53 [18]. Naopak Kolberg et al v xenograftovém modelu lidského vaječníku žádné výrazné změny v expresi p53 neznamenali [20]. Cp_2TiCl_2 byl dále potvrzen jako inhibitor angiogeneze [19]. Nakonec však ani tato nově zjištěná fakta nevedla k posunu titanocen dichloridu do dalších fází klinického hodnocení, a to především z důvodu nesplnění podmínek pro správnou formu léčiva.

I přes neúspěchy v klinických studiích byla struktura titanocen dichloridu použita jako základní strukturální prvek při syntéze substituovaných titanocenů lépe rozpustných za fyziologických podmínek, přičemž inkorporací elektronegativních substituentů odebírajících elektrony byl posílen charakter titanocenů coby Lewisových kyselin [21]. Další modifikace zahrnovaly například funkcionalizaci cyklopentadienylového kruhu aromatickým zbytkem [22], alkylaminy a cyklickými aminy [23,24] nebo chirálními acyklickými aminy [25].

Titanocen Y

Titanocen Y (TiY) (obr. 3) je jednou ze sloučenin odvozených od titanocen dichloridu [26]. Tato sloučenina ve své struktuře nenese žádná stereocentra, což může být považováno za přínos ze-



Obr. 3. Struktura vybraných titanocenů.

jména při potenciální výrobě léčiva, neboť není nutné separovat jednotlivé stereoisomery. Relativní úspěch cytotoxických testů na prasečích buněčných liniích LLC-PK posunul testování titanocenu Y až do fáze testování na zvířatech [26]. U myších Caki-1 xenograftů byla pozorována signifikantní redukce velikosti nádorů v závislosti na zvyšující se dávce TiY, přičemž nejvyšší tolerovaná dávka 40 mg/kg vykazovala celkově lepší výsledky než porovnávaná dávka 2 mg/kg u cisplatinu [27]. V několika dalších nezávislých studiích na myších xenograftových modelech epidermoidních nádorů nebo nádorů prsu byly tyto slibné výsledky potvrzeny, přičemž nebyly pozorovány žádné, nebo jen velmi malé nežádoucí účinky léčby [28,29].

Titanocen Y zasahuje do vnější signální dráhy navozující buněčnou smrt prostřednictvím exprese proteinu p53 [30], který ovlivňuje vazbu Fas ligandů na receptory CD95, jež eliminují buňky postižené rakovinou nebo napadené virem. Tato vzájemná interakce vede k aktivaci signalizačního komplexu indukujícího smrt a prekursoru kaspázy 8, čímž iniciuje kaskádu reakcí vedoucích až k indukci apoptózy [31]. Weber et al prokázali, že ošetření buněk TiY (IC₅₀ = 4,9 μm) vykazuje asi 4krát vyšší míru inhibice angiogeneze ve srovnání s titanocen dichloridem (IC₅₀ = 19 μm) [19].

Oxali-titanocen Y

V důsledku úspěchu titanocenu Y byla v roce 2008 na základě jeho struktury

připravena sloučenina oxali-titanocen Y, u níž byly atomy chloru nahrazeny oxalátovým aniontem [32]. Tento komplex vykazoval na LLC-PK buňkách 13krát vyšší cytotoxicitu než původní titanocen Y a 2krát vyšší účinnost než cisplatinu [26,32]. Oxali-titanocen Y 16 byl testován *in vitro* na lidských endotelálních buňkách pocházejících z pupčnickové žíly (human umbilical vein endothelial cells – HUVEC) s hodnotami IC₅₀ = 14 μm pro ověření antiangiogenních účinků. Testy pokračovaly na Caki-1 myších xenograftech ošetřených dávkou 30 mg/kg/den 5krát týdně po dobu 3 týdnů. Myši ošetřené pomocí oxali-titanocenu Y vykazovaly statisticky významnou redukci růstu nádoru o 38 % ve srovnání s kontrolní skupi-

nou. Oxali-titanocen Y také inhiboval proliferaci a růst buněk. Expresce proliferčního markeru Ki-67 byla redukována o 30 % [33].

Titanocen T

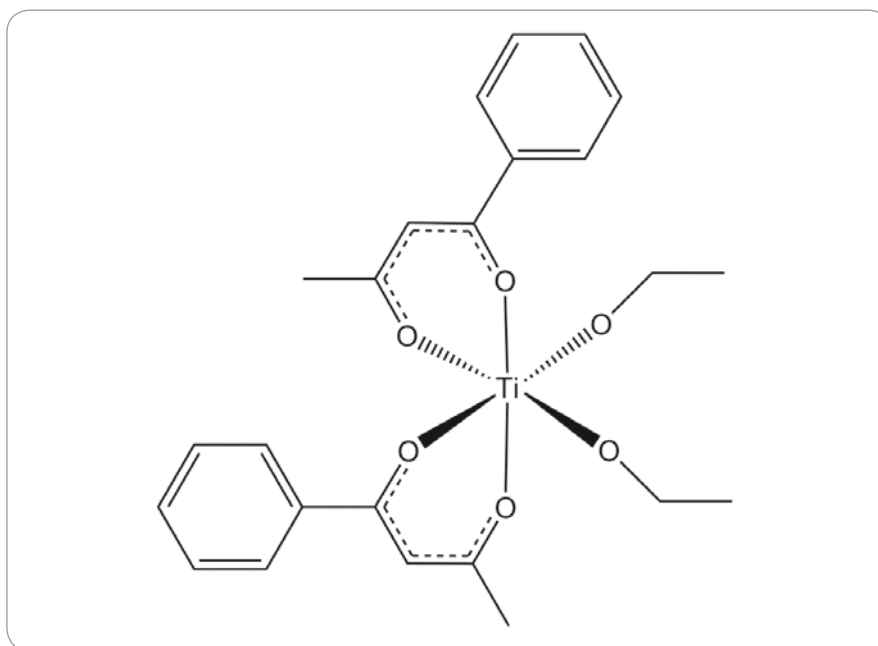
Další z úspěšnějších sloučenin odvozených od titanocen dichloridu je titanocen T syntetizovaný začleněním 1-methyl-3-diethylaminomethyl-indol-4-ylového zbytku jako substituentu methyl-cyklopentadienylového ligandu [34]. Výsledky testování této sloučeniny na lidské renální rakovinné linii Caki-1 prokázaly slibnou cytotoxicitu s IC_{50} kolem $13 \pm 2 \mu\text{m}$ spolu s dobrou rozpustností ve vodných roztocích, která zvyšuje potenciální použití této látky jako léčiva [34]. Testy v myších Caki-1 xenograftových modelech ošetřovaných titanocenem T ukázaly redukci velikosti nádorů o 32–51 % ve srovnání s kontrolní skupinou. Nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky na myších mimo 5% snížení jejich hmotnosti při podání vyšších dávek [35].

Ansa-titanocen X

Ansa-titanocen X (obr. 3) je dalším z relativně úspěšných titanocenů, které se dostaly do fáze testování na zvířatech. V jeho struktuře jsou cyklopentadienylové kruhy spojeny vazbou, která zabraňuje rotaci ligandu a často modifikuje strukturu a reaktivitu kovového centra [22,36]. Testy *in vivo* v BALB/c myších xenograftech s Ehrlichovým ascitickým tumorem ukázaly prodloužení doby přežití myši ošetřené dávkami od 2,5 do 50 mg/kg. Nejvyšší dávka prodlužovala u myši dobu přežití o 50 % [37].

Heterometalické Ti-Au komplexy

Pro zesílení účinku titanocenových sloučenin bylo použito i navázání na komplexy jiných kovů. Takto byla vytvořena bimetalická sloučenina Ti-Au komplexu složená ze stabilního titanocenu, u něhož byl jeden z chloridových ligandů nahrazen methylovou skupinou a druhý karboxylátovým ligandem 4-merkaptobenzoové kyseliny komplexující přes atom síry trifenylofosfanový fragment s jednomocným zlatem (obr. 3) [38]. Tento komplex dokázal blokovat buněčný růst renálních Caki-1 buněk a vykazoval vyšší toxicitu ve srovnání s cisplatinou i titanoc-



Obr. 4. Struktura budotitanu.

cenem Y. V *in vivo* testech na Caki-1 xenograftovém myším modelu vykazovala sloučenina redukci velikosti nádoru přibližně o 67 %. Tato slibná data ukázala, že kombinace různých kovů vykazuje značný chemoterapeutický potenciál [38,39]. Některé další z podobných Ti-Au komplexů byly schopny inhibovat protein kinázy rodiny AKT a MAPKAPK [39] nebo p90-RSK [38]. Aktivní sloučeniny byly také zapojeny do inhibice thioredoxin-reduktázy [38,40].

Budotitan

Odlíšným komplexem titanu, který pokročil až ke klinickým studiím, je budotitan (obr. 4). Preklinické studie budotitanu na potkanech s myšími nebo potkaními transplantabilními nádory tlustého střeva, osteosarkomu, sarkomu nebo leukemie vykazovaly prodloužený čas přežití, redukci velikosti nádorů a pouze mírné vedlejší účinky jako plicní a jaterní toxicita, bez významné kardiální toxicity pozorované u cisplatinu [41,42]. První výsledky klinických studií fáze I ukázaly mírnou hepatotoxicitu, nefrotoxicitu a reverzibilní nechtunství počínající dávkou 9 mg/kg [41]. Výsledky druhé klinické studie fáze I ukázaly minimální akutní toxicitu. Jediným limitujícím faktorem byl vznik srdeční arytmie, která se vyskytla u dvou pacientů při podání dávky 230 mg/m^2 [43].

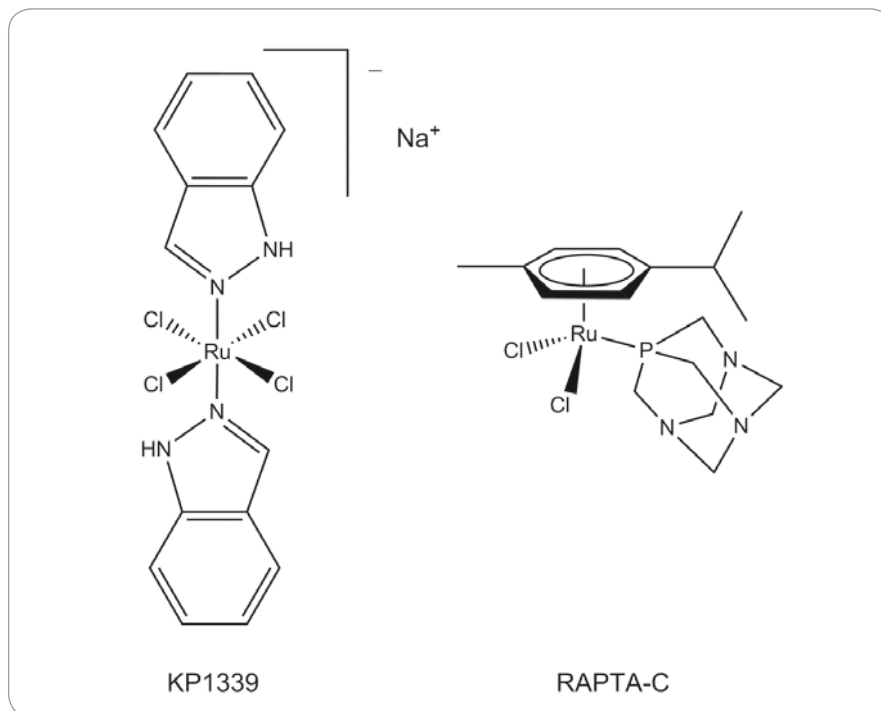
Interakce titanových sloučenin s biomolekulami v buňkách může usnadnit transport, příjem a dodávání titanu do buňky [16,44]. Bylo prokázáno, že titanocen dichlorid může být vázán na transferrin v krevní plazmě, odkud je přenášen pomocí krve do celého těla a za spotřeby ATP až do cytoplazmy buněk [16,45]. Podobně může být lidský sérový albumin dalším z proteinů zodpovědných za přenos titanu do buněk [46–48]. Nicméně i přes nepopiratelné úspěchy uvedených sloučenin v preklinických studiích se mimo titanocen dichlorid a budotitan žádná další sloučenina titanu až do klinického testování nedostala.

Rutheniové komplexy

Přestože jsou komplexy obsahující ruthenium považovány za méně toxické, zachovávají si silnou protinádorovou aktivitu [49]. Myšlenka použití organokovových sloučenin obsahujících ruthenium jako protinádorových látek byla poprvé vyslovena v 90. letech minulého století [50,51]. Od té doby bylo syntetizováno mnoho sloučenin obsahujících ruthenium, které byly testovány jako potenciální protinádorová léčiva [52–58].

NAMI-A

Prvním komplexem ruthenia [Ru (III)] schváleným pro testování v klinic-



Obr. 5. Struktury vybraných rutheniových sloučenin.

kých studiích byl NAMI-A, [ImH][*trans*-RuCl₄(DMSO)(Im)] (imidazol – Im, dimethylsulfoxid – DMSO). Tato sloučenina sice vykazovala nízkou účinnost z hlediska přímé cytotoxicity vůči nádorovým buňkám *in vitro*, ale významně inhibovala růst nádorových metastáz v myších modelech *in vivo* [57,59–63]. V dalších studiích byly potvrzeny i antiangiogenní vlastnosti NAMI-A pomocí testů na endoteliálních buňkách kuřecích chorioallantoických membrán i u modelu rohovky králičího oka [64,65].

Mechanismus účinku NAMI-A zatím není zcela prozkoumán. Za fyziologických podmínek je NAMI-A relativně labilní a podléhá postupné hydrolyze jednoho až dvou chloridů [62]. Existují data, která naznačují schopnosti NAMI-A vázat se na DNA a RNA. Za fyziologických podmínek se může vázat také na zbytky histidinu u sérového albuminu [66,67]. Účinky na buněčné linie *in vitro* se projevily zvýšením buněčných adhezních vlastností a zastavením buněčného cyklu v G₂/M fázi, *in vivo* byla v myších modelech potvrzena i antimetastatická aktivita [59].

V klinické studii fáze I byla u pacientů stanovena maximální tolerovaná dávka na 300 mg/m² na den po dobu 5 dnů

každý 3. týden [68]. Studie fáze I/II však ukázala nízkou terapeutickou účinnost a pouze částečnou odpověď na kombinovanou léčbu NAMI-A s nukleosidovým analogem gemcitabinem u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic [69], což v podstatě vedlo k ukončení dalšího klinického testování NAMI-A.

KP1019

Další z rutheniových komplexů, které prošly až do fáze klinického testování, je sloučenina KP1019 (indazolium [*trans*-tetrachloro-bis-(1H-indazol)ruthenitan]) navržená Seeligem et al [70]. V preklinických testech *in vivo* prokázala významnou antineoplastickou aktivitu vůči chemicky indukovanému kolorektálnímu karcinomu u potkanů [70]. Další studie odhalila, že se v buňkách nevyvíjí nádorová rezistence vůči KP1019 v porovnání s jinými léčivy na bázi kovů a látka zůstává dlouhodobě účinná i v buněčných liniích odvozených od epidermálních nádorů, malobuněčného i nemalobuněčného plicního karcinomu, adenokarcinomu prsu a leukemie [71]. KP1019 vykazuje silnou cytotoxicitu proti primárním nádorům necitlivým k cisplatině, zejména pak proti kolo-

rektálnímu karcinomu [72]. Jeho působením dochází v buňkách k razantním změnám potenciálu mitochondriální membrány a spolu se zvýšenou mírou oxidativního stresu pak k indukci apoptózy [71]. To bylo potvrzeno i v kvassinkovém modelu *Saccharomyces cerevisiae*, kde KP1019 vyvolala poškození DNA, pozastavení buněčného cyklu a následnou buněčnou smrt [73].

Klinické studie fáze I přinesly informaci o neexistujících nebo jen nepatrných vedlejších účincích KP1019 [74,75], avšak z důvodu nízké solubility byly klinické studie pozastaveny a další testování se zaměřilo na její ve vodě více rozpustný analog KP1339.

KP1339 (IT-139)

Sloučenina KP1339 ([*trans*-tetrachloro-bis-(1H-indazol)ruthenitan] sodný) (obr. 5) byla původně připravena jako prekurzor pro syntézu KP1019, a to již v roce 1999 [76]. Stejně jako KP1019 vykazuje silnou afinitu k albuminu a transferinu v krevním řečišti [77]. Studie KP1339 *in vitro* a *in vivo* ukázaly, že zesiluje aktivitu sorafenibu, používaného v 1. linii léčby hepatomu, a dokonce působí i na buněčné modely rezistentní k sorafenibu [78]. V porovnání se sorafenibem tato látka prokázala v xenograftových myších modelech pro nádory jater vyšší účinnost *in vivo* a kombinovaná terapie dokonce 4násobně zvýšila průměrné přežití. Synergická aktivita byla také pozorována u myšího xenograftu VM-1 melanomu nesoucího aktivační mutaci *BRAF* [78].

Klinická studie fáze I byla provedena na pacientech s různými druhy solidních nádorů, přičemž výsledky ukázaly vysokou účinnost KP1339 zejména proti neuroendokrinním nádorům [79]. Další studie byla provedena v roce 2016 s velice podobným výsledkem na pacientech s karcinoidními neuroendokrinními tumory bez signifikantní neurotoxické a hematologické cytotoxicity [80]. Autoři také na základě nezávislých *in vitro* studií [81,82] uvádějí, že mechanismus účinku KP1339 spočívá ve snížení hladiny chaperonového proteinu GRP78, jehož hladina bývá v reakci na stres silně zvýšena u řady nádorů [80]. Funkční studie vedla k závěru, že mechanismus

účinku KP1339 je soustředěn na interakce s cytosolovými proteiny vedoucími k nadprodukcí reaktivních kyslíkových radikálů, oxidačnímu stresu a stresu endoplazmatického retikula, které nakonec prostřednictvím mitochondriální signalizace spouštějí apoptózu [80,83]. Ačkoliv protinádorová aktivita KP1339 není vysoká, její budoucí využití v klinické praxi je reálné především v kombinaci s jinými léčivými pro zvýšení účinnosti a překonání rezistence indukované zvýšenou hladinou GRP78 [80].

RAPTA – funkční organometalické Ru (II) komplexy

Po rozsáhlém studiu sloučenin nesoucích Ru (III) (NAMI-A, KP1019, KP1339) byly testovány i sloučeniny Ru (II), které též prokázaly protinádorovou aktivitu *in vitro*. Slibnými kandidáty této skupiny jsou látky třídy RAPTA [Ru(η^6 -arene)Cl₂(PTA)] (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfatri-cyklo-adamantan), u nichž je η^6 -arene vázán na centrální atom Ru (II). Vzhledem ke svému prostorovému uspořádání jsou tyto sloučeniny označovány jako struktury „pianových stoliček“. Ligandy PTA zvyšují rozpustnost látek ve vodě a η^6 -areny mohou být v molekule substituovány podle potřeby. Dva chloridové ligandy jsou labilní a citlivé na hydrolyzu uvnitř buňky [54].

Jedna z těchto sloučenin, [Ru(η^6 -p-cymene)Cl₂(PTA)] neboli RAPTA-C (obr. 5), prokázala redukci tvorby plicních metastáz u myšího modelu karcinomu prsu s minimálním efektem na velikost primárního nádoru [84,85]. Bylo také zjištěno, že RAPTA-C inhibuje buněčnou proliferaci *in vitro* zastavením dělení buněk v G₂/M fázi buněčného cyklu, které bylo spojeno se zvýšením hladiny p21 a snížením množství cyklinu E. Současně byla indukována mitochondriální apoptotická dráha v neoplastických buňkách díky indukci hladiny proteinu p53 [86].

Analog RAPTA-T [Ru(η^6 -toluen)Cl₂(PTA)] také prokázal účinnost proti invazivním rakovinným buňkám *in vitro* a selektivně inhiboval růst metastáz karcinomu plic *in vivo* represí migrace, invaze a re-adheze metastatických buněk z primárního nádoru [84]. RAPTA-C spolu s RAPTA-T prokázaly slibnou antimeta-

statickou aktivitu i prostřednictvím inhibice angiogeneze, a proto jsou stále aktivně studovanými látkami a kandidáty pro vývoj protinádorové terapie založené na kombinaci cytostatických a angiostatických léčiv [56].

Kombinace rutheniových komplexů s nanomateriály

Také výzkum zaměřený na kombinaci Ru (II) s novými nanomateriály vykazuje poměrně slibné výsledky pro budoucí použití v lékařství. Degradovatelné, polymerické, fruktózou potažené micely obsahující RAPTA-C výrazně zvyšují příjem a internalizaci ruthenia uvnitř buněk ve srovnání s volnou RAPTA-C a inhibují invazivitu ovariálních buněk OVCAR4 *in vitro* [87,88]. Chen et al vyvinuli nanokapsulový 3P-Ru/PbPS systém, který zvyšuje příjem aktivního 3P-Ru z 35 % v roztoku, který měl pH 7,4, na 65 % příjmu aktivního 3P-Ru z roztoku s pH 6,5. To indikuje selektivní a rychlé uvolňování v kyselém prostředí, a tedy zvýšení koncentrace látky v oblasti nádorů a zabránění jejich růstu. Tento systém byl schopen dodávat 3P-Ru do U251 gliomových buněk s vysokou účinností, současně docházelo k inhibici proliferace a navození buněčné smrti apoptózou. V myších modelech nesoucích U251 buňky aplikované pod kůží se po působení 3P-Ru/PbPS během 8 dní významně snížil růst nádorů asi o 5násobek (průměrná velikost nádoru 5 mm³) ve srovnání s myši ošetřenými PBS (25 mm³), PbPS nanočásticemi (26 mm³) a pH necitlivými kapsulemi PEG-Ru (20 mm³) [89].

Poslední novinkou v oblasti potenciální léčby nádorů pomocí sloučenin ruthenia je kombinace s nanomateriály a bimodální fototermiální (photothermal – PTT) a dvoufotonovou fotodynamickou léčbou (two-photon photodynamic therapy – TPPDT). V jednom z výzkumů jsou Ru (II) komplexně funkcionalizované jednovrstvé uhlíkové nanotrubičky (Ru@SWCNTs) vyvinuté jako nano-templáty pro PTT-TPPDT. V testech byly použity uhlíkové nanotrubičky schopné pojmout velké množství ruthenia Ru (II) (Ru@SWCNTs). To je v buňkách uvolňováno fototermiálním účinkem ozáření pomocí 808nm

diodového laseru (0,25 W/cm²). Uvolněné Ru (II) komplexy uvnitř ozářených nádorových buněk produkují kyslíkové radikály a mohou být použity jako dvoufotonové fotodynamické terapeutické činidlo. U myších xenograftů s injektovanými HeLa buňkami ošetřených tímto postupem došlo po aplikaci Ru@SWCNTs s PTT-TPPDT terapií k vymizení nádorů [90]. Dalším vylepšením této PTT léčby je přidání transferinu na syntetizovaný nanomateriál s rutheniem (Tf-RuNPs) pro další zvýšení kumulace látky uvnitř nádorových buněk pomocí endocytózy právě díky obsahu transferinu. U testů *in vivo* na myších xenograftech došlo ke 100% eliminaci nádorů bez pozorování významných toxic- kých vedlejších účinků. To dokázalo, že Tf-RuNPs mohou sloužit jako výborná fototermiální činidla pro léčbu nádorů [91].

Původně se předpokládalo, že vazba sloučenin ruthenia na DNA je základem jejich protinádorového účinku [74,92,93]. Nedávné studie však odhalily, že DNA není primárním cílem a sloučeniny ruthenia jsou ve skutečnosti mnohem silněji vázány na proteiny než na struktury DNA [77,94]. Komplexy ruthenia se mohou silně vázat na transferin a jejich příjem v nádorových buňkách pravděpodobně interferuje s příjmem železa. Nádorové buňky mají zvýšené nároky na příjem železa. Následkem toho je zvýšení koncentrace transferinu. Proto tedy komplexy ruthenia vykazují vyšší účinnost v nádorových buňkách oproti buňkám zdravých tkání [77].

Závěr

Rakovina je jednou z nejčastějších a nejvíce heterogenních nemocí. Z toho důvodu je důležité její léčbu volit tak, aby byla co nejučinnější pro daný typ nádoru. Osvědčeným přístupem při léčbě nádorových onemocnění je kombinované použití více různých typů chemoterapeutických léčiv. Současné možnosti chemoterapie však mají určitá omezení spočívající především v negativních vedlejších účincích a ve vzniku rezistence. Organokovové sloučeniny mohou být možnou alternativou, tudíž jejich vývoji bylo během posledních několika desetiletí věnováno značné úsilí. Zejména

sloučeniny ruthenia díky své potenciální cytotoxicitě a především schopnosti potlačovat neoangiogenezi a blokovat metastazování mají v počátečních klinických studiích vysokou úspěšnost a slibují i možné využití v praxi. Bližší poznatky o jejich mechanismu účinku mohou vést až k integraci multimodálních léčebných strategií založených na využití synergických účinků organokovových sloučenin v kombinaci s dalšími typy protinádorové terapie s cílem zvýšit, resp. optimalizovat efektivitu léčby rakoviny.

Literatura

- Glusker JP. Dorothy Crowfoot Hodgkin (1910–1994). *Protein Sci* 1994; 3(12): 2465–2469. doi: 10.1002/pro.5560031233.
- Leung HW, Hallesy DW, Shott LD et al. Toxicological evaluation of substituted dicyclopentadienyliron (ferrocene) compounds. *Toxicol Lett* 1987; 38(1–2): 103–108.
- Latunde-Dada GO. Ferroptosis: role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2017; 1861(8): 1893–1900. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.05.019.
- Beliakova TA, Leshchev LS. Use of ferrocenon for the treatment of iron deficiency anemia. *Ter Arkh* 1975; 47(6): 115–119.
- Patra M, Gasser G. The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem* 2017; 1: 66. doi: 10.1038/s41570-017-0066.
- Voňka P, Hrstka R. Souhrn aktuálních poznatků o úloze estrogenového receptoru α v nádorové buněčné signalizaci. *Klin Onkol* 2019; 32 (Suppl 3): 3534–3538. doi: 10.14735/amko20193534.
- Acevedo-Morantes CY, Meléndez E, Singh SP et al. Cytotoxicity and reactive oxygen species generated by ferrocenium and ferrocene on MCF7 and MCF10A cell lines. *J Cancer Sci Ther* 2012; 4: 4271–275. doi:10.4172/1948-5956.1000154.
- Vessieres A, Corbet C, Heldt JM et al. A ferrocenyl derivative of hydroxytamoxifen elicits an estrogen receptor-independent mechanism of action in breast cancer cell lines. *J Inorg Biochem* 2010; 104(5): 503–511. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.12.020.
- Michard Q, Jaouen G, Vessieres A et al. Evaluation of cytotoxic properties of organometallic ferrocifens on melanocytes, primary and metastatic melanoma cell lines. *J Inorg Biochem* 2008; 102(11): 1980–1985. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2008.07.014.
- Birmingham JM, Seyferth D, Wilkinson G. A new preparation of bis-cyclopentadienyl-metal compounds. *J Am Chem Soc* 1954; 76(16): 4179. doi: 10.1021/ja01645a038.
- Kopf H, Kopf-Maier P. Titanocene dichloride – the first metallocene with cancerostatic activity. *Angew Chem Int Ed Engl* 1979; 18(6): 477–478. doi: 10.1002/anie.197904771.
- Christodoulou CV, Ferry DR, Fyfe DW et al. Phase I trial of weekly scheduling and pharmacokinetics of titanocene dichloride in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16(8): 2761–2769. doi: 10.1200/JCO.1998.16.8.2761.
- Korfel A, Scheulen ME, Schmoll HJ et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of titanocene dichloride in adults with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 1998; 4(11): 2701–2708.
- Kröger N, Kleeberg UR, Mross K et al. Phase II clinical trial of titanocene dichloride in patients with metastatic breast cancer. *Oncol Res Treat* 2000; 23: 60–62. doi: 10.1159/000027075.
- Lummen G, Sperling H, Luboldt H et al. Phase II trial of titanocene dichloride in advanced renal-cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 42(5): 415–417. doi: 10.1007/s002800050838.
- Guo M, Sun H, McArdle HJ et al. Ti(IV) uptake and release by human serum transferrin and recognition of Ti(IV)-transferrin by cancer cells: understanding the mechanism of action of the anticancer drug titanocene dichloride. *Biochemistry* 2000; 39(33): 10023–10033. doi: 10.1021/bi000798z.
- Harstrick A, Schmoll HJ, Sass G et al. Titanocendichloride activity in cisplatin and doxorubicin-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 1993; 29A(7): 1000–1002. doi: 10.1016/s0959-8049(05)80210-2.
- Christodoulou CV, Eliopoulos AG, Young LS et al. Anti-proliferative activity and mechanism of action of titanocene dichloride. *Br J Cancer* 1998; 77(12): 2088–2097. doi: 10.1038/bjc.1998.352.
- Weber H, Claffey J, Hogan M et al. Analyses of titanocenes in the spheroid-based cellular angiogenesis assay. *Toxicol In Vitro* 2008; 22(2): 531–534. doi: 10.1016/j.tiv.2007.09.014.
- Kolberg HC, Villena-Heinsen C, Deml MM et al. Relationship between chemotherapy with paclitaxel, cisplatin, vinorelbine and titanocene dichloride and expression of proliferation markers and tumour suppressor gene p53 in human ovarian cancer xenografts in nude mice. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26(4): 398–402.
- Boyles JR, Bair MC, Campling BG et al. Enhanced anti-cancer activities of some derivatives of titanocene dichloride. *J Inorg Biochem* 2001; 84(1–2): 159–162.
- Tacke M, Allen LT, Cuffe LP et al. Novel titanocene anti-cancer drugs derived from fulvenes and titanium dichloride. *J Organomet Chem* 2004; 689(13): 2242–2249. doi: 10.1016/j.jorganchem.2004.04.015.
- Allen OR, Croll L, Gott AL et al. Functionalized cyclopentadienyl titanium organometallic compounds as new antitumor drugs. *Organometallics* 2004; 23(2): 288–292. doi: 10.1021/om030403i.
- McGowan MA, McGowan PC. A one-step synthesis of protected functionalised titanocene dichlorides. *Inorg Chem Commun* 2000; 3(7): 337–340.
- Potter GD, Baird MC, Cole SPC. A new series of titanocene dichloride derivatives bearing chiral alkylammonium groups: assessment of their cytotoxic properties. *Inorg Chim Acta* 2010; 364(1): 16–22.
- Sweeney NJ, Mendoza O, Müller-Bunz H et al. Novel benzyl substituted titanocene anti-cancer drugs. *J Organomet Chem* 2005; 690(21–22): 4537–4544. doi: 10.1016/j.jorganchem.2005.06.039.
- Fichtner I, Pampillon C, Sweeney NJ et al. Anti-tumor activity of titanocene Y in xenografted Caki-1 tumors in mice. *Anticancer Drugs* 2006; 17(3): 333–336.
- Bannon JH, Fichtner I, O'Neill A et al. Substituted titanocenes induce caspase-dependent apoptosis in human epidermoid carcinoma cells in vitro and exhibit antitumor activity in vivo. *Br J Cancer* 2007; 97(9): 1234–1241. doi: 10.1038/sj.bjc.6604021.
- Beckhove P, Oberschmidt O, Hanauske AR et al. Antitumor activity of titanocene Y against freshly explanted human breast tumor cells and in xenografted MCF-7 tumors in mice. *Anticancer Drugs* 2007; 18(3): 311–315. doi: 10.1097/CAD.0b013e328010a6f7.
- Kater L, Claffey J, Hogan M et al. The role of the intrinsic FAS pathway in titanocene Y apoptosis: the mechanism of overcoming multiple drug resistance in malignant leukemia cells. *Toxicol In Vitro* 2012; 26(1): 119–124. doi: 10.1016/j.tiv.2011.09.010.
- Juo P, Woo MS, Kuo CJ et al. FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ* 1999; 10(12): 797–804.
- Claffey J, Hogan M, Muller-Bunz H et al. Oxali-titanocene Y: a potent anticancer drug. *Chem Med Chem* 2008; 3(5): 729–731. doi: 10.1002/cmdc.200700302.
- Fichtner I, Behrens D, Claffey J et al. Antitumor activity of oxali-titanocene Y in xenografted CAKI-1 tumors in mice. *Letters in Drug Design & Discovery* 2008; 5(8): 489–493. doi: 10.2174/157018008786898545.
- Deally A, Hackenberg F, Lally G et al. Synthesis and biological evaluation of achiral indole-substituted titanocene dichloride derivatives. *Int J Med Chem* 2012; 2012: 905981. doi: 10.1155/2012/905981.
- Walther W, Fichtner I, Deally A et al. The activity of titanocene T against xenografted Caki-1 tumors. *Letters in Drug Design & Discovery* 2013; 10(5): 375–381. doi: 10.2174/1570180811310050002.
- Tacke M, Cuffe LP, Gallagher WM et al. Methoxy-phenyl substituted ansa-titanocenes as potential anti-cancer drugs derived from fulvenes and titanium dichloride. *J Inorg Biochem* 2004; 98(12): 1987–1994. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2004.09.001.
- Valadares MC, Ramos AL, Rehmann FJ et al. Antitumor activity of [1,2-di(cyclopentadienyl)-1,2-di(p-N,N-dimethylaminophenyl)-ethanediyl] titanium dichloride in xenografted Ehrlich's ascites tumour. *Eur J Pharmacol* 2006; 534(1–3): 264–270. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.01.056.
- Fernandez-Gallardo J, Elie BT, Sadhukha T et al. Heterometallic titanium-gold complexes inhibit renal cancer cells in vitro and in vivo. *Chem Sci* 2015; 6(9): 5269–5283. doi: 10.1039/C5SC01753J.
- Fernandez-Gallardo J, Elie BT, Sulzmaier FJ et al. Organometallic titanocene-gold compounds as potential chemotherapeutics in renal cancer. Study of their protein kinase inhibitory properties. *Organometallics* 2014; 33(22): 6669–6681. doi: 10.1021/om500965k.
- Mui YF, Fernandez-Gallardo J, Elie BT et al. Titanocene-gold complexes containing N-heterocyclic carbene ligands inhibit growth of prostate, renal, and colon cancers in vitro. *Organometallics* 2016; 35(9): 1218–1227. doi: 10.1021/acs.organomet.6b00051.
- Keppler BK, Heim ME, Flechtner H et al. Assessment of the preclinical activity of budotitane in three different transplantable tumor systems, its lack of mutagenicity, and first results of clinical phase I studies. *Arzneimittelforschung* 1989; 39(6): 706–709.
- Keppler BK, Schmahl D. Preclinical evaluation of dichlorobis(1-phenylbutane-1,3-dionato)titanium (IV) and budotitane. Two representatives of the new class of antitumor-active bis-beta-diketonato metal complexes. *Arzneimittelforschung* 1986; 36(12): 1822–1828.
- Schilling T, Keppler KB, Heim ME et al. Clinical phase I and pharmacokinetic trial of the new titanium complex budotitane. *Invest New Drugs* 1996; 13(4): 327–332.
- Qian ZM, Li H, Sun H et al. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 2002; 54(4): 561–587.
- Aarabi MH, Mirhashemi SM, Ani M et al. Comparative binding studies of titanium and iron to human serum transferrin. *Asian J Biochem* 2011; 6(2): 191–199. doi: 10.3923/ajb.2011.191.199.
- Lally G, Deally A, Hackenberg F et al. Titanocene Y – transport and targeting of an anticancer drug candidate. *Letters in Drug Design & Discovery* 2013; 10(8): 675–682. doi: 10.2174/15701808113100890027.
- Pavlaki M, Debili K, Triantaphyllidou IE et al. A proposed mechanism for the inhibitory effect of the anticancer agent titanocene dichloride on tumour gelatinases and other proteolytic enzymes. *J Biol Inorg Chem* 2009; 14(6): 947–957. doi: 10.1007/s00775-009-0507-7.
- Tinoco AD, Eames EV, Valentine AM. Reconsideration of serum Ti(IV) transport: albumin and transferrin trafficking of Ti(IV) and its complexes. *J Am Chem Soc* 2008; 130(7): 2262–2270. doi: 10.1021/ja076364+.
- Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N. Organometallic anticancer compounds. *J Med Chem* 2011; 54(1): 3–25. doi: 10.1021/jm100020w.

50. Berger MR, Garzon FT, Keppler BK et al. Efficacy of new ruthenium complexes against chemically induced autochthonous colorectal carcinoma in rats. *Anticancer Res* 1989; 9(3): 761–765.
51. Dale LD, Tocher JH, Dyson TM et al. Studies on DNA damage and induction of SOS repair by novel multifunctional bioreducible compounds. II. A metronidazole adduct of a ruthenium-arene compound. *Anticancer Drug Des* 1992; 7(1): 3–14.
52. Canovic P, Simovic AR, Radisavljevic S et al. Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity. *J Biol Inorg Chem* 2017; 22(7): 1007–1028. doi: 10.1007/s00775-017-1479-7.
53. Castonguay A, Doucet C, Juhas M et al. New ruthenium(II)-letrozole complexes as anticancer therapeutics. *J Med Chem* 2012; 55(20): 8799–8806. doi: 10.1021/jm301103y.
54. Gossens C, Tavernelli I, Rothlisberger U. Structural and energetic properties of organometallic ruthenium(II) diamine anticancer compounds and their interaction with nucleobases. *J Chem Theory Comput* 2007; 3(3): 1212–1222. doi: 10.1021/ct6003577.
55. Chelopo MP, Pawar SA, Sokhela MK et al. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. *Eur J Med Chem* 2013; 66407–66414. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.05.048.
56. Nowak-Sliwinska P, van Beijnum JR, Casini A et al. Organometallic ruthenium(II) arene compounds with antiangiogenic activity. *J Med Chem* 2011; 54(11): 3895–3902. doi: 10.1021/jm2002074.
57. Sava G, Clerici K, Capozzi I et al. Reduction of lung metastasis by ImH[trans-RuCl4(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors. *Anticancer Drugs* 1999; 10(1): 129–138.
58. Weiss A, Berndsen RH, Dubois M et al. In vivo anti-tumor activity of the organometallic ruthenium(II)-arene complex [Ru(h6-p-cymene)Cl2(pta)] (RAPTA-C) in human ovarian and colorectal carcinomas. *Chem Sci* 2014; 12(5): 4742–4748.
59. Bergamo A, Zorzet S, Gava B et al. Effects of NAMI-A and some related ruthenium complexes on cell viability after short exposure of tumor cells. *Anticancer Drugs* 2000; 11(8): 665–672.
60. Debidda M, Sanna B, Cossu A et al. NAMI-A inhibits the PMA-induced ODC gene expression in ECV304 cells: involvement of PKC/Raf/Mek/ERK signalling pathway. *Int J Oncol* 2003; 23(2): 477–482.
61. Sava G, Capozzi I, Clerici K et al. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16(4): 371–379.
62. Sava G, Bergamo A, Zorzet S et al. Influence of chemical stability on the activity of the antimetastatic ruthenium compound NAMI-A. *Eur J Cancer* 2002; 38(3): 427–435. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00389-6.
63. Sava G, Zorzet S, Turrin C et al. Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. *Clin Cancer Res* 2003; 9(5): 1898–1905.
64. Vacca A, Bruno M, Boccarelli A et al. Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A. *Br J Cancer* 2002; 86(6): 993–998. doi: 10.1038/sj.bjc.6600176.
65. Morbidelli L, Donnini S, Filippi S et al. Antiangiogenic properties of selected ruthenium(III) complexes that are nitric oxide scavengers. *Br J Cancer* 2003; 88(9): 1484–1491. doi: 10.1038/sj.bjc.6600906.
66. Pacor S, Zorzet S, Cocchiello M et al. Intratumoral NAMI-A treatment triggers metastasis reduction, which correlates to CD44 regulation and tumor infiltrating lymphocyte recruitment. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310(2): 737–744. doi: 10.1124/jpet.104.066175.
67. Bacac M, Hotze AC, van der Schilden K et al. The hydrolysis of the anti-cancer ruthenium complex NAMI-A affects its DNA binding and antimetastatic activity: an NMR evaluation. *J Inorg Biochem* 2004; 98(2): 402–412.
68. Rademaker-Lakhai JM, van den Bongard D, Plum D et al. A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. *Clin Cancer Res* 2004; 10(11): 3717–3727. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0746.
69. Leijen S, Burgers SA, Baas P et al. Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Invest New Drugs* 2015; 33(1): 201–214. doi: 10.1007/s10637-014-0179-1.
70. Seelig MH, Berger MR, Keppler BK. Antineoplastic activity of three ruthenium derivatives against chemically induced colorectal carcinoma in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 118(3): 195–200.
71. Heffeter P, Pongratz M, Steiner E et al. Intrinsic and acquired forms of resistance against the anticancer ruthenium compound KP1019 [indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate (III)] (FFC14A)]. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312(1): 281–289. doi: 10.1124/jpet.104.073395.
72. Hartinger CG, Jakupec MA, Zorbas-Seifried S et al. KP1019, a new redox-active anticancer agent – preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem Biodivers* 2008; 5(10): 2140–2155. doi: 10.1002/cbdv.200890195.
73. Stevens SK, Strehle AP, Miller RL et al. The anticancer ruthenium complex KP1019 induces DNA damage, leading to cell cycle delay and cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol* 2013; 83(1): 225–234. doi: 10.1124/mol.112.079657.
74. Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupec MA et al. From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J Inorg Biochem* 2006; 100(5–6): 891–904. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2006.02.013.
75. Lentz F, Drescher A, Lindauer A et al. Pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study. *Anticancer Drugs* 2009; 20(2): 97–103. doi: 10.1097/CAD.0b013e-328322fbc5.
76. Peti W, Pieper T, Sommer M et al. Synthesis of tumor-inhibiting complex salts containing the anion trans-tetrachlorobis(indazole)ruthenate(III) and crystal structure of the tetraphenylphosphonium salt. *Eur J Inorg Chem* 1999; 1999(9): 1551–1555.
77. Kratz F, Hartmann M, Keppler B et al. The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin. *J Biol Chem* 1994; 269(4): 2581–2588.
78. Heffeter P, Atil B, Kryeziu K et al. The ruthenium compound KP1339 potentiates the anticancer activity of sorafenib in vitro and in vivo. *Eur J Cancer* 2013; 49(15): 3366–3375. doi: 10.1016/j.ejca.2013.05.018.
79. Dickson NR, Jones SF, Burris HA et al. A phase I dose-escalation study of NKP-1339 in patients with advanced solid tumors refractory to treatment. *J Clin Oncol* 2011; 29 (Suppl): abstr. 2607.
80. Burris HA, Bakewell S, Bendell JC et al. Safety and activity of IT-139, a ruthenium-based compound, in patients with advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, dose-escalation phase I study with expansion cohort. *ESMO Open* 2016; 1(6): e000154. doi: 10.1136/esmoopen-2016-000154.
81. Lizardo MM, Morrow JJ, Miller TE et al. Upregulation of glucose-regulated protein 78 in metastatic cancer cells is necessary for lung metastasis progression. *Neoplasia* 2016; 18(11): 699–710. doi: 10.1016/j.neo.2016.09.001.
82. Gifford JB, Huang W, Zeleniak AE et al. Expression of GRP78, master regulator of the unfolded protein response, increases chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2016; 15(5): 1043–1052. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0774.
83. Flocke LS, Trondl R, Jakupec MA et al. Molecular mode of action of NKP-1339 – a clinically investigated ruthenium-based drug – involves ER- and ROS-related effects in colon carcinoma cell lines. *Invest New Drugs* 2016; 34(3): 261–268. doi: 10.1007/s10637-016-0337-8.
84. Bergamo A, Masi A, Dyson PJ et al. Modulation of the metastatic progression of breast cancer with an organometallic ruthenium compound. *Int J Oncol* 2008; 33(6): 1281–1289.
85. Scolaro C, Bergamo A, Brescacin L et al. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. *J Med Chem* 2005; 48(12): 4161–4171. doi: 10.1021/jm050015d.
86. Chatterjee S, Kundu S, Bhattacharyya A et al. The ruthenium(II)-arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53-JNK pathways. *J Biol Inorg Chem* 2008; 13(7): 1149–1155. doi: 10.1007/s00775-008-0400-9.
87. Lu H, Blunden BM, Scarano W et al. Anti-metastatic effects of RAPTA-C conjugated polymeric micelles on two-dimensional (2D) breast tumor cells and three-dimensional (3D) multicellular tumor spheroids. *Acta Biomater* 2016; 3268–3276. doi: 10.1016/j.actbio.2015.12.020.
88. Lu M, Henry CE, Lai H et al. A new 3D organotypic model of ovarian cancer to help evaluate the antimetastatic activity of RAPTA-C conjugated micelles. *Biomater Sci* 2019; 7(4): 1652–1660. doi: 10.1039/c8bm01326h.
89. Chen L, Fu C, Deng Y et al. A pH-sensitive nanocarrier for tumor targeting: delivery of ruthenium complex for tumor theranostic by pH-sensitive nanocapsule. *Pharm Res* 2016; 33(12): 2989–2998. doi: 10.1007/s11095-016-2021-2.
90. Zhang P, Huang H, Huang J et al. Noncovalent ruthenium(II) complexes-single-walled carbon nanotube composites for bimodal photothermal and photodynamic therapy with near-infrared irradiation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015; 7(41): 23278–23290. doi: 10.1021/acami.5b07510.
91. Zhao S, Zhu X, Cao C et al. Transferrin modified ruthenium nanoparticles with good biocompatibility for photothermal tumor therapy. *J Colloid Interface Sci* 2018; 511325–511334. doi: 10.1016/j.jcis.2017.10.023.
92. Wang F, Chen H, Parsons S et al. Kinetics of aquation and anation of ruthenium(II) arene anticancer complexes, acidity and X-ray structures of aqua adducts. *Chemistry* 2003; 9(23): 5810–5820. doi: 10.1002/chem.200304724.
93. Yan YK, Melchart M, Habtemariam A et al. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chem Commun (Camb)* 2005(38): 4764–4776. doi: 10.1039/b508531b.
94. Scolaro C, Chaplin AB, Hartinger CG et al. Tuning the hydrophobicity of ruthenium(II)-arene (RAPTA) drugs to modify uptake, biomolecular interactions and efficacy. *Dalton Trans* 2007(43): 5065–5072. doi: 10.1039/b705449a.

Souhrn aktuálních poznatků o úloze estrogenového receptoru α v nádorové buněčné signalizaci

Overview of Current Findings about the Role of Oestrogen Receptor α in Cancer Cell Signalling Pathways

Voňka P., Hrstka R.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Estrogenový receptor α je klíčovým biomarkerem karcinomu prsu, neboť jeho přítomnost či absence v nádorových buňkách se významně promítá do prognózy onemocnění i způsobu léčby. K aktivaci estrogenového receptoru α dochází po navázání ligandu, obvykle estradiolu. Poté jsou receptory translokovány do jádra, kde spouštějí transkripci cílových genů. Tento proces se označuje jako genomický mechanismus účinku. Estrogenový receptor α však přenáší signál i nengenomicky, a to především v cytoplasmě. Díky svému významnému zapojení v buněčné signalizaci představuje i důležitý cíl protinádorové léčby. **Cíl:** Přestože byl estrogenový receptor α objeven už před 60 lety, jeho signální dráhy jsou natolik komplikované, že řada z nich není dodnes zcela popsána. Vzhledem k rozsahu signalizace, do které je estrogenový receptor α zapojen, si tento přehledový článek neklade za cíl pokrýt celou její šíři, ale zaměřuje se především na nové aspekty týkající se jeho funkce, které se v této oblasti aktuálně objevují.

Klíčová slova

signální transdukce – karcinom prsu – estrogenové receptory

Summary

Background: Oestrogen receptor α is a key biomarker for breast cancer, and the presence or absence of oestrogen receptor α in breast cancer influences the treatment regimens and patients' prognosis. Oestrogen receptors α are activated after ligand binding, then translocate into the nucleus and activate the transcription of specific genes. This process is called the genomic effect of oestrogen receptor α . Oestrogen receptor α also has nongenomic effects that are exerted mainly in cytoplasm. Due to the important involvement of oestrogen receptor α in cell signalling, these receptors represent a key target for anticancer therapy. **Purpose:** Although oestrogen receptor α was discovered 60 years ago, the corresponding signalling pathways have not yet been fully described due to their complexity. With respect to the considerable extent of oestrogen receptor α signalling, covering all related information is beyond the scope of this review, which is focused mainly on recently discovered aspects of oestrogen receptor α function.

Key words

signal transduction – breast neoplasms – oestrogen receptors

Tato práce byla podpořena projektem MŠMT-NPU I-LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805), Strukturálními fondy Evropské unie – Projekt ENOCH (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868) a Grantovou agenturou České republiky (GAČR 19-01383S a GAČR 19-02014S).

This work was supported by the project MEYS-NPS I-LO1413, by MH CR – DRO (MMCI, 00209805), by the European Regional Development Fund – Project ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/000868) and by the Czech Science Foundation (19-01383S, 19-02014S).

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 recommendation for biomedical papers.



doc. Mgr. Roman Hrstka, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: hrstka@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 14. 6. 2019
Přijato/Accepted: 6. 8. 2019

doi: 10.14735/amko20193534

Úvod

Každý rok je na světě diagnostikováno zhruba 1,67 milionu nových případů rakoviny u žen [1]. Karcinom prsu je u žen nejběžnějším typem rakoviny, přičemž představuje asi 25 % případů. To znamená, že zhruba každých 20 s uslyší nějaká žena tuto diagnózu.

Přestože se o karcinomu prsu obecně mluví jako o jednom onemocnění, lze jej rozdělit do více než jednadvaceti histologických subtypů a nejméně do čtyř molekulárních subtypů, které se navzájem liší svými rizikovými faktory, odpovědí na léčbu a pravděpodobností vyléčení [1]. Molekulární subtypy se rozlišují na základě přítomnosti molekulárních markerů, mezi které patří míra exprese hormonálních (estrogenového – ER a progesteronového – PR) receptorů (HR+/HR–), hladina receptoru 2 pro lidský epidermální růstový faktor (human epidermal growth factor receptor 2 – HER2 (HER2+/HER2–)) a míra exprese proteinu Ki-67. Mezi čtyři hlavní molekulární subtypy karcinomu prsu patří luminal A (HR+/HER2–, nízká exprese Ki-67; zhruba 70 % případů), který roste pomaleji a je méně agresivní než ostatní subtypy, triple-negative/basal-like breast cancer (HR–/HER2–; 15–20 % případů), u kterého je nejmenší naděje na přežití pacientek (nedochází totiž ke zvý-

šené expresi ani jednoho z výše uvedených biologických markerů, což v tomto případě výrazně omezuje možnost použití konvenční chemoterapie), luminal B (HR+/HER2±, zvýšená exprese Ki-67; 10–20 % případů), HER2-enriched (HR–/HER2+; 10–15 % případů) a normal-like (HR+/HER2–; nízká exprese Ki-67; vzácný), který je podobný podtypu luminal A.

U zhruba 75 % nově diagnostikovaných případů je v nádorových buňkách detekována zvýšená exprese ER, resp. PR [1]. V mnoha případech je tedy nejprve nasazena endokrinní terapie, při které jsou ženě podávány antihormonální látky, velmi často např. tamoxifen (TAM), které inhibují signalizaci prostřednictvím estrogenového receptoru α (ER α). Buňky karcinomu prsu však často vytvoří vůči této léčbě rezistenci, což způsobí další rozvoj onemocnění.

Na počátku signální dráhy aktivujících receptory je obvykle malá organická lipofilní molekula zvaná hormon, která se váže na příslušný receptor, jenž pak přenáší signál dále. Klasicky se tyto receptory dělí do dvou skupin [2]. První z nich tvoří proteiny, které jsou vázány v membráně. Jejich nejznámějším příkladem jsou receptory spřažené s G proteinem, kam se řadí i GPER receptor, jehož přirozeným aktivátorem je 17 β -estradiol (E2).

Druhým typem receptorů jsou intracelulární proteiny, které vystupují jako transkripční faktory. Je pro ně typické, že po navázání ligandu vstupují do jádra a regulují transkripci cílových genů. Jejich typickým příkladem je ER α .

Genomický vs. negenomický mechanismus účinku ER α

E2 se po vstupu do cytoplazmy váže na v tuto chvíli neaktivní ER α , které jsou v komplexu s proteiny teplotního šoku (heat shock proteins – HSP). Vazbou ligandu (E2) HSP od receptorů disociují [3], monomery ER α jsou pak fosforylovány, podléhají konformačním změnám a dimerizují. Disociace HSP rovněž obnaží nukleární lokalizační signál, který receptorům umožní přemístit se z cytozolu do jádra. Zde ve formě dimerů nasedají na specifické úseky DNA, které se označují jako estrogen responsive elements (ERE), čímž aktivují transkripci cílových genů. ER α tedy z funkčního hlediska vystupuje jako transkripční faktor. Tento proces se označuje jako genomický mechanismus účinku estrogenu (schéma 1) a vyžaduje řádově minuty až hodiny, než je dokončen a v buňce jsou syntetizovány příslušné proteiny.

Oproti tomu byly u steroidních hormonů, např. estrogenů, androgenů či kortikosteroidů, pozorovány i rychlé mechanismy přenosu signálu v cytozolu, které se označují jako negenomické (schéma 1). Ty se uskutečňují v řádech sekund až několika minut. Nejdůležitější skutečnost, která oba mechanismy odlišuje a promítá se i do praxe, je možnost potlačit genomické účinky ER α pomocí inhibitorů RNA polymeráz, mezi které patří např. cykloheximid nebo aktinomycin D [4].

Genomický mechanismus působení ER α

Genomický mechanismus účinku ER α zahrnuje jak interakce aktivovaného ER α přímo s ERE místy cílových genů (klasický genomický mechanismus), tak vazbu aktivovaného ER α na DNA prostřednictvím jiného transkripčního faktoru [5]. Tento typ zprostředkování estrogenového signálu se nazývá neklasický genomický mechanismus. Mezi nejvýznamnější příklady patří proteinové interakce ER/Sp

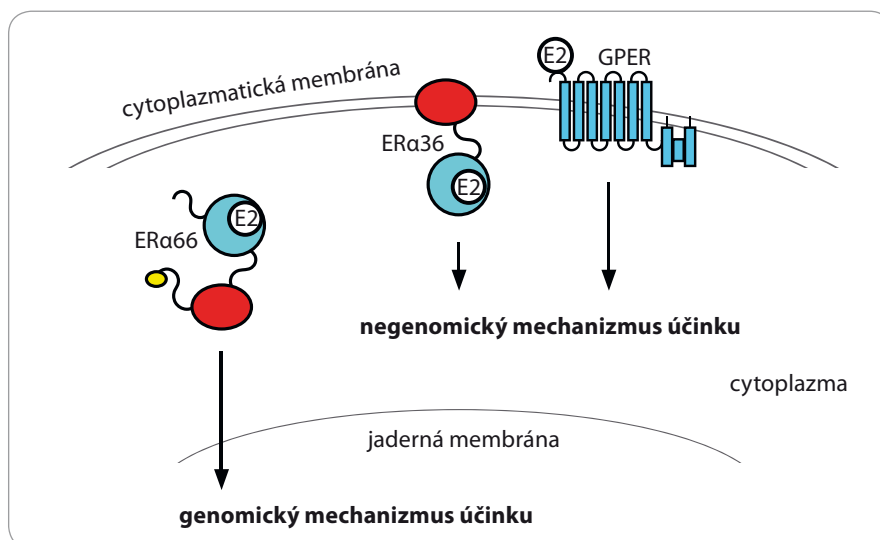


Schéma 1. Genomický a negenomický mechanismus účinku estrogenu. Na počátku genomického mechanismu účinku je vznik komplexu ER α 66 s E2, který je následován konformačními změnami ER α 66 a jeho translokací do jádra. Za negenomický mechanismus estrogenu jsou zodpovědné především ER α 36 a GPER, které aktivují celou řadu kináz.

ER – estrogenový receptor, E2 – 17 β -estradiol, GPER – G protein-coupled estrogen receptor

(estrogen receptor/specifity protein) a ER/AP-1 (estrogen receptor/activating protein-1).

Proteiny z AP-1 rodiny [6] obecně vystupují jako regulační proteiny, které jsou zapojené ve velkém množství biologických procesů, např. exprese genů, buněčná proliferace, diferenciace buněk a tumorigeneze. Tato proteinová rodina zahrnuje proteiny Jun, Fos, ATF (activating transcription factor) a MAF (macrophage-activating factor). Předěšlá analýza ER α cistronu (tj. analýza umístění ERE míst v genomu) ukázala, že obsahuje velké množství AP-1 vazebných motivů, což by naznačovalo vzájemné propojení signálních drah ER α a AP-1 na úrovni chromatinu. Překryv ERE s vazebnými místy pro c-Jun však nebyl dlouho znám, nicméně nedávná analýza ukázala, že přítomnost E2 a TAM, které regulují aktivitu ER α , usnadňuje nejen jeho vazbu na DNA, ale i vazbu c-Jun na chromatin [7]. Dále byla potvrzena interakce mezi c-Jun a ER α u buněk karcinomu prsu. Závěry této studie rovněž naznačují, že zvýšení exprese c-Jun může být jedním z mechanismů, který podporuje růst nádorových buněk a rezistenci k endokrinní léčbě. Byla identifikována skupina 19 genů, jejichž exprese je přímo ovlivňována prostřednictvím c-Jun signalizace a které se mohou podílet na mechanismu vzniku rezistence k TAM. Jako příklad je možné uvést protein AGR2 (anterior gradient protein 2), u kterého byla prokázána zvýšená exprese v nádorových buňkách a který je spojován s rezistencí k TAM [8,9].

Gen *TGFBI* (transforming growth factor, beta-induced) byl identifikován jako nejvíce regulovaný prostřednictvím vzájemného propojení signalizace ER a c-Jun [7] u ER α pozitivních buněk karcinomu prsu. Současně zvýšená exprese transkripčních faktorů c-Jun a c-Fos vede rovněž ke zvýšení exprese TGFBI. Autoři článku také ukázali, že snížení hladiny TGFBI vede ke zvýšení citlivosti k TAM u buněk, které jsou vůči němu rezistentní. Detailně však mechanismus popsán není.

Negenomické mechanismy působení ER α

V obecné rovině pro receptory platí, že jejich varianty, které jsou spojeny s mem-



Schéma 2. Izoformy ER α . Jednotlivé izoformy ER α se vzájemně liší počtem domén, ze kterých se skládají. Kompletní estrogenový receptor ER α 66 jich má 5. Mezi jeho známé izoformy patří ER α 46 a ER α 36. Ve srovnání s ER α 66 postrádá ER α 46 na svém N-konci doménu A/B. U ER α 36 chybí kromě toho ještě na C-konci doména F a část domény E, která váže ligand. Místo toho zde má 27 unikátních aminokyselin.

ER α – estrogenový receptor α

bránami, přenášejí obvykle tzv. negenomický signál. U ER α , který se někdy též označuje jako ER α 66, protože jeho celková velikost je 66 kDa, se jedná především o izoformy ER α 46 a ER α 36 (schéma 2). První izoforma postrádá na N-konci A/B doménu. Ta druhá kromě toho neobsahuje ani F-doménu na C-konci a část domény E [10]. Intracelulární umístění těchto izoform je potom důležité pro jejich konkrétní funkci [11]. Mezi negenomické mechanismy, kterými se přenáší estrogenový signál, patří např. fosforylace ER α 66 prostřednictvím kináz, která aktivuje receptor nezávisle na přítomnosti ligandu [12,13].

ER α 36 byl původně identifikován jako receptor, který zprostředkovává negenomické efekty estradiolu, a to především aktivaci signálních drah PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) a MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracelulární-signal-regulated kinase) [14–16]. Tyto dráhy přenášejí v cytozolu především intracelulární signál pro regulaci buněčného cyklu a proliferaci buňky. ER α 36 se rovněž podílí na řízení transportu intracelulárního Ca²⁺ [17–19]. Aktivace ER α 36 přispívá k proliferaci a zvyšuje invazivitu buněk karcinomu prsu [20–22]. Zvýšená hladina ER α 36 je také spojována s poklesem účinnosti léčby TAM u pacientek s karcinomem prsu s expresí ER α 66 [23]. ER α 36 a jeho negenomické aktivity tedy mohou být zapojeny do rezistence buněk karcinomu prsu k TAM, který by v tomto případě vystupoval jako agonista ER α 36 [24].

Je známo, že pacientky s vysokou expresí ER α 36 u ER α 66-pozitivního kar-

cinomu prsu nemají dobrou prognózu onemocnění [23]. Exprese ER α 36 může být využita pro rozdělení pacientek do skupin, které budou, či nebudou mít prospěch z léčby TAM. TAM totiž může aktivovat ER α 36, čímž podporuje buněčnou proliferaci a rozvoj metastáz [25]. U klinických vzorků rovněž odpovídá exprese ER α 36 hladinám ALDH1A1 (aldehyde dehydrogenase 1A1). Její exprese je tedy zřejmě regulována prostřednictvím ER α 36, který je aktivovaný vazbou TAM do vazebného místa receptoru. Tato zjištění tedy podporují teorii, že ER α 36 zprostředkovává rezistenci k TAM a přispívá ke vzniku metastáz u karcinomu prsu. K potlačení těchto efektů TAM autoři navrhuje terapii inhibitory ALDH1 nebo protilátkami specifickými proti ER α 36. Nedávná studie rovněž ukazuje, že exprese ER α 36 nemusí být pouze prognostickým biomarkerem karcinomu prsu, ale ER α 36 se v budoucnu může stát i potenciálním terapeutickým cílem [25].

Mitochondrie jako další z cílů ER α a jeho ligandů v buňce

Mitochondrie je kromě jádra jediná organela v buňce, která obsahuje vlastní DNA. Ta kóduje především proteiny, které jsou součástí elektronového transportního řetězce (electron transport chain – ETC) [26,27]. Bylo prokázáno, že ER α může také vstupovat do mitochondrií a plnit zde roli transkripčního faktoru [2,28]. Nicméně v současné literatuře není tak často s mitochondriemi spojován samotný ER α jako spíše jeho inhibitor TAM.

TAM je antiestrogen nesteroidní povahy, který vykazuje genomický (inhibice ER α) i negenomický mechanismus

účinku. Negenomický mechanismus však není často zmiňován, protože je v rámci buňky navozen až po vysycení ER α , které jsou jeho primárním cílem [29]. TAM a E2 mohou ovlivňovat i funkci ETC. Oba se vážou do místa pro flavin mononukleotid v komplexu I, čímž dochází k přerušení transportu elektronů a změně v potenciálu mitochondriální membrány. Tento efekt vykazuje i samotný TAM, ale je výraznější, pokud je v buňce přítomen i E2. Negenomické působení obou sloučenin je nezávislé na interakci s ER α . TAM rovněž ovlivňuje funkčnost komplexu III z ETC [30] a je toxicitější pro buňky se zvýšenou respirací za současného použití inhibitorů ETC [31].

Již dříve se podařilo prokázat, že kombinace fotodynamické terapie s hypericinem (hypericin photodynamic therapy – HYP-PDT) cílí na mitochondriální ETC. Nově bylo zjištěno, že synergický efekt vykazuje kombinace HYP-PDT a hormonoterapie TAM [32], která se souhrně označuje jako HYPERTAM. Ta byla experimentálně úspěšně vyzkoušena na buněčné linii MDA-MB-231, která je triple-negativní, i na buněčné linii MCF-7, která je ER α -pozitivní. U obou buněčných linií byla pozorována zvýšená peroxidace lipidů a cytotoxicita vedoucí k nekroze a autofagii. Tento experimentální postup byl posléze úspěšně použit i u NOD-scid IL2 γ^{null} imunodeficientních myši (myš s cílenou mutací v genu pro γ řetězec IL2 receptoru (IL2 γ^{null})). Z tohoto důvodu autoři studie předpokládají, že by se HYPERTAM mohl stát základem úspěšné léčebné metody pro rozdílné typy nádorů bez ohledu na status hormonálních receptorů.

Ve fázi klinických testů se rovněž nachází látka zvaná MitoTam [33]. Jejím základem je TAM, na který je přes krátký uhlovodíkový řetězec připojena trifenylofosfoniová skupina, jež směřuje molekulu do mitochondrie. MitoTam, stejně jako TAM, se váže na komplexy ETC. Na rozdíl od TAM [34] u něj však bylo prokázáno, že zabíjí nádorové buňky bez indukce buněčné senescence jak *in vitro*, tak *in vivo* [35]. Buněčná senescence je forma zastavení buněčného cyklu, čímž dochází k omezení buněčné proliferace. Imunitní buňky však nejsou schopny se-

nescentní buňky odstranit z organismu, což může vést k poškození tkáně a rozvoji karcinomu.

Závěr

Karcinom prsu je onemocnění, v jehož rozvoji hraje ER α nezastupitelnou roli. ER α v buňce zprostředkovává estrogenový signál, který může mít jak genomický, tak negenomický účinek. Negenomický mechanismus je zprostředkován především jeho izoformami ER α 46 a ER α 36. Nedávné výzkumy ukazují, že jeho izoforma ER α 36 by se v budoucnu mohla stát novým terapeutickým cílem. Rovněž neustává vývoj léčiv a léčebných postupů, které cílí na ER α . Jedním z příkladů je HYPERTAM, který už byl úspěšně aplikován v preklinických testech.

Literatura

- Feng Y, Spezia M, Huang S et al. Breast cancer development and progression: risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis* 2018; 5(2): 77–106. doi: 10.1016/j.gendis.2018.05.001.
- Hardeland R. Mitochondrial hormone receptors – an emerging field of signaling in the cell's powerhouse. *Bio-med J Sci Tech Res* 2017; 1(6): 1678–1681. doi: 10.26717/BJSTR.2017.01.000511.
- Wakeling AE. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7(1): 17–28.
- Girgert R, Emons G, Grundker C. Estrogen signaling in ER α -negative breast cancer: ER β and GPER. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9: 781. doi: 10.3389/fendo.2018.00781.
- Safe S, Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 2008; 41(5): 263–275. doi: 10.1677/JME-08-0103.
- Shaulian E. AP-1 – the Jun proteins: oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal* 2010; 22(6): 894–899. doi: 10.1016/j.celsig.2009.12.008.
- He H, Sinha I, Fan R et al. c-Jun/AP-1 overexpression reprograms ER α signaling related to tamoxifen response in ER α -positive breast cancer. *Oncogene* 2018; 37(19): 2586–2600. doi: 10.1038/s41388-018-0165-8.
- Hrstka R, Brychtova V, Fabian P et al. AGR2 predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Dis Markers* 2013; 35(4): 207–212. doi: 10.1155/2013/761537.
- Wright TM, Wardell SE, Jasper JS et al. Delineation of a FOXA1/ER α /AGR2 regulatory loop that is dysregulated in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Mol Cancer Res* 2014; 12(12): 1829–1839. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0195.
- Yasar P, Ayaz G, User SD et al. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol* 2017; 16(1): 4–20. doi: 10.1002/rmb2.12006.
- Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(8): 597–608. doi: 10.1038/nrc3093.
- Zhou W, Slingerland JM. Links between oestrogen receptor activation and proteolysis: relevance to hormone-regulated cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(1): 26–38.

- Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(9): 631–643. doi: 10.1038/nrc2713.
- Lin SL, Yan LY, Liang XW et al. A novel variant of ER α , ER α -36 mediates testosterone-stimulated ERK and Akt activation in endometrial cancer Hec1A cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 102. doi: 10.1186/1477-7827-7-102.
- Tong JS, Zhang QH, Wang ZB et al. ER α -36, a novel variant of ER α , mediates estrogen-stimulated proliferation of endometrial carcinoma cells via the PKCdelta/ERK pathway. *PLoS One* 2010; 5(11): e15408. doi: 10.1371/journal.pone.0015408.
- Zhang X, Ding L, Kang L et al. Estrogen receptor- α 36 mediates mitogenic antiestrogen signaling in ER-negative breast cancer cells. *PLoS One* 2012; 7(1): e30174. doi: 10.1371/journal.pone.0030174.
- Kang L, Zhang X, Xie Y et al. Involvement of estrogen receptor variant ER- α 36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol Endocrinol* 2010; 24(4): 709–721. doi: 10.1210/me.2009-0317.
- Zhang XT, Ding L, Kang LG et al. Involvement of ER- α 36, Src, EGFR and STAT5 in the biphasic estrogen signaling of ER-negative breast cancer cells. *Oncol Rep* 2012; 27(6): 2057–2065. doi: 10.3892/or.2012.1722.
- Zhang XT, Kang LG, Ding L et al. A positive feedback loop of ER- α 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* 2011; 30(7): 770–780. doi: 10.1038/ncr.2010.458.
- Acconcia F, Kumar R. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Lett* 2006; 238(1): 1–14. doi: 10.1016/j.canlet.2005.06.018.
- Chaudhri RA, Olivares-Navarrete R, Cuenca N et al. Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor- α 36 (ER α 36). *J Biol Chem* 2012; 287(10): 7169–7181. doi: 10.1074/jbc.M111.292946.
- Kang L, Wang ZY. Breast cancer cell growth inhibition by phenethyl isothiocyanate is associated with down-regulation of oestrogen receptor- α 36. *J Cell Mol Med* 2010; 14(6B): 1485–1493. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00877.x.
- Shi L, Dong B, Li Z et al. Expression of ER α 36, a novel variant of estrogen receptor α , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(21): 3423–3429. doi: 10.1200/JCO.2008.17.2254.
- Zhang X, Wang ZY. Estrogen receptor- α variant, ER- α 36, is involved in tamoxifen resistance and estrogen hypersensitivity. *Endocrinology* 2013; 154(6): 1990–1998. doi: 10.1210/en.2013-1116.
- Wang Q, Jiang J, Ying G et al. Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ER α 36(+) breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. *Cell Res* 2018; 28(3): 336–358. doi: 10.1038/cr.2018.15.
- Chen JQ, Yager JD, Russo J. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1746(1): 1–17. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.08.001.
- Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 2006; 97(4): 673–683. doi: 10.1002/jcb.20743.
- Lone MU, Baghel KS, Kanchan RK et al. Physical interaction of estrogen receptor with MnSOD: implication in mitochondrial O $_2$ (-) upregulation and mTORC2 potentiation in estrogen-responsive breast cancer cells. *Oncogene* 2017; 36(13): 1829–1839. doi: 10.1038/ncr.2016.346.
- Moreira PI, Custodio J, Moreno A et al. Tamoxifen and estradiol interact with the flavin mononucleotide site of complex I leading to mitochondrial failure. *J Biol Chem* 2006; 281(15): 10143–10152. doi: 10.1074/jbc.M510249200.
- Theodossiou TA, Yannakopoulou K, Aggelidou C et al. Tamoxifen subcellular localization; observation of cell-specific cytotoxicity enhancement by inhibition

of mitochondrial ETC complexes I and III. *Photochem Photobiol* 2012; 88(4): 1016–1022. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01144.x.

31. Theodossiou TA, Walchli S, Olsen CE et al. Deciphering the nongenomic, mitochondrial toxicity of tamoxifens as determined by cell metabolism and redox activity. *ACS Chem Biol* 2016; 11(1): 251–262. doi: 10.1021/acscchembio.5b00734.
32. Theodossiou TA, Ali M, Grigalavicius M et al. Simultaneous defeat of MCF7 and MDA-MB-231 resistances by a hypericin PDT-tamoxifen hybrid therapy. *NPJ Breast Cancer* 2019; 5: 13. doi: 10.1038/s41523-019-0108-8.
33. Rohlenova K, Sachaphibulkij K, Stursa J et al. Selective disruption of respiratory supercomplexes as a new strategy to suppress Her2high breast cancer. *Antioxid Redox Signal* 2017; 26(2): 84–103. doi: 10.1089/ars.2016.6677.
34. Mumcuoglu M, Bagislar S, Yuzugullu H et al. The ability to generate senescent progeny as a mechanism underlying breast cancer cell heterogeneity. *PLoS One* 2010; 5(6): e11288. doi: 10.1371/journal.pone.0011288.
35. Hubackova S, Davidova E, Rohlenova K et al. Selective elimination of senescent cells by mitochondrial targeting is regulated by ANT2. *Cell Death Differ* 2019; 26(2): 276–290. doi: 10.1038/s41418-018-0118-3.

Glykoproteiny v sérech onkologických pacientů

Glycoproteins in the Sera of Oncological Patients

Hernychová L., Uhrík L., Nenutil R., Novotný M. V.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Glykosylace je posttranslační modifikace, která je zapojena do mnoha biologických procesů a významně zasahuje i do dějů spojených s nádorovou progresí. Změny glykanových struktur na povrchu nádorových buněk způsobené alterujícími hladinami exprese glykosyltransferáz a glykosidáz ovlivňují proliferaci, adhezi, migraci i buněčnou signalizaci. Přítomnost neobvyklých glykanových struktur a glykokonjugátů v sérech byla popsána u mnohých onkologických onemocnění a řada glykoproteinů byla schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA jako nádorové biomarkery pro klinická vyšetření. V současnosti se pozornost při hledání nových glykomarkerů zaměřuje na detekci proteinů s aberantní glykosylací nebo zvýšenou koncentrací v sérech nebo exozomech, a to z důvodu jejich aktivní sekrece nebo uvolňování z nádorových buněk do extracelulárního prostoru. **Cíl:** Cílem článku bylo popsat strukturu glykanů, glykoproteinů i glykokonjugátů a přiblížit jejich funkci ve vývoji a progresi nádorů. Dalším cílem bylo čtenáře seznámit s vybranými klinicky schválenými glykoproteiny využívanými k diagnostice onkologických onemocnění (AFP, PSA, CA 125, HE4). Pozornost byla zaměřena na změny v glykanové struktuře uvedených proteinů, jejich funkce, koncentrace v sérech a jejich využití v klinice a diagnostice onkologických onemocnění.

Klíčová slova

glykoproteiny – sérum – biomarkery – nádor

Summary

Background: Glycosylation is a posttranslational modification that is involved in many biological processes and significantly affects the processes associated with tumour progression. Changes in glycan structures on the surface of tumour cells caused by altering levels of glycosyltransferase and glycosidase expression affect proliferation, adhesion, migration and cellular signalling. The presence of aberrant glycan structures and glycoconjugates in the sera of oncological patients has been reported in many cancers. Consequently, many glycoproteins have been approved by the U.S. Food and Drug Administration as tumour biomarkers for clinical investigations. At present, attention is focused on the search for new glycomarkers that are decorated by aberrant glycosylation or are overexpressed in the serum or exosomes due to their active secretion or release from tumour cells to the extracellular space. **Purpose:** The aim of this article has been to review the structure of glycans, glycoproteins and other glycoconjugates and to give more details about their functions in the development and progression of tumours. Another aim was to familiarise the reader with selected clinically approved glycoproteins used to diagnose oncological diseases (AFP, PSA, CA 125, HE4). Attention was paid to changes in the glycan structure of these proteins, their function, serum concentrations and clinical use in the diagnostics of cancer.

Key words

glycoproteins – serum – biomarkers – cancer

Práce byla podpořena projekty MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a GAČR 16-04496S.

This work was supported by the projects MEYS – NPS I – LO1413, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and Czech Science Foundation 16-04496S.

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 recommendation for biomedical papers.



prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: lenka.hernychova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 17. 6. 2019

Přijato/Accepted: 19. 8. 2019

doi: 10.14735/amko20193539

Struktura a funkce glykanů ve vývoji a progresi nádorů

Glykany jsou sacharidové jednotky (oligosacharidy a polysacharidy) vyskytující se volně nebo kovalentně vázané na biomolekuly (protein či lipid, nazývané pak glykokonjugáty). Glykanová složka může ovlivnit funkci glykokonjugátů přímo, a to bezprostřední účastí na interakcích s ostatními biomolekulami, nebo nepřímo zapojením do mechanismů kontrolujících konformaci, stabilitu a životnost proteinu [1–3]. Přehled glykanů a glykokonjugátů zapojených do nádorové progresie je uveden na obr. 1.

Funkce N-glykoproteinů závisí na počtu a složení glykanových částí navázaných na polypeptidový řetězec a na větvení glykanové části, přičemž abnormální struktury ovlivňují vývoj a progresi nádorů (obr. 2). Bylo publikováno mnoho prací zabývajících se N-glykanovým profilováním séra, tkání, ascitových tekutin nebo moče pacientů s nádorovým onemocněním. Výsledky upozornily na komplexní nebo naopak na velmi jednoduché (paucinoma-

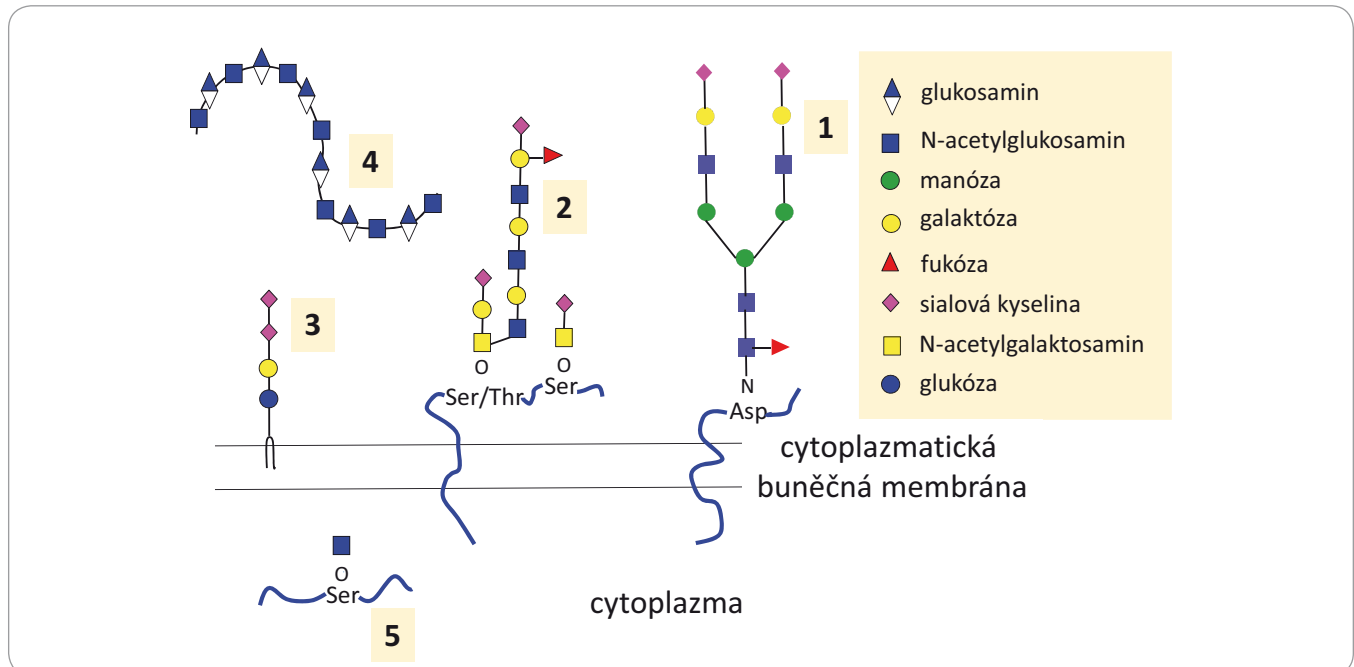
nózní) [4] glykanové struktury, typické pro dané onemocnění či molekulární podskupinu nádoru, jejichž výskyt koreloval s odpovědí na léčbu [5–9]. Mezi O-glykoproteiny patří muciny, které se vyskytují ve větším množství na povrchu nádorových buněk a podílejí se na adhezi buněk podobně jako proteoglykany. Ty se dále účastní aktivace růstových faktorů. Výskyt glykosfingolipidů zase koreluje s růstem nádorů. Glykokonjugáty a glykany se kromě povrchu buněk vyskytují také intracelulárně anebo naopak extracelulárně jako sekretované molekuly, které jsou součástí extracelulární matrice. Odlišně lokalizované glykany plní různé funkce, např. ovlivňují buněčnou signalizaci, účastní se zánětlivých procesů, deregulují buněčný cyklus, podporují proliferaci, migraci nebo se aktivně účastní mezibuněčných interakcí [1,10,11]. Jsou tedy důležitou součástí mnoha biologických procesů, a proto je řada z nich považována za biomarkery [12].

Některé typy glykanů vyskytující se na povrchu nádorových buněk mohou za-

sahovat i do procesů spojených s nádorovou progresí (obr. 2). Přítomnost glykoproteinů společně s dalšími látkami (proteiny, lipidy, enzymy atd.) byla také zaznamenána v exozomech (extracelulárních váčcích nesoucích transferinový receptor) produkovaných ve větším množství nádorovými buňkami než buňkami normálními [13]. Exozomy zajišťují výměnu informací a látek mezi buňkami, mohou modifikovat lokální i vzdálené mikroprostředí, ovlivňují vývoj metastáz i vývoj imunitní odpovědi. Látky přítomné v exozomech jsou velmi lákavým cílem pro využití v diagnostice, prognostice i léčbě onkologických onemocnění [13,14], např. u karcinomu slinivky břišní [15] nebo u epitelálního karcinomu vaječníků [16].

Diagnostický potenciál glykosyltransferáz

Glykosyltransferázy jsou enzymy zajišťující přenos a vazbu monosacharidu na glykan prostřednictvím různých typů glykosidických vazeb



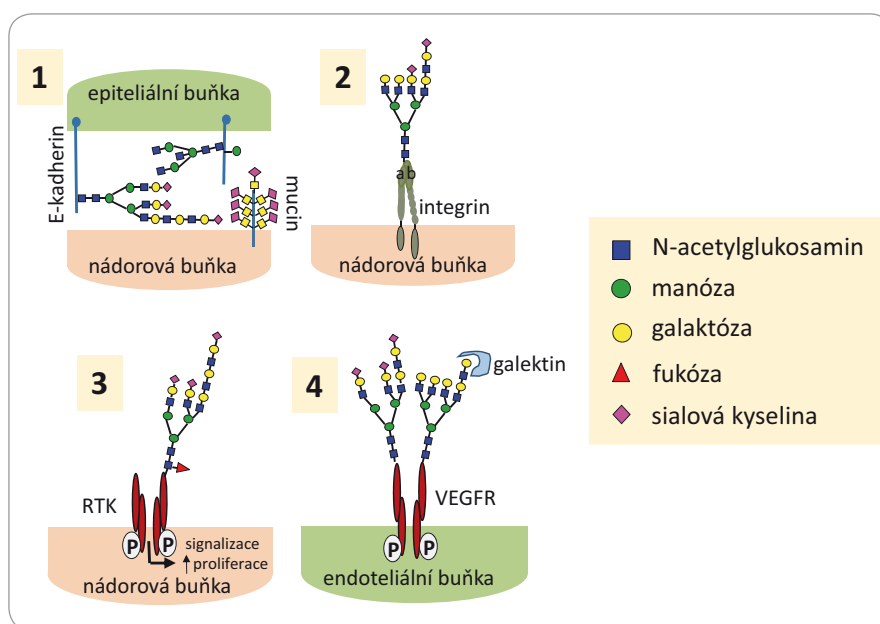
Obr. 1. Struktury glykanů a glykokonjugátů zapojených do nádorové progresie.

1) N-glykoproteiny nesou kovalentně navázané glykanové struktury prostřednictvím glykosidické vazby na Asp; 2) O-glykoproteiny nesou glykany kovalentně navázané prostřednictvím hydroxylové skupiny Ser nebo Thr, v glykanovém řetězci jsou přítomny N-acetylgalaktosaminy, další jednotky sacharidů, fukóza a sialových kyselin; 3) glykosfingolipidy obsahují lipidový ceramid s navázaným jedním nebo více sacharidy; 4) hyaluronany se vyskytují jako volné řetězce glukosaminoglykanů nebo mohou být kovalentně navázané na proteoglykany; 5) proteiny s navázaným N-acetylglukosaminem prostřednictvím O-vazby se vyskytují v cytoplasmě nebo jádře buňky. Převzato a upraveno z [1].

Asp – asparagin, Ser – serin, Thr – treonin

(např. galaktoglykosyltransferáza přenáší galaktózu). Glykosidázy naopak tyto vazby štěpí. U onkologických onemocnění byly zaznamenány snížené i zvýšené koncentrace přirozeně se vyskytujících sacharidů nebo byly detekovány sacharidy nové. Tyto změny jsou způsobeny právě změněnými hladinami glykosyltransferáz v Golgiho aparátu nádorových buněk [17] a vedou k modifikacím glykanových částí N- a O-glykoproteinů. Jednu z nejčastějších změn představuje netypické větvení N-glykanů i nárůst velikosti glykanové části způsobené zvýšenou produkcí sialyltransferáz, které připojují terminální molekuly sialových kyselin, nebo fukosyltransferáz způsobujících fukosylaci glykanů v jejich různých částech (obr. 3A) [18]. Sialové kyseliny mohou být přítomny ve vazbě alfa (2,3) nebo alfa (2,6), a tím vytvořit dva izomery, které mají naprosto rozdílnou biologickou aktivitu [19]. Tyto jevy obecně korelují s vývojem nádoru, pokročilým stadiem rakoviny a metastazováním. Objevují se však také u chronických zánětů, které s výskytem nádoru souvisejí [8]. Profilování genové exprese 210 glykosyltransferáz v 1 893 vzorcích pacientů se šesti typy karcinomů (prsu, vaječníků, glioblastomu, ledvin, plic a tlustého střeva) bylo použito k vývoji klasifikace karcinomů i jejich rozdělení do podskupin. Aplikací biostatistických metod na kvantitativní hodnoty exprese genů kódujících glykosyltransferázy bylo možné identifikovat jednotlivé typy karcinomů a provést jejich subtypovou klasifikaci [12].

K progresi nádoru přispívají též glykosyltransferázy, které jsou zodpovědné za změny struktury N-glykanů, a tím i jejich funkce (obr. 3B) [20]. Jedná se o β 1,4-N-acetylglukosaminyl transferázu (GnT-III), β 1,6-N-acetylglukosaminyl transferázu (GnT-V) a α 1,6-fukosyl transferázu (FUT8). GnT-III dává vznik bisektinové vazbě, při níž se objevuje třetí větev v terminální části glykanu. Tato struktura zabraňuje dalšímu procesu glykosylace, protože ztrácí vlastnosti substrátu pro další glykosyltransferázy. GnT-III je považována za enzym nezbytný v biosyntetické dráze N-glykanů, který inhibuje metastazování [21]. Naopak GnT-V je zodpovědná za vznik rozvětvených glykanových



Obr. 2. Funkce glykanů ve vývoji a progresi nádorů.

1) Změna glykanového profilu na E-kadherinu na povrchu nádorových buněk poškozuje buněčnou adhezi a podněcuje invazi nádorových buněk; 2) sialylace rozvětvených glykanů na integreích zvyšuje migraci a invazivitu nádorových buněk; 3) změna glykosylace RTK na povrchu nádorových buněk moduluje jejich signalizaci a proliferaci; 4) změna glykosylace VEGFR na povrchu nádorové buňky je asociována s nádorovou angiogenezí. Převzato a upraveno z [10].

RTK – tyrozin kinázové růstové receptory, VEGFR – receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru

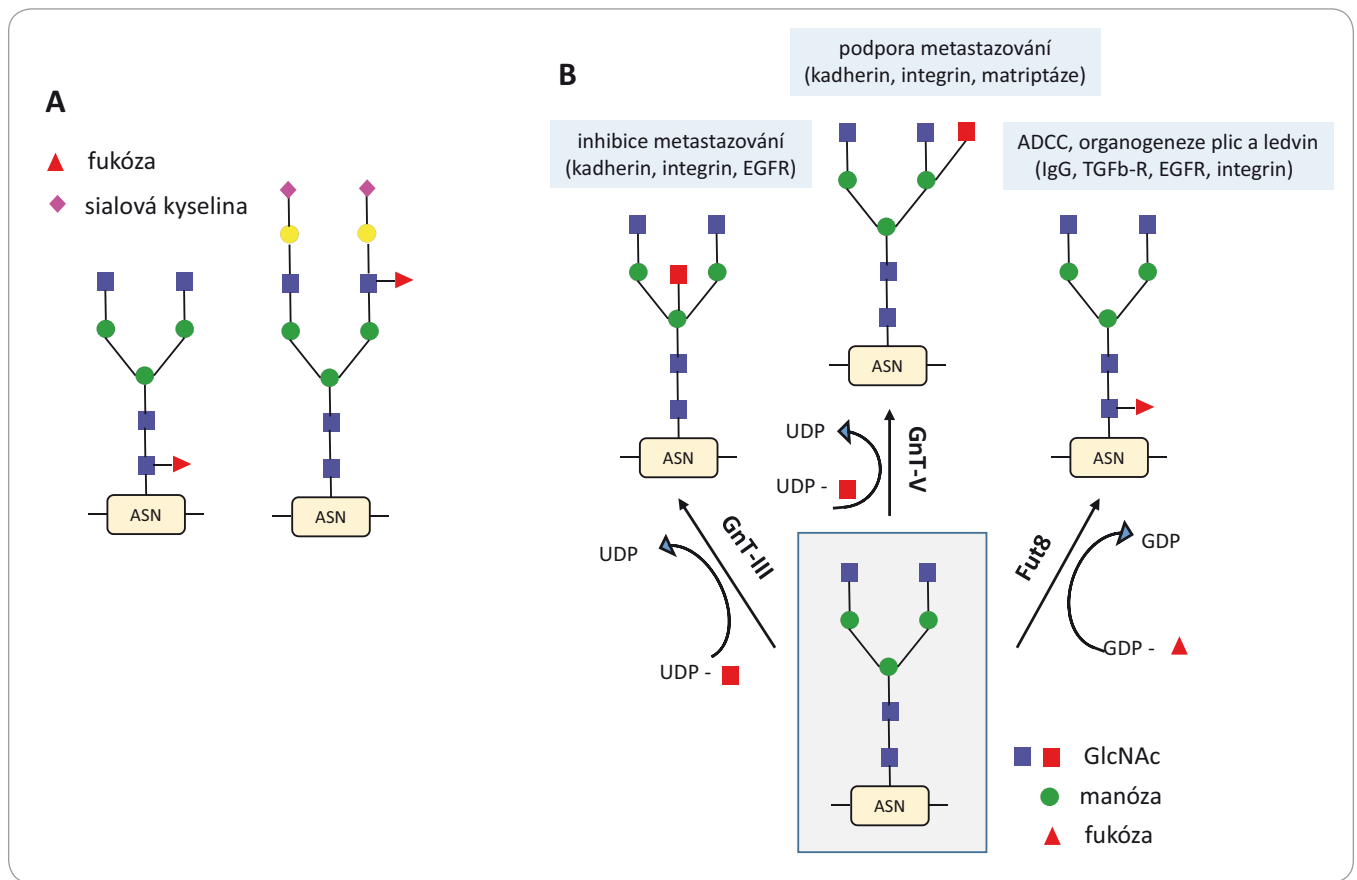
struktur a její zvýšená exprese se projevuje sníženou buněčnou adhezí a zvýšenou invazivitou buněk metastazujících karcinomů tlustého střeva, mozku a prsu [21–24]. Glykany nesoucí β 1,6-N-acetylglukosamin jsou považovány za biomarkery progresu karcinomu tlustého střeva a prsu. FUT8 zajišťuje transfer fukózy na první N-acetylglukosamin (GlcNAc) u glykosidické vazby na asparagin (popisovaná jako fukosylace na jádře glykanu). Zvýšená exprese FUT8 přímo koreluje s velikostí nádoru [25] a naopak odstranění fukosylace na jádře glykanu přítomného v molekule IgG1 zvyšuje až 100krát buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách [26].

Klinicky schválené biomarkery

Glykoproteiny a glykany jsou specifickými biomarkery onkologických onemocnění. Lze je nalézt v tkáních, séru, exozomech, moči nebo jiných tělních tekutinách, nejčastěji se však setkáváme s detekcí glykoproteinů nebo glykanů přítomných v sérech. Přehled vybra-

ných glykoproteinů přítomných v sérech schválených Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA a používaných jako nádorové biomarkery je uveden v tab. 1.

Biomarkery detekovatelné v sérech jsou sloučeniny jinak přítomné v nádorech nebo jimi produkované a uvolněné do krevního řečiště, které slouží k odlišení patologických změn organismu od fyziologických. I když je v současnosti známo mnoho nádorových biomarkerů, vzhledem k vysoké heterogenitě a širokému spektru nádorů zatím neexistuje univerzální marker, který by byl schopen jasně určit dané onkologické onemocnění, jeho prognózu nebo předpovědět úspěšnost léčby. Fyziologické koncentrace nádorových markerů se mohou vyskytnout i u maligních onemocnění, a proto je mnoho vědeckých pracovišť zaměřeno na výzkum úlohy glykosylace v nádorové patogenezi a pochopení dějů při vývoji a progresi nádorů. Zde uvádíme popis vybraných biomarkerů, další jsou popsány v dokumentu Valíka et al [27].



Obr. 3. Aberantní větvení N-glykanů a nárůst velikosti glykanové části.

A) Glykanové struktury s připojenou fukózou v různých částech glykanu (v jádře a na anténě) a připojení terminálních sialových kyselin na anténách.

B) Glykosylace je katalyzována glykosyltransferázami, které ovlivňují biologické funkce glykokonjugátů. Převzato a upraveno z [20].

ASN – aminokyselina asparagin, EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru, ADCC – buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách, IgG – imunoglobulin G, TGFβ-R – transformující růstový faktor β, UDP – glukuronosyltransferáza, GDP – guanosin difosfát, GlcNAc – N-acetylglukosamin, Gnt-III – β1,4-N-acetylglukosaminyl transferáza, Gnt-V – β1,6-N-acetylglukosaminyl transferáza

Tab. 1. Glykoproteiny přítomné v sérech onkologických pacientů schválených FDA jako nádorové markery. Převzato z [27,28].

Marker	Celý název	Karcinom	Fyziologická hodnota	Rok povolení FDA
AFP	α-1-fetoprotein	játra	10 mg/l	1992/2008
PSA	prostatický specifický antigen (volná frakce)	prostata	2,5 – 6,5 mg/l*	1986/1994/2012
CA 125	nádorový antigen (mucin 16)	vaječníky	35 kU/l	1997/2001
HE 4	lidský epididymální protein 4	vaječníky	50–80 pmol/l**	2008
CA 15-3	nádorový antigen 15-3 (mucin 1)	prsa	35 kU/l	1997
CA 19-9	nádorový antigen 19-9 (mucin)	mnohočetný výskyt ¹	35 kU/l	2002
CA 27-29	nádorový antigen 27-29 (mucin)	prsa	35 kU/l	2002
CEA	karcinoembryonální antigen	mnohočetný výskyt ²	5 mg/l	1985

¹ Slinivka břišní, tlusté střevo, vaječníky, žlučové cesty, žaludek, vzdálené metastázy.

² Zažívací trakt, tlusté střevo, plíce, prsa, močový měchýř, ledviny, prostata, slinivka břišní.

* Fyziologická hodnota se mění v závislosti na věku.

** Fyziologická hodnota se mění – pro premenopauzální ženy 50 pmol/l a pro postmenopauzální ženy 80 pmol/l.

FDA – americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

α -fetoprotein

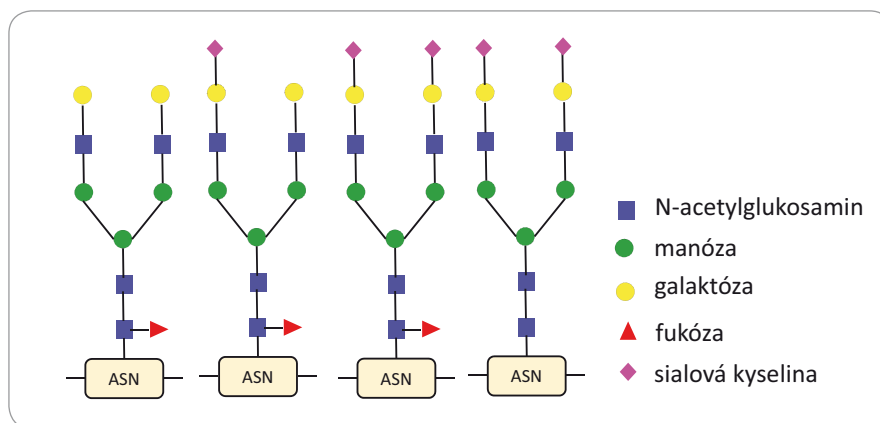
Přítomnost onkofetálního α -fetoproteinu (AFP) v séru lidského plodu byla poprvé zmíněna v roce 1956 [28], jeho hladina je standardně vysoká v embryonálním žloutkovém vaku a fetálních játrech. Syntéza AFP významně klesá po porodu a v dospělých játrech se tvoří jen ve stopovém množství. V séru dospělých zdravých jedinců se koncentrace volného sérového AFP pohybuje pod 10 $\mu\text{g/l}$ a zvýšená koncentrace AFP v séru je charakteristická pro většinu hepatocelulárních karcinomů, hepatoblastomů, karcinom slinivky břišní a gastrointestinálního traktu nebo karcinom mozku [30]. AFP je protein s jedním N-glykanem s komplexní dvouantennární strukturou, alterující terminální sialylaci a fukosylaci v jádře a jeho velikost je přibližně 70 kDa (obr. 4) [29,31]. Zvýšená fukosylace AFP může korelovat s progresí hepatocelulárního karcinomu [32].

Prostatický specifický antigen

Prostatický specifický antigen (PSA) je biomarker využívaný pro detekci karcinomu prostaty u mužů. Vyskytuje se v perianálních a periuretrálních žlázách a močovém měchýři. Jedná se o serinovou proteázu syntetizovanou epitelem acinů a výstelkou ductů prostaty. Koncentrace volné i vázané formy PSA se u zdravého jedince pohybuje pod 4 $\mu\text{g/l}$. Zvýšená koncentrace PSA v krevním oběhu indikuje porušení mikrostruktury prostaty a průnik z acinů a ductů do kapilár. Rostoucí koncentrace PSA v séru koreluje s velikostí a stage tumoru, přičemž koncentrace nad 30 $\mu\text{g/l}$ indikuje přítomnost vzdálených metastáz [33]. PSA je glykoprotein s jednou N-glykanovou strukturou (jeho velikost je 28,4 kDa), který je dále dělen do glykosylovaných a neglykosylovaných podskupin [34]. Glykanová část se vyskytuje v různých alterujících strukturách (fukosylace a/nebo sialylace), které jsou charakteristické pro pacienty s karcinomem prostaty [35–37].

Nádorový antigen CA 125

CA 125 (MUC 16) byl poprvé popsán jako biomarker detekovaný monoklonální protilátkou vyvinutou proti buněčné linii OVCA 433 odvozené od karcinomu va-



Obr. 4. N-glykany přítomné na α -fetoproteinu vyskytující se u pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Většina z nich je fukosylována na jádře glykanu a sialylována na anténách. Převzato a upraveno z [31].

ASN – aminokyselina asparagin

ječníků [38]. Koncentrace CA 125 v séru pohybující se nad 35 kU/l může indikovat přítomnost karcinomu vaječnicků, dělohy, endometria, slinivky břišní, trávicího ústrojí nebo prsu. Vyšetření hladiny CA 125 se však využívá hlavně pro diagnostiku karcinomu vaječnicků a je vždy vhodné jej doplnit např. stanovením hladiny karcinoembryonálního antigenu a tkáňového polypeptidického antigenu. CA 125 patří do skupiny mucinózních glykoproteinů lokalizovaných na vnější membráně buněk, je tvořen opakujícími se peptidovými epitopy mucinu MUC 16 [39,40] s přítomností O- i N-glykosylace. Jeho molekulová hmotnost v nativním stavu je vyšší než 2 miliony Da. CA 125 urychluje proliferaci nádorových buněk a potlačuje protinádorovou imunitní odpověď [41,42].

Zvýšená hladina CA 125 nad fyziologickou hodnotu (35 kU/l) může indikovat přítomnost peritoneálních metastáz karcinomu vaječnicků [43].

Lidský epididymální protein 4

Lidský epididymální protein 4 (HE4) se nachází v epiteliálních buňkách epididymis a ženském reprodukčním traktu. Fyziologické hodnoty HE4 v séru se pohybují v rozmezí 50–80 pmol/l, a to v závislosti na stáří ženy (před a po menopauze). Funkce proteinu doposud nebyla popsána. Bylo však zjištěno, že jeho nadprodukce, a tedy zvýšená koncentrace v sérech pacientek se objevuje jednak v přítomnosti serózních a endo-

metroidních nádorů vaječnicků [44], dále pak u adenokarcinomů plic a endometria [45,46]. HE4 je označován za sérový biomarker epiteliálního karcinomu vaječnicků a vykazuje jako jeden z mála biomarkerů vysokou specifitu v časných stadiích tohoto onemocnění (stadium I/II). Ve srovnání s CA 125 poskytuje větší specifitu v rozlišení benigních a maligních karcinomů. Doporučuje se též použít hodnoty koncentrací obou markerů (HE4 a CA 125) k výpočtu ROMA (risk of ovarian malignancy algorithm) skóre, které udává pravděpodobnost přítomnosti epitelového karcinomu vaječnicků, pokud je pomocí zobrazovací metody nalezena abnormalita v oblasti vaječnicků. Úspěšnost správné klasifikace rizika epiteliálního karcinomu vaječnicků byla tímto přístupem stanovena na 93,8 % [47]. HE4 je sekretovaný nízkomolekulární N-glykoprotein [44], avšak jeho glykanová struktura zatím nebyla podrobně popsána.

Závěr

Dosavadní klinicky používané nádorové biomarkery [27] fungují velmi dobře u pacientů s rozvinutým onkologickým onemocněním. Je však třeba nalézt sady dalších biomarkerů, které by byly: 1) dostatečně senzitivní (schopné rozpoznat dané onemocnění); 2) charakteristické pro časná stadia onemocnění; 3) specifické (dostatečně odlišující onkologicky nemocného člověka od zdravého nebo trpícího jinými zdravotními problémy).

V poslední době se objevilo mnoho prací popisujících moderní a efektivní metodické přístupy umožňující detekci glykosylačních změn na glykoproteinech přítomných v sérech. Glykoproteiny tedy představují atraktivní cíle při hledání biomarkerů v séru či exozomech z důvodu jejich aktivní sekrece, úniku nebo transportu ve vezikulách z nádorových buněk do extracelulárního prostoru [13,14,28]. Cílem přístupů je analyzovat nejenom glykoproteiny vyskytující se ve vysokých koncentracích (nad 1 g/l), ale také ty se střední a nízkou koncentrací (pod 1 g/l), které mohou představovat nové biomarkery. Mezi takové patří lektinová afinitní chromatografie [48], ELISA využívající vazbu lektinů [49,50] nebo rychle se rozvíjející hmotnostně spektrometrické techniky společně s bioinformatickými nástroji [51–53]. To vše vede nejen k detekci změn koncentrací glykoproteinů i jejich glykoforem přítomných v sérech v nízkých koncentracích, ale také k detailnímu popisu změn glykanových částí, které se mění v závislosti na vzniku a progresi nádorů [54].

Literatura

- Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(7): 526–542. doi: 10.1038/nrc1649.
- Zahradnikova M, Hernychova L, Vojtesek B et al. New trends in the study of protein glycosylation in oncological diseases. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S121–S128. doi: 10.14735/amko201415121.
- Zahradnikova M, Vojtesek B, Hernychova L. Sugars interfere or glycomics in the field of cancer biomarkers. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 2): 2520–2525. doi: 10.14735/amko20152520.
- Stanley P, Taniguchi N, Aebi M. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al (eds). *Essentials of Glycobiology*. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press 2015–2017. [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453020/>.
- Goetz JA, Mechref Y, Kang P et al. Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells. *Glycoconj J* 2009; 26(2): 117–131. doi: 10.1007/s10719-008-9170-4.
- Tang L, Chen X, Zhang X et al. N-Glycosylation in progression of skin cancer. *Mol Oncol* 2019; 36(6): 50. doi: 10.1007/s12032-019-1270-4.
- Sethi MK, Hancock WS, Fanayan S. Identifying N-glycan biomarkers in colorectal cancer by mass spectrometry. *Acc Chem Res* 2016; 49(10): 2099–2106. doi: 10.1021/acs.accounts.6b00193.
- Greville G, McCann A, Rudd PM et al. Epigenetic regulation of glycosylation and the impact on chemo-resistance in breast and ovarian cancer. *Epigenetics* 2016; 11(12): 845–857. doi: 10.1080/15592294.2016.1241932.
- Zou G, Benktander JD, Gizaw ST et al. Comprehensive analytical approach toward glycomic characterization and profiling in urinary exosomes. *Anal Chem* 2017; 89(10): 5364–5372. doi: 10.1021/acs.analchem.7b00062.
- Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(9): 540–555. doi: 10.1038/nrc3982.
- Kailemia MJ, Park D, Lebrilla CB. Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. *Anal Bioanal Chem* 2017; 409(2): 395–410. doi: 10.1007/s00216-016-9880-6.
- Ashkani J, Naidoo KJ. Glycosyltransferase gene expression profiles classify cancer types and propose prognostic subtypes. *Sci Rep* 2016; 20(6): 26451. doi: 10.1038/srep26451.
- Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019; 1871(2): 455–468. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.04.004.
- Li I, Nabet BY. Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance. *Mol Cancer* 2019; 18(1): 32. doi: 10.1186/s12943-019-0975-5.
- Wu H, Chen X, Ji J et al. Progress of exosomes in the diagnosis and treatment of pancreatic cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 2019; 23(3): 215–222. doi: 10.1089/gtmb.2018.0235.
- Zhang W, Ou X, Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: a potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis. *Int J Oncol* 2019; 54(5): 1719–1733. doi: 10.3892/ijo.2019.4742.
- Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation – potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(6): 477–488. doi: 10.1038/nrd1751.
- 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 overexpressed glycoproteins. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(7): M111.015792. doi: 10.1074/mcp.M111.015792.
- Lu J, Gu J. Significance of β -galactoside α 2,6 sialyltransferase 1 in cancers. *Molecules* 2015; 20(5): 7509–7527. doi: 10.3390/molecules20057509.
- Cummings RD, Trowbridge IS, Kornfeld S. A mouse lymphoma cell line resistant to the leukoagglutinating lectin from *Phaseolus vulgaris* is deficient in UDP-GlcNAc: alpha-D-mannoside beta 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 1982; 257(22): 13421–13427.
- Zhao Y, Sato Y, Isaji T et al. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS J* 2008; 275(9): 1939–1948. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06346.x.
- Demetriou M, Nabi IR, Coppolino M et al. Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. *J Cell Biol* 1995; 130(2): 383–392. doi: 10.1083/jcb.130.2.383.
- Yamamoto H, Swoger J, Greene S et al. Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity. *Cancer Res* 2000; 60(1): 134–142.
- Yamamoto H, Oviedo A, Sweeley C et al. Alpha2,6-sialylation of cell-surface N-glycans inhibits glioma formation in vivo. *Cancer Res* 2001; 61(18): 6822–6829.
- Ito Y, Miyachi A, Yoshida H et al. Expression of alpha1,6-fucosyltransferase (FUT8) in papillary carcinoma of the thyroid: its linkage to biological aggressiveness and anaplastic transformation. *Cancer Lett* 2003; 200(2): 167–172. doi: 10.1016/s0304-3835(03)00383-5.
- Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 2003; 278(5): 3466–3473. doi: 10.1074/jbc.M210665200.
- Valik D, Nekulová M, Zdražilová Dubská L et al. Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi. *Klin Biochem Metab* 2014; 22(43): 22–39.
- Bergstrand CG and Czar B. Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest* 1956; 8(2): 174. doi: 10.3109/00365515609049266.
- Kirwan A, Utratna M, O'Dwyer ME, et al. Glycosylation-based serum biomarkers for cancer diagnostics and prognostics. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 490531. doi: 10.1155/2015/490531.
- Saito S, Ojima H, Ichikawa H et al. Molecular background of α -fetoprotein in liver cancer cells as revealed by global RNA expression analysis. *Cancer Science* 2008; 99(12): 2402–2409. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00973.x.
- Johnson PJ, Poon TCW, Hjelm NM et al. Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms. *Br J Cancer* 2000; 83(10): 1330–1337. doi: 10.1054/bjoc.2000.1441.
- Kobayashi M, Kuroiwa T, Suda T et al. Fucosylated fraction of alpha-fetoprotein, L3, as a useful prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma with special reference to low concentrations of serum alpha-fetoprotein. *Hepatol Res* 2007; 37(11): 914–922. doi: 10.1111/j.1872-034X.2007.00147.x.
- Pešl M, Zámečník L, Soukup V et al. Prostatický specifický antigen a odvozené parametry. In: *Urologie pro praxi* 2004. [online]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2004/02/05.pdf>.
- Isono T, Tanaka T, Kageyama S et al. Structural diversity of cancer-related and non-cancer-related prostatespecific antigen. *Clin Chem* 2002; 48(12): 2187–2194.
- Kyselova Z, Mechref Y, Al Bataineh MM et al. Alterations in the serum glycome due to metastatic prostate cancer. *J Prot Res* 2007; 6(5): 1822–1832. doi: 10.1021/pr060664t.
- Peracaula R, Barrabés S, Sarrats A et al. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis Markers* 2008; 25(4–5): 207–218. doi: 10.1155/2008/797629.
- Leymarie N, Griffin PJ, Jonscher K et al. Interlaboratory study on differential analysis of protein glycosylation by mass spectrometry: the ABRF glycoprotein research multi-institutional study 2012. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12(10): 2935–2951. doi: 10.1074/mcp.M113.030643.
- Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H et al. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981; 68(5): 1331–1337. doi: 10.1172/jci110380.
- O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ et al. The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol* 2001; 22(6): 348–366. doi: 10.1159/000050638.
- Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem* 2001; 276(29): 27371–27375. doi: 10.1074/jbc.M103554200.
- Rump A, Morikawa Y, Tanaka M et al. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem* 2004; 279(10): 9190–9198. doi: 10.1074/jbc.M312372200.
- Hatrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol* 2007; 70: 431–457. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659.
- Tang Z, Qian M, Ho M. The role of mesothelin in tumor progression and targeted therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; 13(2): 276–280.
- Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005; 65(6): 2162–2169. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3924.
- Moore RG, Brown AK, Miller MC et al. Utility of a novel serum tumour biomarker HE4 in patients with endometrioid adenocarcinoma of the uterus. *Gynecol Oncol* 2008; 110(2): 196–201. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.04.002.
- Escudero JM, Auge JM, Filella X et al. The utility of serum human epididymis protein 4 (HE4) in patients with malignant and nonmalignant diseases: comparison with CA125. *Clin Chem* 2011; 57(11): 1534–1544. doi: 10.1373/clinchem.2010.157073.

47. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2009; 112(1): 40–46. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.08.031.
48. O'Connor BF, Monaghan D, Cawley J et al. Lectin affinity chromatography (LAC). *Methods Mol Biol* 2017; 1485: 411–420. doi: 10.1007/978-1-4939-6412-3_23.
49. Wu J, Xie X, Nie S et al. Altered expression of sialylated glycoproteins in ovarian cancer sera using lectin-based ELISA assay and quantitative glycoproteomics analysis. *J Proteome Res* 2013; 12(7): 3342–3352. doi: 10.1021/pr400169n.
50. Ito H, Hoshi K, Honda T et al. Lectin-based assay for glycoform-specific detection of α 2,6-sialylated transferrin and carcinoembryonic antigen in tissue and body fluid. *Molecules* 2018; 23(6): 1314. doi: 10.3390/molecules23061314.
51. Hayashi M, Matsuo K, Tanabe K et al. Comprehensive serum glycopeptide spectra analysis (CSGSA): a potential new tool for early detection of ovarian cancer. *Cancers (Basel)* 2019; 11(5): 591. doi: 10.3390/cancers11050591.
52. Qiu F, Chen F, Liu D et al. LC-MS/MS-based screening of new protein biomarkers for cervical precancerous lesions and cervical cancer *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2019; 39(1): 13–22. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2019.01.03.
53. Gaunitz S, Nagy G, Pohl NL et al. Recent advances in the analysis of complex glycoproteins. *Anal Chem* 2017; 89(1): 389–413. doi: 10.1021/acs.analchem.6b04343.
54. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB et al. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019; 15(6): 346–366. doi: 10.1038/s41581-019-0129-4.

Glykozylácia ako dôležitý regulátor funkcie protilátok

Glycosylation as an Important Regulator of Antibody Function

Uhrík L., Hernychová L., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Súhrn

Východisko: Glykozylácia konštantných oblastí protilátok zásadne ovplyvňuje ich interakčné schopnosti s bunkami imunitného systému. Jedná sa o modifikáciu, ktorá okrem biologickej aktivity protilátok zasahuje aj do ich konformácie, stability, rozpustnosti, sekrécie, farmakokinetiky a imunogenity. Pre ich správnu funkciu nie je podstatná len lokalizácia samotných glykozylácií na molekule protilátok, ale aj štruktúra jednotlivých glykánov. Zmeny glykozylačných profilov protilátok boli popísané u niektorých fyziologických procesov, akými sú tehotenstvo alebo starnutie, ale taktiež u mnohých patologických stavov ako reumatoidnej artritídy, či nádorov žalúdka, pľúc alebo prostaty. Stále existuje celé množstvo neobjasnených mechanizmov, ktoré riadia glykozyláciu protilátok alebo sú týmito modifikáciami naopak regulované. Viaceré zdroje popisujú význam niektorých špecifických glykozylácií ako potenciálnych biomarkerov. **Cieľ:** Cieľom tohto prehľadového článku je zhrnúť a priblížiť doterajšie poznatky o glykozylácií protilátok a upozorniť na ich vplyv na imunitné odpovede a ich úlohu v priebehu ochorenia. Ich dôležitosť podčiarkuje aj to, že väčšina vyvíjaných a využívaných terapeutických protilátok je modifikovaných glykozyláciou. Práve cieľové vnesenie vhodných glykozylácií, ktoré podporujú aktivity akými sú napr. bunková cytotoxicita závislá na protilátkach, bunková fagocytóza závislá na protilátkach alebo cytotoxicita závislá na komplemente, viedlo k zlepšeniu schopností týchto protilátok likvidovať patogény alebo nádorové bunky. Preto je oblasti glykozylácie protilátok venovaná stále väčšia pozornosť. Získané znalosti môžu prispieť k ďalšiemu vývoju efektívnych nástrojov diagnostiky a terapie rôznych ochorení.

Kľúčové slová

protilátky – glykozylácia – farmakológia – imunitný systém – terapia

Summary

Background: The glycosylation of constant regions of antibodies significantly affects their interaction capabilities with immune cells. It is a modification that, in addition to the biological activity of antibodies, has an impact on their conformation, stability, solubility, secretion, pharmacokinetics, and immunogenicity. The location of glycosylations on the molecule is essential for the proper function of the antibody, as is the structure of the individual glycans. Changes in the glycosylation profiles of antibodies have been described in some physiological processes like pregnancy or ageing, but also in many pathological conditions such as rheumatoid arthritis or gastric, lung and prostate tumours. There are still several unexplained mechanisms that control the glycosylation of antibodies or immune responses, which in turn are regulated by these modifications. Multiple sources describe the importance of some specific glycosylations as potential biomarkers. **Purpose:** The aim of this review is to summarise and present the knowledge of the glycosylation of antibodies and to highlight their influence on immune responses and their role during disease. Their importance is also underlined by the fact that the most of these therapeutic antibodies used and developed are modified by glycosylation. The targeted introduction of appropriate glycosylations, which can promote activities such as antibody-dependent cellular cytotoxicity, antibody-dependent cellular phagocytosis or complement-dependent cytotoxicity, have improved the ability of these antibodies to kill pathogens or tumour cells. Therefore, more attention is being paid to this area. In the future, more effective tools for diagnosing and treating certain diseases can be created with better knowledge.

Keywords

antibodies – glycosylation – pharmacology – immune system – therapeutics

Táto práca bola podporená projektom MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a GAČR 16-044965.

This work was supported by MEYS – NPSI – LO1413, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and Czech Science Foundation 16-044965.

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 recommendation for biomedical papers.



Mgr. Lukáš Uhrík

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

Obdržané/Submitted: 18. 6. 2019

Prijaté/Accepted: 3. 9. 2019

doi: 10.14735/amko20193546

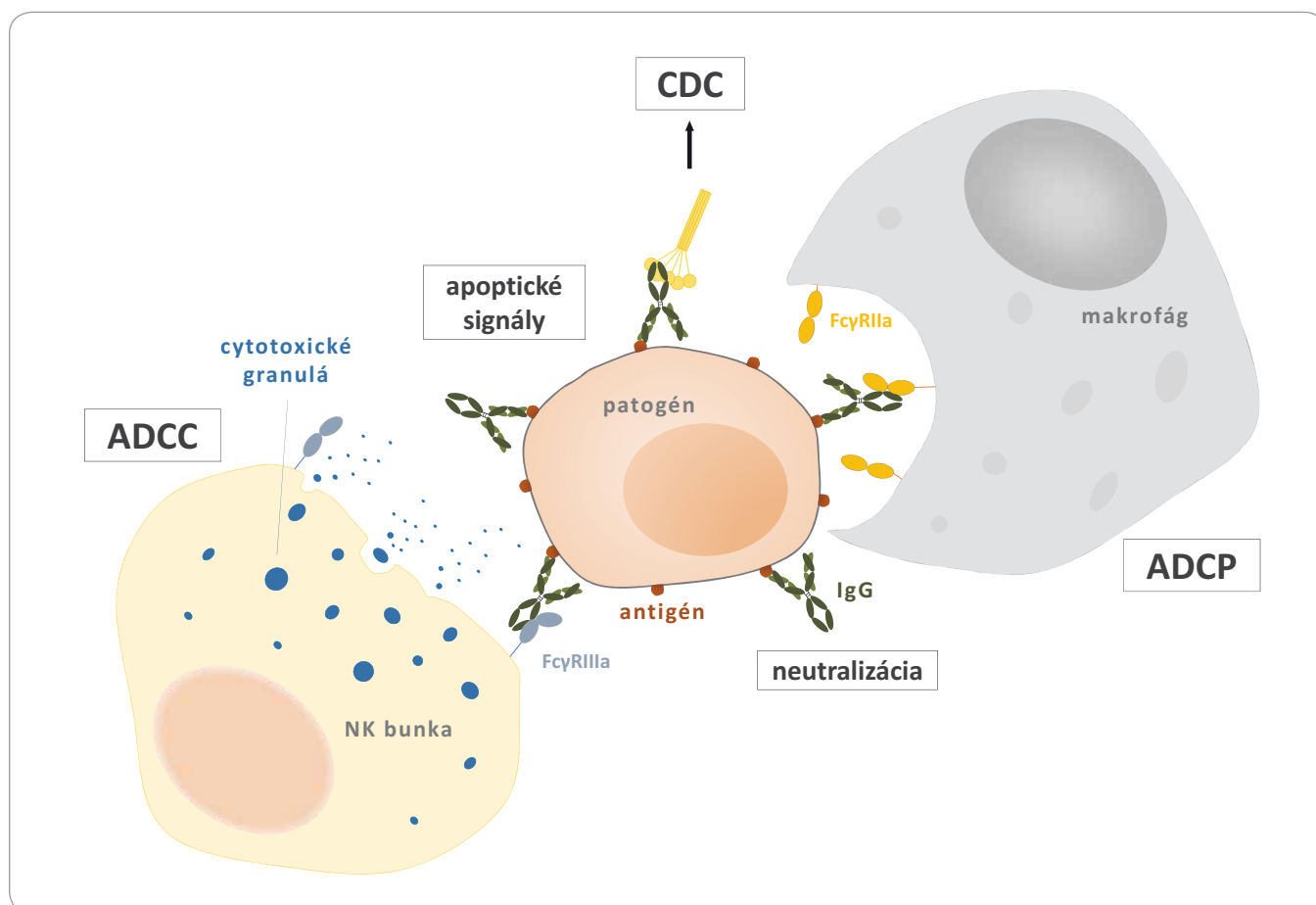
Úvod

Protílátky, proteíny produkované maturovanými B-lymfocytmi, patria k základným súčastiam humorálnej imunitnej odpovedi. Sú to proteíny zložené z dvoch ľahkých a dvoch ťažkých polypeptidových reťazcov spojených disulfidickými väzbami, pričom sa ich štruktúra skladá z fragmentu viazajúceho antigén (fragment antigen binding – Fab) a konštantného alebo kryštalizujúceho fragmentu (fragment crystallizable – Fc) [1]. Na základe zloženia konštantných oblastí ťažkých reťazcov rozlišujeme päť izotypov ľudských protilátok, imunoglobulíny triedy A (IgA), D (IgD), E (IgE),

G (IgG) a M (IgM) [2]. Biologické funkcie jednotlivých izotypov protilátok podrobne rozoberajú Schoeder et al [3]. Zatiaľ čo sú oblasti určujúce komplexitaritu Fab zodpovedné za väzbu antigénu [4], Fc oblasti umožňujú komunikáciu s ďalšími zložkami imunity, a môžu tak aktivovať mechanizmy, ako sú apoptóza, bunková cytotoxicita závislá na protilátkach (antibody dependent cellular cytotoxicity – ADCC), bunková fagocytóza závislá na protilátkach (antibody dependent cellular phagocytosis – ADCP) a cytotoxicita závislá na komplemente (complement dependent cytotoxicity – CDC) (obr. 1) [5,6].

Existuje niekoľko typov Fc receptorov (FcR) nachádzajúcich sa na ostatných bunkách imunitného systému. Tab. 1 popisuje rôzne typy týchto receptorov. Možu sa odlišovať na izotype protilátok, ktoré dokážu rozoznať, ich afinitu tejto väzby a type buniek, ktoré ich exprimujú. Na základe týchto rozdielov sú spúšťané odlišné dráhy vedúce k likvidácii patogénu [2,7].

Tak ako mnohé iné proteíny aj protílátky podliehajú posttranslačným modifikáciám. N-glykozylácia je najčastejšou modifikáciou membránových a sekretovaných proteínov u eukaryotov [8]. Pri tomto vysoko konzervovanom pro-



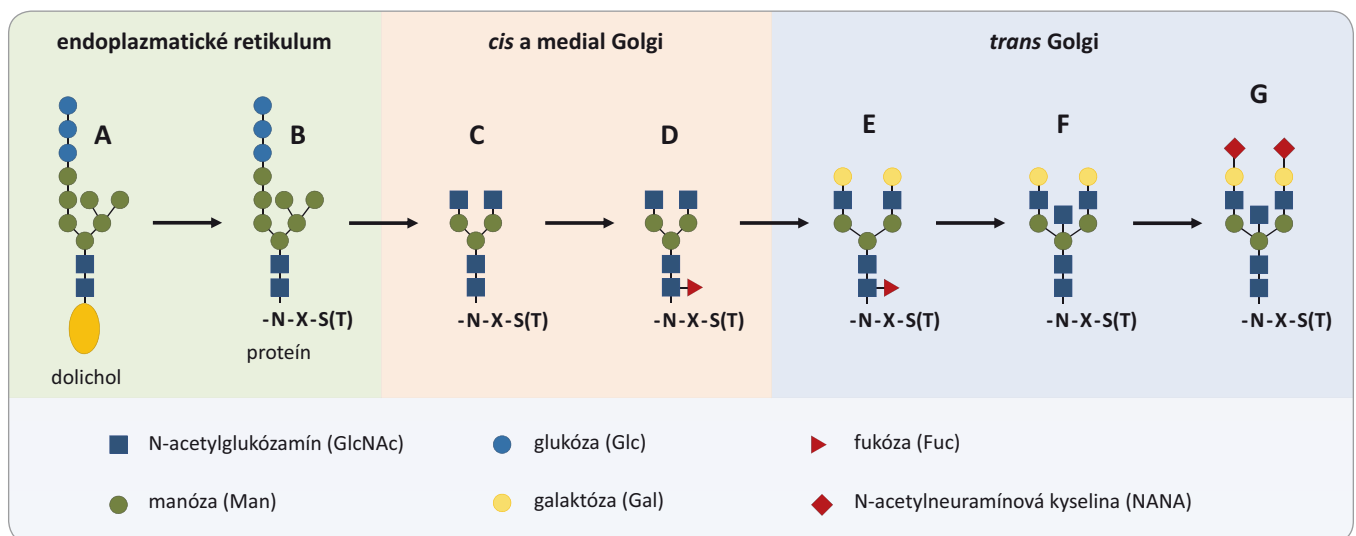
Obr. 1. Protílátky a mechanizmy likvidácie patogénu. Protílátky dokážu likvidovať patogén priamym pôsobením a to väzbou na povrchové molekuly zodpovedné za jeho prichytenie k hostiteľskej bunke (neutralizácia) alebo receptory aktivujúce apoptické signály. Protílátky dokážu svojimi Fc oblasťami interagovať s povrchovými receptormi ďalších buniek imunitného systému a spúšťať tak ďalšie imunitné mechanizmy. Na obrázku znázornená NK bunka interaguje prostredníctvom receptoru CD16 (FcyRIIIa) s Fc časťami protilátky vystavenej na povrchu patogénu, aktivuje svoje cytotoxické mechanizmy a uvoľňuje do extracelulárneho priestoru cytotoxické granulá s enzýmami perforinom a granzýmom, ktoré nie sú schopné zabiť len samotný patogén, ale tiež nádorové bunky alebo bunky infikované vírusom (ADCC). Rovnako FcyRIIIa receptory makrofágu aktivujú fagocytózu patogénu (ADCP), Fc oblasti taktiež dokážu interagovať so zložkami komplemente a aktivovať tak lýzu bunky (CDC). Prevzaté a upravené z [6].

Fc – konštantné oblasti protilátok, NK – natural killer, ADCC – bunková cytotoxicita závislá na protilátkach, ADCP – bunková fagocytóza závislá na protilátkach, CDC – cytotoxicita závislá na komplemente

Tab. 1. Fc receptory. Rozdelenie Fc receptorov a ich izoform v závislosti na protilátkach, ktoré dokážu viazať, odlišnostiach v afinitě interakcie a bunkách imunitného systému, na povrchu ktorých sú exprimované.

Protilátka	Fc receptor	Izoforma receptoru	Afinita k protilátke	Expresia na bunkách
IgG	FcγRI	FcγRIa	vysoká	monocyty, makrofágy, neutrofilý, eozinofily
		FcγRIb	nízka	monocyty, makrofágy, neutrofilý, krvná doštičky a Langerhansove bunky
	FcγRII	FcγRIIa	nízka	monocyty, makrofágy, neutrofilý
		FcγRIIc	nízka	monocyty, makrofágy, neutrofilý
		FcγRIId	nízka	monocyty, makrofágy, neutrofilý
	FcγRIII	FcγRIIIa	stredná	makrofágy, NK bunky, γδ T bunky, niektoré monocyty
FcγRIIIb		nízka	neutrofilý a eozinofily	
IgE	FcεRI	FcεRI	veľmi vysoká	žírne bunky, bazofily, Langerhansove bunky, aktivované monocyty
		FcεRIa	nízka	B bunky
	FcεRII	nízka	B bunky, T bunky, monocyty, eozinofily, makrofágy	
IgA	FcαRI	FcαRIa	stredná	neutrofilý, monocyty, niektoré makrofágy, eozinofily, Kupfferove bunky a niektoré dendritické bunky

Fc – konštantné oblasti protilátok, Ig – imunoglobulíny, NK – natural killer



Obr. 2. Proces glykozylácie. Proces glykozylácie začína v endoplazmatickom retikule, kde je štruktúra $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ prenesená z molekuly dolicholilu (A) ukotveného v membráne na asparagín (N) v sekvencii novo syntetizovaného proteínu (B). Postupne je takýto glykoproteín transportovaný do Golgiho aparátu, kde je štruktúra prekursorového glykánu spracovaná na štruktúru $Man_3GlcNAc_2$ s dvomi anténami (C), ktorá tvorí základ všetkých N-glykozylácií. Na toto jadro môžu byť pridávané molekuly galaktózy, fukózy, N-acetylglukozamínu a kyseliny N-acetylneuramínove (D – core-fukozylácia, E – digalaktózovaný glykán, F – bisektinový glykán, G – disialylovaný glykán). Prevzaté a upravené z [9].

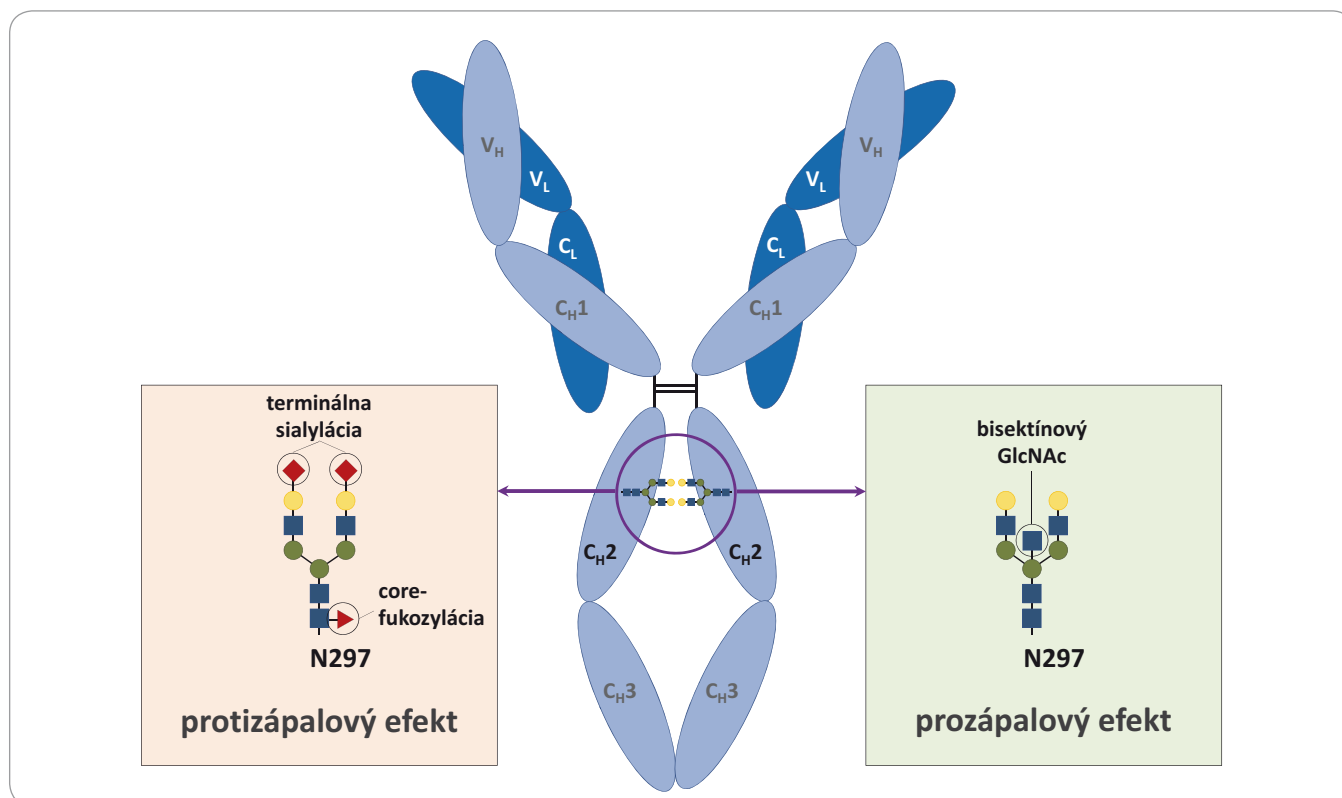
cese odohrávajúcom sa v endoplazmatickom retikule, je oligosacharyltransferázovým komplexom rozoznávaná sekvencia N-X-S(T) a na asparagín (N) prenesená oligosacharidová zložka so zložením $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ (glukóza – Glc, manóza – Man, N-acetylglukozamín – GlcNAc). Takto modifikovaný pro-

teín prechádza do Golgiho aparátu, kde je štruktúra glykánu postupne spracovávaná špecifickými glykozidázami a glykosyltransferázami. Finálny glykoproteín je sekretovaný mimo bunku [9,10]. Existuje veľké množstvo molekúl N-glykánov, ktorými sú proteíny modifikované. Jej základ pozostáva však vždy z dvoch

molekúl GlcNAc a troch manózových jednotiek (obr. 2).

Glykozylácia IgG

IgG tvoria približne 75 % z celkového množstva ľudských sérových protilátok a rovnako sú prevažujúcou skupinou používaných a vyvíjaných protilátok



Obr. 3. Ilustrácia konzervovanej glykozylácie IgG v pozícii N297 a príklady vplyvov odlišných štruktúr na efektorové funkcie IgG. Obrázok popisuje vplyv zloženia glykozylácie na zápalovú odpoveď. Zatiaľ čo je terminálnej sialylácii a core-fukozylácii je pripisovaný protizápalový, bisektínové glykány majú prozápalový efekt na pôsobenie IgG. Prevzaté a upravené z [21].

IgG – imunoglobulíny triedy G

využívaných v terapii rôznych ochorení [11]. Zásadný efekt na funkciu IgG má N-glykozylácia oblasti Fc. Tieto oblasti totiž interagujú s receptormi FcγR nachádzajúcimi sa na ďalších imunitných bunkách [12] a deglykozylácia Fc vedie k takmer úplnej strate väzby s receptormi FcγRI [13]. Ľudské IgG obsahujú na svojom Fc len jedinú konzervovanú pozíciu glykozylácie nachádzajúce sa na C_H2 doméne na asparagínu v pozícii 297 (N297) (obr. 3) [14]. I keď sú štruktúry Fc glykánov IgG pomerne heterogénne [15], oproti ostatným glykoproteínom tvoria len dvojitaneárne štruktúry, ktoré môžu byť obohatené ďalšími molekulami sacharidov ovplyvňujúcich štruktúrne i funkčné vlastnosti IgG, ako jej stabilitu alebo typ FcγR, na ktoré sa viažu [16]. α-1,6 anténa glykánu totiž nekovalentne interaguje s Fc reťazcom, zatiaľ čo druhá anténa (α-1,3) smeruje do priestoru medzi reťazcami a tam interaguje s rovnakým ramenom glykánu druhého ťažkého reťazca, čo sta-

bilizuje štruktúru protilátky [17]. V minulosti sa na základe kryštalografických dát predpokladalo, že táto glykozylácia vytvára otvorenú konformáciu Fc oblasti, zatiaľ čo absencia glykozylácie viedla k zatvorenej konformácii, ktorá nie je schopná interakcie s receptormi [18,19]. Neskôr bol však tento model vyvrátený experimentami s protilátkami v roztoku a bolo preukázané, že neglykozylované Fc fragmenty sú flexibilné a môžu vytvárať ešte otvorenejšie konformácie [20].

Ako už bolo spomenuté, základná štruktúra glykánu (GlcNAc₂Man₂) môže byť modifikovaná molekulami iných sacharidov, konkrétne galaktózy (Gal), kyseliny neuramínovej (NeuAc), fukózy (Fuc) alebo ďalšími molekulami GlcNAc a Man [21]. U zdravých jedincov sú najčastejšími štruktúrami negalaktózylovaná štruktúra (IgG-G0), monogalaktózylovaná štruktúra (IgG-G1) a digalaktózylovaná štruktúra (IgG-G2) tvoriace väčšinu glykoforiem IgG [22,23]. Viaceré štúdie ukazujú, že terminálna

galaktozylácia je modulátorom zápalovej aktivity IgG, keď bolo zistené, že absencia terminálnej galaktózy pôsobí prozápalovo prostredníctvom aktivácie komplementu alternatívnou cestou [24]. Pokles hladiny galaktozylovaných glykoforiem bol naopak zaznamenaný u viacerých ochorení, ako reumatoidnej artritídy či lupus erythematosus [25–27]. Štúdia autorov Karsten et al na myších modeloch poukazuje na to, že galaktozylácia Fc oblasti je nevyhnutná pre efektívne spustenie protizápalovej signálnej kaskády interakciou s FcγRIIB receptorom [28]. O prozápalovom pôsobení terminálnych galaktozylácií však hovoria ďalšie výsledky. Cez afinitu k C1q zložke komplementu podporujú CDC a väzbou aktivujúcich FcγR receptorov taktiež ADCC [29]. Tieto kontrastujúce výsledky poukazujú na komplexnosť signálnych dráh imunitných reakcií sprostredkovaných protilátkami. Napojenie ďalšieho typu sacharidu – kyseliny neuramínovej v procese sialylácie – tak-

tiež vedie k významnej modifikácii pre reguláciu zápalovej aktivity IgG [30,31]. Predpokladá sa, že práve sialylované glykofory majú význam pre protizápalovú aktivitu intravenózneho imunoglobulínu (intravenózneho imunoglobulínu – IVIg) indikovaného pri mnohých imunodeficientných, neurologických a ďalších ochoreniach [32,33]. U zdravých jedincov je sialylácia (mono- a disialylácia) na rozdiel od galaktozylácie málo abundančná, vyskytujúca sa na približne u 10–15 % glykoforiu IgG [11]. Naopak fukozylácia prvej molekuly GlcNAc, ktorou sa glykán viaže na proteín (core-fukozylácia), sa u ľudskej populácie vyskytuje v približne 90 % prípadoch. Takéto štruktúry dokážu viazať receptory FcγRIII až 100násobne slabšie a znižujú tak cytotoxickú aktivitu takýchto IgG najmä pri ADCC [34,35]. Funkcia fukozylácie je pravdepodobne regulačná, vytvára stericke prekážky pre naviazanie receptorov, a tak zabraňuje aktivácii prozápalových procesov pri fyziologických podmienkach (obr. 3) [36,37].

Opačné pôsobenie, i keď v menšej miere, bolo popísané u bisektínových glykoforiu IgG (obr. 2 – štruktúra F). Z dôvodu sterickej zábrany, ktorú bisektínový GlcNAc vytvára pre fukozylačný enzým, tieto štruktúry neobsahujú core-fukozyláciu. Nárast ADCC aktivity u bisektínových glykoforiu IgG je tak pripisovaný skôr absencii tejto fukozylácie, ktorá by bola schopná tlmiť ADCC aktivitu IgG [38].

Popri konzervovaných miestach glykozylácie, Fc obsahuje približne 15–25 % sérových IgG i glykozylácie Fab oblastí [39]. Sú to hlavne komplexné bianténarne N-glykány napojené na N-X-S/T sekvencie, ktoré vznikli v procese hypermutácií [40]. V porovnaní s Fc tvoria glykánové štruktúry Fab z veľkej časti bisektínové, galaktozylované či sialylované glykány a naopak menšie množstvo core-fukozylovaných [41]. Lepšia dostupnosť týchto štruktúr pre glykozyltransferázy oproti stericke bráneným Fc glykánom na C_H2 doméne vedie k vzniku rozmanitejších štruktúr. Rovnako sú tieto glykozylácie dostupnejšie i prostrediu a môžu rovnako významne ovplyvňovať stabilitu, biologický polčas rozpadu či väzobné vlastnosti protilátky [42–44].

Glykozylácie ďalších typov protilátok

I keď je IgG najlepšie preštudovanou izoformou protilátok, niekoľko faktov je známych aj o glykozylacii ďalších izotypov. Protilátky IgE hrajú významnú úlohu v alergických reakciách. IgE sa dokáže viazať na receptory FcεRI žírnych buniek a FcεRII B-buniek [45] a na rozdiel od IgG obsahujú IgE niekoľko glykozylačných miest. Štyri konzervované glykozylácie (tri komplexné a jedna vysokomanozová) sa nachádzajú na Fc a ďalšie tri glykozylačné miesta s komplexnými glykánmi sa nachádzajú na Fab [46,47]. Efekty glykozylacii IgE protilátok boli preukázané mutáciami, ktoré blokovali glykozylácie v popísaných pozíciách [48]. Mutácia konzervovanej pozície N394 na Fc, ktorá zodpovedá konzervovanej glykozylacii N297 u IgG, redukuje väzbu na receptor FcεRI [49]. Opačný efekt majú glykozylácie IgE na ich väzbu na receptory B-lymfocytov FcεRII, keď absencia glykozylácie vedie k zvýšeniu tejto väzby [50].

Glykozylácia IgA, ktorá má zásadnú úlohu v mukóznej imunite, je závislá na ich izotype [51]. Existujú dve izofory protilátky IgA: IgA1 a IgA2, u druhého rozoznávame dva allotypy IgA2m(1) a IgA2m(2). U izotypu IgA1, ktorý tvorí približne 85 % celkového IgA, sú známe dve konzervované miesta N-glykozylácie modifikované komplexnými glykánmi N263 a N459 [52]. Mimo toho bola popísaná O-glykozylácia až v šiestich pozíciách v oblasti spájajúcich Fab a Fc. Tieto glykozylácie hrajú úlohu vo väzbe mikroorganizmov sekretovanými IgA [15]. Taktiež bola popísaná úloha glykozylácie IgA v patogenézi nefropatie [53]. Oba subizotypy IgA2 obsahujú štyri glykozylačné miesta N166, N263, N337, N459, subizotyp IgA2m(2) má navyše jedno miesto v pozícii N211 [15]. IgM, ktoré sú prvou skupinou protilátok produkovaných po vystavení antigénu, tvoria penta- alebo hexamérne štruktúry, ktoré sú silno glykozylované. Obsahujú päť N-glykozylačných miest obsadených tromi komplexnými a dvomi oligomanozovými štruktúrami [54]. Nedávne štúdie zaznamenali vplyv sialylácie na imunitnú aktivitu IgM moduláciou interakcie s T-lymfocytmi [55].

Protilátky IgD sú najmenej abundantným izotypom, obsahujú však taktiež konzervované glykozylácie. Sú u nich identifikované tri N-glykozylácie nutné pre ich správnu konformáciu a sekréciu a podobne ako IgA1 obsahujú aj O-glykánové modifikácie [56]. I keď sú miesta konzervovaných glykozylacii u týchto izotypov pomerne dobre popísané, je potrebné odhaliť ich konkrétne vplyvy na funkciu týchto protilátok.

Regulácia glykozylácie a jej fyziologické a patologické zmeny

Pravdepodobne existuje niekoľko mechanizmov, ktoré vplyvajú na glykozyláciu protilátok, zahrnujúc expresiu glykozyltransferáz resp. glykozidáz, dostupnosti jednotlivých sacharidových substrátov, pH vnútri Golgiho aparátu, rýchlosť syntézy proteínov a dostupnosti vezikulárneho transportného aparátu. Zaznamenanie zmeny glykozylačného profilu IgG v závislosti na faktoroch, akými sú vek, pohlavie či tehotenstvo, poukazujú taktiež na vplyv hormonálneho riadenia týchto procesov. Bolo zistené, že trend rastu galaktozylovaných glykoforiu sa v období medzi 20. a 30. rokom života obracia a začína klesať [57–59]. Tento proces je signifikantný najmä u žien na začiatku menopauzy [60–62]. Redukcia agalaktozylovaných glykoforiu je kontrastne pozorovaná v tehotenstve, kde bol súbežne popísaný mierny pokles fukozylovaných glykoforiu protilátok. U tehotných pacientok s reumatoidnou artritídou nárast galaktozylovaných glykoforiu koreloval so zlepšením zdravotného stavu [63,64].

I keď je glykozylácia vysoko konzervovaným procesom, existuje niekoľko analýz, ktoré poukazujú na ich aktívne zmeny v procesoch zápalových odpovedí u autoimunitných a infekčných ochorení [65–68]. Taktiež boli zaznamenané zmeny v mnohých nádorových ochoreniach. Pomerne uniformne bol zachytený pokles galaktozylácie u mnohopočetného myelómu, nádoroch žalúdka, hrubého čreva, prostaty, pľúc a ďalších nádorov korelujúci s progresiou a metastázovaním [69–73]. Tento trend je vysvetlený vplyvom zápalovej reakcie na vývoj nádoru alebo stra-

Tab. 2. Príklady protilátok obsahujúcich glykozyláciu schválených pre terapiu onkologických ochorení. Tabuľka popisuje obchodný názov, štruktúru, mechanizmus ich pôsobenia a ochorenia, pri ktorých sa využívajú.

Protilátka	Obchodný názov	Zloženie	Mechanizmus účinku	Využitie v onkológii	Referencie
rituximab	Rituxan	IgG1 κ chimerické	väzba transmembránového proteínu CD20 B-lymfocytov a ich lýza, ADCC, CDC	non-Hodgkinov lymfóm, chronická lymfocytová leukémia	[109,110]
bevacizumab	Avastin	IgG1 κ humanizované	väzba a blokácia signálnej dráhy VEGF	kolorektálny karcinóm, HER2 negatívne metastázujúce nádory prsu, nemalobunečný karcinóm pľúc	[111–113]
denosumab	Xgeva	IgG2 κ ľudské	väzba a blokácia signálnej dráhy RANKL	metastázy kostnej drene	[114]
daratumumab	Darzalex	IgG1 κ ľudské	väzba CD38 a inhibícia rastu nádorových buniek a indukcia apoptózy, ADCC, CDC	mnohopočetný myelóm	[115]
cetuximab	Erbix	IgG1 κ chimerické	väzba na EGFR a blokácia dráhy, inhibícia rastu nádorových buniek rastu a tvorby metastáz, ADCC	metastázujúci kolorektálny karcinóm, metastázujúce nemalobunčné karcinómy hlavy a krku	[116,117]
trastuzumab emtansine	Kadcyla	IgG1 κ humanizované + liečivo	väzba IV podjednotky receptora HER2, endocytóza a uvoľnenie DM1 blokujúceho funkciu mikrotubulov, ADCC	metastázujúce nádory prsu	[118,119]
avelumab	Bavencio	IgG1 λ ľudské	väzba PD-L1 a blokácia imunosupresívnych signálov, ADCC	metastázujúci karcinóm z Merkelových buniek	[120]
pertuzumab	Perjeta	IgG1 κ humanizované	väzba dimerizačnej podjednotky receptora HER2, ADCC	metastázujúce nádory prsu	[121,122]
necitumumab	Portrazza	IgG1 κ ľudské	väzba a blokovanie signálnej dráhy EGFR, ADCC	metastázujúci skvamózny nemalobunečný karcinóm pľúc	[123,124]
pembrolizumab	Keytruda	IgG4 κ humanizované	väzba receptora PD-1 a blokácia imunosupresívnych signálov	metastázujúci melanóm, metastázujúce nádory krčku maternice, metastázujúci nemalobunečný karcinóm pľúc	[125–127]
cemiplimab	Libtayo	IgG4 κ ľudské	väzba receptora PD-1 a blokácia imunosupresívnych signálov	metastázujúci kožný skvamózny karcinóm	[128,129]

Ig – imunoglobulín, ADCC – bunková cytotoxicita závislá na protilátkach, CDC – cytotoxicita závislá na komplemente, VEGF – vascular endothelial growth factor, RANKL – receptor activator of NFκB ligand, HER2 – human epidermal growth factor receptor 2, PD-L1 – programmed death-ligand 1, PD1 – programmed cell death protein 1

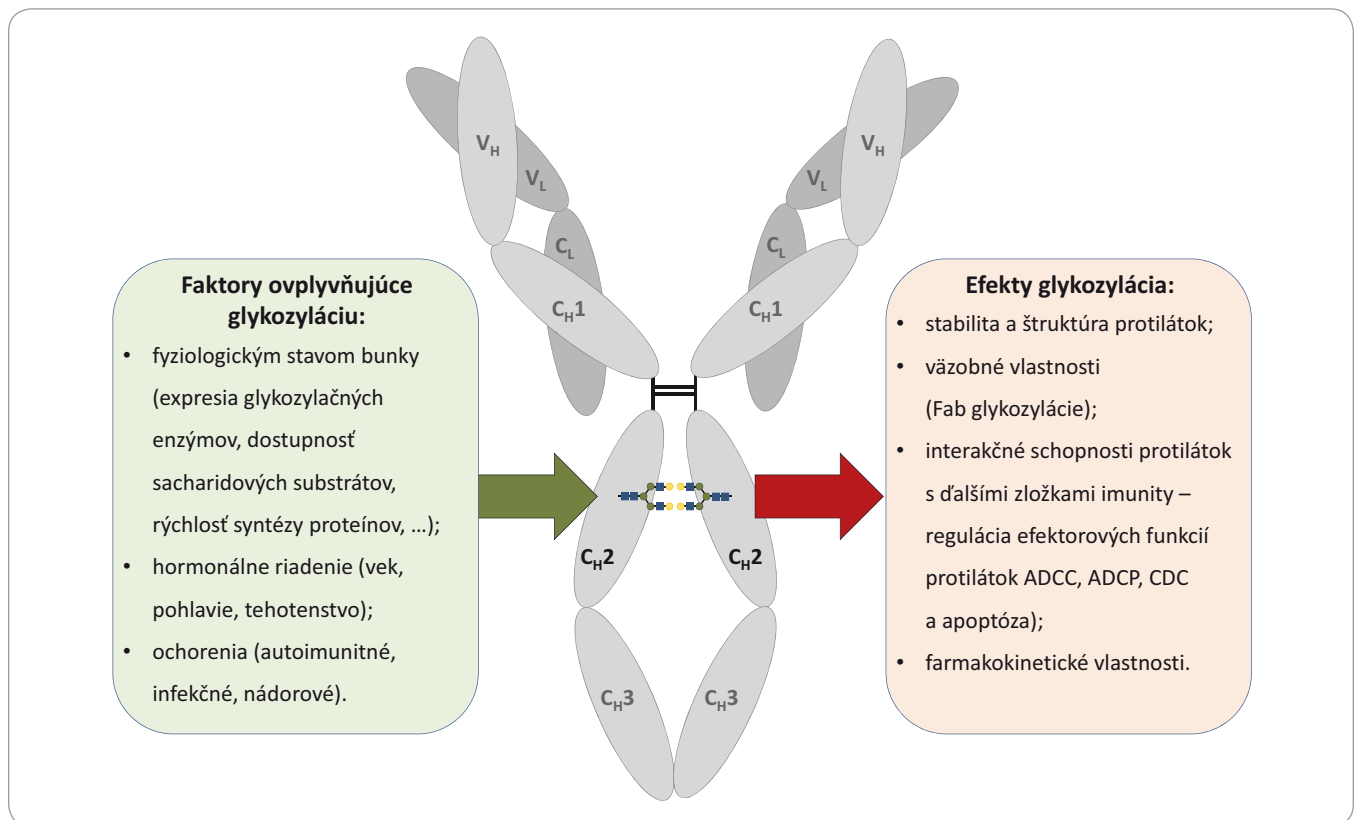
tou schopnosti takýchto IgG viazať C1q, a možnosťou nádorových buniek uniknúť CDC [74]. Popri galaktozylácii boli zaznamenané zmeny aj u iných glykoforiem. U nádorov žalúdka bol zachytený nárast fukozylovaných IgG a naopak pokles bisektínových IgG. V jednej štúdií bola taktiež zistená asociácia zvýšenia sialylovaných a bisektínových glykoforiem IgG s lepším prežitím [70]. Štúdie na veľkom počte subjektov (pacientov

a zdravých kontrol) potvrdili pokles sialylácie v celkovom sérovom IgG spojený s vývojom nádoru a horšou prognózou [75,76]. Nárast podielu manózy u IgG Fc a Fab asociovaný s progresiou ochorenia bol zachytený u malígneho melanómu v porovnaní so zdravými pacientmi. Niektoré práce poukazujú na koreláciu profilu agalaktózových glykoforiem s hladinami zavedených biomarkerov vývoja nádorového ochore-

nia a metastázovania, ako je to u nádoru prostaty, pľúc a žalúdka. Navrhujú tak zaradenie hladín týchto špecifických glykozylácií ako ďalších biomarkerov pre zlepšenie diagnostiky nádorových ochorení do budúcnosti [72,77,78].

Terapeutické protilátky

Vývoj monoklonálnych protilátok je jednou z najrýchlejšie sa vyvíjajúcich oblastí terapeutík [79]. S presadzovaním cieľ-



Obr. 4. Faktory ovplyvňujúce glykozyláciu protilátok a efekty týchto glykozylácií na štruktúru a funkciu protilátok.

Fab – fragment viažajúci antigén, ADCC – bunková cytotoxicita závislá na protilátkach, ADCP – bunková fagocytóza závislá na protilátkach, CDC – cytotoxicita závislá na komplemente

nej terapie rastie ponuka efektívnejších protilátok ako hlavných zástupcov biologickej liečby využiteľných pre čoraz širšie spektrum ochorení, čo podčiarkuje aj trend zvyšovania počtu pre terapiu schválených protilátok v posledných rokoch. V roku 2017 tento počet prvýkrát stúpol počet v EÚ a USA na dvojčiferné číslo (10) [80]. V novembri roku 2018 to bolo už 12 protilátok a ďalšie 4 boli v procese schvaľovania [81]. Glykozylácia ako modifikácia, ktorá významne vplyva na kvalitu protilátok, patrí k základným parametrom, ktoré je nutné analyzovať pri vývoji a produkcii biosimilárnych terapeutík [82] (tab. 2).

V mnohých prípadoch je produkcia monoklonálnych protilátok pre terapiu z hľadiska glykozylácie komplikovaná. Ako bolo spomenuté, väčšina Fc fragmentov ľudských IgG obsahuje komplexné bianténarne G0F, G1F a G2F s core-fukozyláciou a stopovými množstvami sialylovaných glykoforiem [83]. Pri produkcii protilátok v CHO bunkách

(izolovaných z čínskeho škrečka) sú vytvárané glykoformy prirodzene sa vyskytujúce na ľudskom IgG [84]. Myšie myelómové bunky (NS0 a SP2/0) však dokážu na rozdiel od CHO buniek pridať abnormálne sacharidy, ako N-glykolylnauramínovú kyselinu, ktoré môžu pôsobiť imunogénne [85]. Tieto odlišnosti v spektre glykoforiem však nemožno brať len ako problém. Myšia myelómová bunková línia YB2/0 dokáže produkovať rekombinantné protilátky s nízkym obsahom core-fukozylácie, čo môže mať za následok až 50násobne vyššiu ADCC aktivitu oproti produkcii v CHO bunkách [38]. Takisto kvasinky nedokážu vytvárať fukozylované štruktúry, ale zato tvoria hlavne vysokomanóзовé štruktúry, ktorých profil sa líši v závislosti na kmeni [86,87]. Vďaka genetickej modifikácii dokážu byť pre produkciu terapeutických Ig využité aj rastliny, kde boli vypnuté enzýmy tvoriace imunogénne glykoformy [88]. A tak ako je pre zníženie imunogénnosti nutná humanizácia

ich proteínovej zložky, sú v expresných systémoch pomocou génového inžinierstva vypnuté enzymatické dráhy tvoriace takéto glykoformy a naopak zosilnené dráhy tvoriace glykoformy s požadovanými vlastnosťami [89,90].

Významným parametrom terapeutických protilátok je ich farmakokinetika. V tomto procese je dôležitým mechanizmom najmä ich vychytávanie z obehu. Tento dej reguluje ich koncentráciu a tým pádom aj samotnú efektívnu terapiu. Vychytávanie glykozylovaných protilátok je sprostredkovaný niekoľkými proteínmi viažajúcimi oligosacharidy (receptormi). K najvýznamnejším patria v pečeni exprimovaný asialoglykoproteínový receptor (asialoglycoprotein receptor – ASGPR) a manóзовý receptor (manose receptor – ManR) [91,92]. ASGPR rozoznáva terminálnu galaktozyláciu bi-, tri- a tetraantenárnych glykoproteínov, zatiaľ čo ManR interaguje s oligomanóзовými a hybridnými glykánmi (glykány obsahujúce manóзовé a komplexné an-

tény). Glykoproteíny sú po väzbe endocytované a lyzované [93–95]. Ukázalo sa, že pre predĺženie dĺžky biologickej účinnosti glykoproteínov je významná terminálna sialylácia, ktorá blokuje alebo aspoň významne znižuje väzbu glykánov a teda aj protilátok na tieto receptory [96]. Samotná glykozylácia N297 u IgG nie je výraznejšie významná z hľadiska farmakokinetiky. Ako bolo spomenuté, sú to najčastejšie G0 resp. G1 štruktúry a nevykazujú silnejšiu afinitu k ASGPR [97,98]. Signifikantnejšie efekty na vychytávanie protilátok cez ich glykanové modifikácie však môžu vykazovať Fab glykozylácie, a to v závislosti na ich pozícii a sacharidovom zložení [43, 99].

Problémom využitia CHO a myších buniek sú protilátky, ktoré obsahujú vysoký podiel vysokomanozových glykoforiem [100]. Autori Goetze et al poukázali na to, že ich množstvo je z krvi odbúrané výrazne rýchlejšie a selektívne oproti glykoformám obsahujúcim terminálnu galaktózu alebo GlcNAc, ktoré si zachovávali konštantnú hladinu počas 34 dní po podaní [101]. To je spôsobené ManR receptormi makrofágov a dendritických buniek a aktiváciou dráhy manan viažajúceho lektínu [102].

Neglykozylované protilátky

V terapii však nemajú miesto len glykozylované protilátky. Pri liečbe niektorých ochorení protilátkami bez glykozylácie, akými sú napr. onartuzumab (MetMAB – používaný pri liečbe nemalobunkového karcinómu pľúc) alebo orelizumab (TRXA – diabetes mellitus typ 1), nie sú požadované aktivácie ADCC/CDC efektívnych funkcií, ale len neutralizácia, resp. anti/agonistické pôsobenie [103,104]. Neglykozylované protilátky majú porovnateľné dĺžky biologickej účinnosti ako glykozylované, ich výhodou je však rýchlejšia produkcia nižšími eukaryotmi alebo baktériami [105]. V prípade špecifických substitúcií v C_H2 a/alebo C_H3, ako napr. S298G/T299A, si dokážu zachovať schopnosť väzby určitých FcγR receptorov, ktorá je inak závislá na glykozyláci [106,107].

Záver

Protilátky nie sú len nevyhnutnými komponentami nášho imunitného systému,

ale aj modernými nástrojmi terapie závažných ochorení. Glykozylácie protilátok významne vplyvajú na ich funkciu (obr. 4). Medzi tieto procesy zaraďujeme najmä apoptózu, ADCC, ADCP či CDC. Obrovské množstvo zložiek, ktoré imunitný systém tvorí, však vytvára spletnosť signálnych dráh, a preto stále nie je poznanie ich presnej funkcie v prirodzených i v patologických procesoch dostatočne definované. Po odhalení funkcií jednotlivých glykozylácií či už za fyziologických alebo patologických podmienok bude umožnené navrhovať protilátky alebo aj Fc-fúzané preparáty [108] s glykozyláciami zabezpečujúcimi ešte cieľnejšiu a efektívnejšiu terapiu.

Literatúra

- Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, antibodies, and more. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 11(1): 137–154. doi: 10.2215/CJN.09430915.
- Woof JM, Burton DR. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(2): 89–99. doi: 10.1038/nri1266.
- Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125 (Suppl 2): S41–S52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- Sela-Culang I, Kunik V, Ofran Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. *Front Immunol* 2013; 4: 302. doi: 10.3389/fimmu.2013.00302.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(2): 239–245. doi: 10.1016/j.coi.2007.01.005.
- Jennewein MF, Alter G. The immunoregulatory roles of antibody glycosylation. *Trends Immunol* 2017; 38(5): 358–372. doi: 10.1016/j.it.2017.02.004.
- Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2014; 15(8): 707–716. doi: 10.1038/ni.2939.
- Mohorko E, Glockshuber R, Aebi M. Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *J Inher Metab Dis* 2011; 34(4): 869–878. doi: 10.1007/s10545-011-9337-1.
- Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(11): 2430–2437. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.001.
- Stanley P, Taniguchi N, Aebi M. N-glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al (eds). *Essentials of glycobiology*. New York: Cold Spring Harbor 2015: 99–111.
- Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2017; 6(9): 576–588. doi: 10.1002/psp4.12224.
- Hayes JM, Wormald MR, Rudd PM et al. Fc gamma receptors: glycobiology and therapeutic prospects. *J Inflamm Res* 2016; 9: 209–219. doi: 10.2147/JIR.S121233.
- Jefferis R, Lund J. Interaction sites on human IgG-Fc for FcγA: current models. *Immunol Lett* 2002; 82(1–2): 57–65. doi: 10.1016/s0165-2478(02)00019-6.
- Huhn C, Selman MH, Ruhaak LR et al. IgG glycosylation analysis. *Proteomics* 2009; 9(4): 882–913. doi: 10.1002/pmic.200800715.
- Arnold JN, Wormald MR, Sim RB et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 21–50. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702.

- Dekkers G, Treffers L, Plomp R et al. Decoding the human immunoglobulin G-glycan repertoire reveals a spectrum of Fc-receptor and complement-mediated effector activities. *Front Immunol* 2017; 8: 877. doi: 10.3389/fimmu.2017.00877.
- Li W, Zhu Z, Chen W et al. Crystallizable fragment glycoengineering for therapeutic antibodies development. *Front Immunol* 2017; 8: 1554. doi: 10.3389/fimmu.2017.01554.
- Krapp S, Mimura Y, Jefferis R et al. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol* 2003; 325(5): 979–989. doi: 10.1016/s0022-2836(02)01250-0.
- Ahmed AA, Giddens J, Pincetic A et al. Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *J Mol Biol* 2014; 426(18): 3166–3179. doi: 10.1016/j.jmb.2014.07.006.
- Borrok MJ, Jung ST, Kang TH et al. Revisiting the role of glycosylation in the structure of human IgG Fc. *ACS Chem Biol* 2012; 7(9): 1596–1602. doi: 10.1021/cb300130k.
- Shade KT, Anthony R. Antibody glycosylation and inflammation. *Antibodies* 2013; 2(3): 392–414. doi: 10.3390/antib2030392.
- Butler M, Quelhas D, Critchley AJ et al. Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis. *Glycobiology* 2003; 13(9): 601–622. doi: 10.1093/glycob/cwg079.
- Huffman JE, Pucic-Bakovic M, Klaric L et al. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13(6): 1598–1610. doi: 10.1074/mcp.M113.037465.
- Banda NK, Wood AK, Takahashi K et al. Initiation of the alternative pathway of murine complement by immune complexes is dependent on N-glycans in IgG antibodies. *Arthritis Rheum* 2008; 58(10): 3081–3089. doi: 10.1002/art.23865.
- Go MF, Schrohenloher RE, Tomana M. Deficient galactosylation of serum IgG in inflammatory bowel disease: correlation with disease activity. *J Clin Gastroenterol* 1994; 18(1): 86–87. doi: 10.1097/00004836-199401000-00021.
- Gudelj I, Salo PP, Trbojevic-Akmacic I et al. Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864(6): 2034–2039. doi: 10.1016/j.bbdis.2018.03.018.
- Tomana M, Schrohenloher RE, Reveille JD et al. Abnormal galactosylation of serum IgG in patients with systemic lupus erythematosus and members of families with high frequency of autoimmune diseases. *Rheumatol Int* 1992; 12(5): 191–194.
- Karsten CM, Pandey MK, Figge J et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIIb and dextrin-1. *Nat Med* 2012; 18(9): 1401–1406. doi: 10.1038/nm.2862.
- Peschke B, Keller CW, Weber P et al. Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves c1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. *Front Immunol* 2017; 8: 646. doi: 10.3389/fimmu.2017.00646.
- Anthony RM, Ravetch JV. A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol* 2010; 30 (Suppl 1): S9–S14. doi: 10.1007/s10875-010-9405-6.
- Seeling M, Bruckner C, Nimmerjahn F. Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13(10): 621–630. doi: 10.1038/nrrheum.2017.146.
- Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol* 2013; 13(3): 176–189. doi: 10.1038/nri3401.

33. Böhm S, Schwab I, Lux A et al. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. *Semin Immunopathol* 2012; 34(3): 443–453. doi: 10.1007/s00281-012-0308-x.
34. Shields RL, Lai J, Keck R et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ3 and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002; 277(30): 26733–26740. doi: 10.1074/jbc.M202069200.
35. Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E et al. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of Fcγ3a functional polymorphism. *Clin Cancer Res* 2004; 10(18 Pt 1): 6248–6255. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0850.
36. Ferrara C, Grau S, Jager C et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fcγ3 and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(31): 12669–12674. doi: 10.1073/pnas.1108455108.
37. Scanlan CN, Burton DR, Dwek RA. Making autoantibodies safe. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(11): 4081–4082. doi: 10.1073/pnas.0801192105.
38. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 2003; 278(5): 3466–3473. doi: 10.1074/jbc.M210665200.
39. van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T et al. The emerging importance of IgG Fc glycosylation in immunity. *J Immunol* 2016; 196(4): 1435–1441. doi: 10.4049/jimmunol.1502136.
40. Dunn-Walters D, Boursier L, Spencer J. Effect of somatic hypermutation on potential N-glycosylation sites in human immunoglobulin heavy chain variable regions. *Mol Immunol* 2000; 37(3–4): 107–113. doi: 10.1016/S0161-5890(00)00038-9.
41. Anumula KR. Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. *J Immunol Methods* 2012; 382(1–2): 167–176. doi: 10.1016/j.jim.2012.05.022.
42. Wright A, Tao MH, Kabat EA et al. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *EMBO J* 1991; 10(10): 2717–2723.
43. Coloma MJ, Trinh RK, Martinez AR et al. Position effects of variable region carbohydrate on the affinity and in vivo behavior of an anti-(1→6) dextran antibody. *J Immunol* 1999; 162(4): 2162–2170.
44. Leibiger H, Wustner D, Stigler RD et al. Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem J* 1999; 338(2): 529–538.
45. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012; 18(5): 693–704. doi: 10.1038/nm.2755.
46. Dorrington KJ, Bennis HH. Structure-function relationships in human immunoglobulin E. *Immunol Rev* 1978; 41: 3–25.
47. Arnold JN, Radcliffe CM, Wormald MR et al. The glycosylation of human serum IgD and IgE and the accessibility of identified oligomannose structures for interaction with mannan-binding lectin. *J Immunol* 2004; 173(11): 6831–6840. doi: 10.4049/jimmunol.173.11.6831.
48. Young RJ, Owens RJ, Mackay GA et al. Secretion of recombinant human IgE-Fc by mammalian cells and biological activity of glycosylation site mutants. *Protein Eng* 1995; 8(2): 193–199.
49. Nettleton MY, Kochan JP. Role of glycosylation sites in the IgE Fc molecule. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107(1–3): 328–329. doi: 10.1159/000237017.
50. Vercelli D, Helm B, Marsh P et al. The B-cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature* 1989; 338(6217): 649–651. doi: 10.1038/338649a0.
51. Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol* 2011; 4(6): 590–597. doi: 10.1038/mi.2011.39.
52. Woof JM, Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 2005; 206: 64–82. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00290.x.
53. Novak J, Julian BA, Mestecky J et al. Glycosylation of IgA1 and pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Immunopathol* 2012; 34(3): 365–382. doi: 10.1007/s00281-012-0306-z.
54. Moh ES, Lin CH, Thaysen-Andersen M et al. Site-specific N-glycosylation of recombinant pentameric and hexameric human IgM. *J Am Soc Mass Spectrom* 2016; 27(7): 1143–1155. doi: 10.1007/s13361-016-1378-0.
55. Colucci M, Stockmann H, Butera A et al. Sialylation of N-linked glycans influences the immunomodulatory effects of IgM on T cells. *J Immunol* 2015; 194(1): 151–157. doi: 10.4049/jimmunol.1402025.
56. Takahashi N, Tetaert D, Debuire B et al. Complete amino acid sequence of the delta heavy chain of human immunoglobulin D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(9): 2850–2854. doi: 10.1073/pnas.79.9.2850.
57. Pucić M, Knezević A, Vidić J et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10(10): M111. doi: 10.1074/mcp.M111.010090.
58. Kapur R, Kustiawan I, Vestreim A et al. A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood* 2014; 123(4): 471–480. doi: 10.1182/blood-2013-09-527978.
59. Menni C, Keser T, Mangino M et al. Glycosylation of immunoglobulin: role of genetic and epigenetic influences. *PLoS One* 2013; 8(12): e82558. doi: 10.1371/journal.pone.0082558.
60. Krištić J, Vučković F, Menni C et al. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69(7): 779–789. doi: 10.1093/gerona/glt190.
61. Ercan A, Kohrt WM, Cui J et al. Estrogens regulate glycosylation of IgG in women and men. *JCI Insight* 2017; 2(4): e89703. doi: 10.1172/jci.insight.89703.
62. Ruhaak LR, Uh HW, Beekman M et al. Decreased levels of bisecting GlcNAc glycoforms of IgG are associated with human longevity. *PLoS One* 2010; 5(9): e12566. doi: 10.1371/journal.pone.0012566.
63. van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH et al. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(6): R193. doi: 10.1186/ar2892.
64. Bondt A, Selman MH, Deelder AM et al. Association between galactosylation of immunoglobulin G and improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy is independent of sialylation. *J Proteome Res* 2013; 12(10): 4522–4531. doi: 10.1021/pr400589m.
65. Novokmet M, Lukic E, Vuckovic F et al. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci Rep* 2014; 4: 4347. doi: 10.1038/srep04347.
66. Troelsen LN, Jacobsen S, Abrahams JL et al. IgG glycosylation changes and MBL2 polymorphisms: associations with markers of systemic inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2012; 39(3): 463–469. doi: 10.3899/jrheum.110584.
67. Pezer M, Stambuk J, Perica M et al. Effects of allergic diseases and age on the composition of serum IgG glycome in children. *Sci Rep* 2016; 6: 33198. doi: 10.1038/srep33198.
68. de Jong SE, Selman MH, Adegnik AA et al. IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation. *Sci Rep* 2016; 6: 28207. doi: 10.1038/srep28207.
69. Mittermayr S, Le GN, Clarke C et al. Polyclonal immunoglobulin G N-glycosylation in the pathogenesis of plasma cell disorders. *J Proteome Res* 2017; 16(2): 748–762. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00768.
70. Kodar K, Stadlmann J, Klaamas K, Sergeyev B, Kurtenkov O. Immunoglobulin G Fc N-glycan profiling in patients with gastric cancer by LC-ESI-MS: relation to tumor progression and survival. *Glycoconj J* 2012; 29(1): 57–66. doi: 10.1007/s10719-011-9364-z.
71. Bones J, Mittermayr S, O'Donoghue N et al. Ultra performance liquid chromatographic profiling of serum N-glycans for fast and efficient identification of cancer associated alterations in glycosylation. *Anal Chem* 2010; 82(24): 10208–10215. doi: 10.1021/ac102860w.
72. Kanoh Y, Mashiko T, Danbara M et al. Analysis of the oligosaccharide chain of human serum immunoglobulin G in patients with localized or metastatic cancer. *Oncology* 2004; 66(5): 365–370. doi: 10.1159/000079484.
73. Arnold JN, Saldova R, Galligan MC et al. Novel glycan biomarkers for the detection of lung cancer. *J Proteome Res* 2011; 10(4): 1755–1764. doi: 10.1021/pr101034t.
74. Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F et al. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* 2008; 9(11): 1225–1235. doi: 10.1038/ni.1655.
75. Vuckovic F, Theodoratou E, Thaci K et al. IgG glycome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22(12): 3078–3086. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1867.
76. Theodoratou E, Thaci K, Agakov F et al. Glycosylation of plasma IgG in colorectal cancer prognosis. *Sci Rep* 2016; 6: 28098. doi: 10.1038/srep28098.
77. Kanoh Y, Ohara T, Tadano T et al. Changes to N-linked oligosaccharide chains of human serum immunoglobulin G and matrix metalloproteinase-2 with cancer progression. *Anticancer Res* 2008; 28(2A): 715–720.
78. Qian Y, Wang Y, Zhang X et al. Quantitative analysis of serum IgG galactosylation assists differential diagnosis of ovarian cancer. *J Proteome Res* 2013; 12(9): 4046–4055. doi: 10.1021/pr4003992.
79. Beck A, Wurch T, Bailly C et al. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(5): 345–352. doi: 10.1038/nri2747.
80. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2018. *MAbs* 2018; 10(2): 183–203. doi: 10.1080/19420862.2018.1415671.
81. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *MAbs* 2019; 11(2): 219–238. doi: 10.1080/19420862.2018.1556465.
82. Kirchoff CF, Wang XM, Conlon HD et al. Biosimilars: key regulatory considerations and similarity assessment tools. *Biotechnol Bioeng* 2017; 114(12): 2696–2705. doi: 10.1002/bit.26438.
83. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog* 2005; 21(1): 11–16. doi: 10.1021/bp40016j.
84. Raju S. Glycosylation variations with expression systems and their impact on biological activity of therapeutic immunoglobulins. *BioProcess International* 2003; 1: 44–53.
85. Yoo EM, Chintalacharuvu KR, Penichet M et al. Myeloma expression systems. *J Immunol Methods* 2002; 261(1–2): 1–20. doi: 10.1016/S0022-1759(01)00559-2.
86. Liu CP, Tsai TI, Cheng T et al. Glycoengineering of antibody (Herceptin) through yeast expression and in vitro enzymatic glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(4): 720–725. doi: 10.1073/pnas.1718172115.
87. Li H, Sethuraman N, Stadheim TA et al. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* 2006; 24(2): 210–215. doi: 10.1038/nbt1178.
88. Durocher Y, Butler M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(6): 700–707. doi: 10.1016/j.copbio.2009.10.008.
89. Ha S, Wang Y, Rustandi RR. Biochemical and biophysical characterization of humanized IgG1 produced in *Pichia pastoris*. *MAbs* 2011; 3(5): 453–460. doi: 10.4161/mabs.3.5.16891.

90. Sehn LH, Assouline SE, Stewart DA et al. A phase 1 study of obinutuzumab induction followed by 2 years of maintenance in patients with relapsed CD20-positive B-cell malignancies. *Blood* 2012; 119(22): 5118–5125. doi: 10.1182/blood-2012-02-408773.
91. Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 1982; 51: 531–554. doi: 10.1146/annurev.bi.51.070182.002531.
92. Mi Y, Lin A, Fiete D et al. Modulation of mannose and asialoglycoprotein receptor expression determines glycoprotein hormone half-life at critical points in the reproductive cycle. *J Biol Chem* 2014; 289(17): 12157–12167. doi: 10.1074/jbc.M113.544973.
93. Baenziger JU, Fiete D. Galactose and N-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes. *Cell* 1980; 22(2 Pt 2): 611–620. doi: 10.1016/0092-8674(80)90371-2.
94. Park EI, Manzella SM, Baenziger JU. Rapid clearance of sialylated glycoproteins by the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 2003; 278(7): 4597–4602. doi: 10.1074/jbc.M210612200.
95. Taylor ME, Drickamer K. Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 1993; 268(1): 399–404.
96. Zhou Q, Qiu H. The mechanistic impact of N-glycosylation on stability, pharmacokinetics, and immunogenicity of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2019; 108(4): 1366–1377. doi: 10.1016/j.xphs.2018.11.029.
97. Liu L, Stadheim A, Hamuro L et al. Pharmacokinetics of IgG1 monoclonal antibodies produced in humanized *Pichia pastoris* with specific glycoforms: a comparative study with CHO produced materials. *Biologicals* 2011; 39(4): 205–210. doi: 10.1016/j.biologicals.2011.06.002.
98. Leabman MK, Meng YG, Kelley RF et al. Effects of altered Fcγ₃R binding on antibody pharmacokinetics in cynomolgus monkeys. *MAbs* 2013; 5(6): 896–903. doi: 10.4161/mabs.26436.
99. Endo T, Wright A, Morrison SL et al. Glycosylation of the variable region of immunoglobulin G-site specific maturation of the sugar chains. *Mol Immunol* 1995; 32(13): 931–940. doi: 10.1016/0161-5890(95)00078-s.
100. Mimura Y, Katoh T, Saldova R et al. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell* 2018; 9(1): 47–62. doi: 10.1007/s13238-017-0433-3.
101. Goetze AM, Liu YD, Zhang Z et al. High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology* 2011; 21(7): 949–959. doi: 10.1093/glycob/cwr027.
102. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM et al. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med* 1995; 1(3): 237–243.
103. Ju MS, Jung ST. Aglycosylated full-length IgG antibodies: steps toward next-generation immunotherapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 2014; 30: 128–139. doi: 10.1016/j.copbio.2014.06.013.
104. Jung ST, Kang TH, Kelton W et al. Bypassing glycosylation: engineering aglycosylated full-length IgG antibodies for human therapy. *Curr Opin Biotechnol* 2011; 22(6): 858–867. doi: 10.1016/j.copbio.2011.03.002.
105. Simmons LC, Reilly D, Klimowski L et al. Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J Immunol Methods* 2002; 263(1–2): 133–147. doi: 10.1016/S0022-1759(02)00036-4.
106. Sazinsky SL, Ott RG, Silver NW et al. Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(51): 20167–20172. doi: 10.1073/pnas.0809257105.
107. Jung ST, Reddy ST, Kang TH et al. Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind Fcγ₃R potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(2): 604–609. doi: 10.1073/pnas.0908590107.
108. Jafari R, Zolbanian NM, Rafatpanah H et al. Fc-fusion proteins in therapy: an updated view. *Curr Med Chem* 2017; 24(12): 1228–1237. doi: 10.2174/0929867324666170113112759.
109. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2003; 63(8): 803–843. doi: 10.2165/00003495-200363080-00005.
110. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* 2010; 47(2): 115–123. doi: 10.1053/j.seminhematol.2010.01.011.
111. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2335–2342. doi: 10.1056/NEJMoa032691.
112. Velcheti V, Viswanathan A, Govindan R. The proportion of patients with metastatic non-small cell lung cancer potentially eligible for treatment with bevacizumab: a single institutional survey. *J Thorac Oncol* 2006 Jun; 1(5): 501.
113. von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M et al. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(4): 299–309. doi: 10.1056/NEJMoa1111065.
114. Gibiansky L, Sutjandra L, Doshi S et al. Population pharmacokinetic analysis of denosumab in patients with bone metastases from solid tumours. *Clin Pharmacokinet* 2012; 51(4): 247–260. doi: 10.2165/11598090-000000000-00000.
115. de Weers M, Tai YT, van der Veer MS et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol* 2011; 186(3): 1840–1848. doi: 10.4049/jimmunol.1003032.
116. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007; 357(20): 2040–2048. doi: 10.1056/NEJMoa071834.
117. Bonner JA, Harari PM, Giralt J et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 354(6): 567–578. doi: 10.1056/NEJMoa053422.
118. Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res* 2014; 16(2): 209. doi: 10.1186/bcr3621.
119. Verma S, Miles D, Gianni L et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 367(19): 1783–1791. doi: 10.1056/NEJMoa1209124.
120. Boyerinas B, Jochems C, Fantini M et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of a novel anti-PD-L1 antibody avelumab (MSB0010718C) on human tumor cells. *Cancer Immunol Res* 2015; 3(10): 1148–1157. doi: 10.1158/2326-6066.CCR-15-0059.
121. Nahta R, Hung MC, Esteva FJ. The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(7): 2343–2346.
122. Swain SM, Baselga J, Kim SB et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(8): 724–734. doi: 10.1056/NEJMoa1413513.
123. Dienstmann R, Tabernero J. Necitumumab, a fully human IgG1 mAb directed against the EGFR for the potential treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11(12): 1434–1441.
124. Garnock-Jones KP. Necitumumab: first global approval. *Drugs* 2016; 76(2): 283–289. doi: 10.1007/s40265-015-0537-0.
125. Ribas A, Hamid O, Daud A et al. Association of pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma. *JAMA* 2016; 315(15): 1600–1609. doi: 10.1001/jama.2016.4059.
126. Borcoman E, Le Tourneau C. Pembrolizumab in cervical cancer: latest evidence and clinical usefulness. *Ther Adv Med Oncol* 2017; 9(6): 431–439. doi: 10.1177/1758834017708742.
127. Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 378(22): 2078–2092. doi: 10.1056/NEJMoa1801005.
128. Markham A, Duggan S. Cemiplimab: first global approval. *Drugs* 2018; 78(17): 1841–1846. doi: 10.1007/s40265-018-1012-5.
129. Migden MR, Rischin D, Schmulds CD et al. PD-1 blockade with cemiplimab in advanced cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2018; 379(4): 341–351. doi: 10.1056/NEJMoa1805131.

Výskum ubikvitinácie proteínov v onkológii

Protein Ubiquitination Research in Oncology

Faktor J., Pjechová M., Hernychová L., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Súhrn

Východiská: Ubikvitinácia je dôležitá posttranslačná modifikácia proteínov, ktorá reguluje mnoho signalizačných dráh u eukaryot. Aberantná ubikvitinácia je molekulárnou príčinou niektorých onkologických, neurodegeneratívnych, imunitných a kardiovaskulárnych ochorení. Rozvoj hmotnostne spektrometrických metód ponúka možnosť kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy ubikvitinácie proteínov v biologickom materiáli onkologických pacientov. Výskum ubikvitinácie môže objasniť molekulárnu príčinu zmeny hladiny niektorých proteínov, ktoré vystupujú ako onkogény alebo tumor supresory. **Cieľ:** Cieľom článku je priblížiť čitateľovi zmysel a dôležitosť ubikvitinácie v niektorých molekulárnych procesoch prebiehajúcich v ľudskom tele. Predovšetkým je dôraz kladený na popis zapojenia ubikvitinácie do malígnych procesov. Na literárnu rešerš nadväzujeme priblížením procesu hmotnostne spektrometrickej identifikácie ubikvitinácií prostredníctvom diglycylových zbytkov v sekvencii proteínu CHIP. Predstavujeme identifikáciu ubikvitinácie proteínov metódami tandemovej hmotnostnej spektrometrie, proces validácie tandemových hmotnostných spektier a popis časovej závislosti ubikvitinácie proteínu CHIP. **Záver:** Literárna rešerš oboznamuje čitateľa so známymi aberantnými mechanizmami ubikvitinácie u malígnych ochorení. Úspešne vytvorená hmotnostne spektrometrická metóda môže slúžiť na identifikáciu pozícií ubikvitinácie v sekvenciách proteínov obsiahnutých v lyzátoch nádorového tkaniva.

Klíčové slová

ubikvitin – hmotnostná spektrometria – neoplazmy – proteín – proteomika

Summary

Background: Ubiquitination is a vital posttranslational protein modification involved in the regulation of many eukaryotic signalling pathways. Aberrant ubiquitin signalling is known to be a molecular causality of certain cancer, neurodegenerative, immune system or cardiovascular diseases. The recent development of mass spectrometry methods enables qualitative and quantitative ubiquitination analysis in biological material from cancer patients. Research of ubiquitination may clarify the molecular cause of aberrant changes in the protein level of tumour suppressors or oncogenes. **Purpose:** We aim to explain the meaning and importance of ubiquitination in certain molecular processes taking place in the human body. We hereby emphasise the connection between ubiquitination and malignant processes. A literature search is followed by introducing our mass spectrometry platform intended for ubiquitin identification via diglycyl remnants in the CHIP protein sequence. The aim is to introduce tandem mass spectrometry identification of ubiquitin modification, ubiquitination tandem mass spectra validation and the time-dependent manner of CHIP ubiquitination to the reader. **Conclusion:** A literature search familiarises the reader with known mechanisms of aberrant ubiquitination in malignant diseases. A successfully optimised mass spectrometry platform could serve as a potent tool for determining ubiquitin position in proteins that are a part of real tumour samples.

Key words

ubiquitin – mass spectrometry – neoplasms – proteins – proteomics

Práca bola podporená projektom MŠMT – NPU I – LO1413 a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the project 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 recommendation for biomedical papers.



Mgr. Jakub Faktor, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: jakub.faktor@mou.cz

Obdržané/Submitted: 14. 6. 2019

Prijaté/Accepted: 27. 8. 2019

doi: 10.14735/amko20193556

Úvod

Ubikvitín je krátky polypeptid (8,6 kDa) vyskytujúci sa takmer u všetkých eukaryotických organizmov [1]. Väzba ubikvitínu na proteín prebieha procesom ubikvitinácie, ktorá bola objavená už začiatkom 80. rokov minulého storočia [2]. Popis súvislostí medzi ubikvitináciou a proteostázou bol základom pre ďalšie objavy, ktoré v roku 2004 vyústili v udeľenie Nobelovej ceny Aaronovi Ciechanoverovi, Avramovi Hershkovi a Irwinovi Rosemu za objasnenie mechanizmu degradácie proteínov ubikvitináciou [3].

Ubikvitinácia je charakteristická pripojením C-konca ubikvitínu kovalentnou izopeptidickou väzbou k ϵ -amino skupine cieľového lyzínového zbytku v sekvencii proteínu [4]. Jedná sa o sofistický viacstupňový ATP-dependný proces katalyzovaný tromi skupinami enzýmov, E1, E2 a E3 ligázami. V prvom kroku dochádza k tvorbe thio-esterovej väzby medzi ubikvitínom a enzýmom E1 (ubiquitin activating enzyme). Tvorba komplexu E1-ubikvitín umožňuje tvorbu thio-esterovej väzby medzi enzýmom E2 (ubiquitin conjugating enzyme) a ubikvitínom. Následne je potrebná E3 ubikvitín ligáza, ktorá zaručí väzbu ubikvitínu na špecifické miesta v sekvencii modifikovaného proteínu [5]. Špecifita ubikvitinácie môže byť modulovaná posttranslačnými modifikáciami E2, E3 ubikvitín ligáz. Význam ubikvitinácie závisí tiež na posttranslačných modifikáciách samotného ubikvitínu a na umiestnení modifikácie v sekvencii proteínu [6,7], existuje teda akýsi „ubikvitínový kód“ [8].

Cieľom nášho výskumu je popis ubikvitínového kódu proteínu CHIP. Vzhľadom k prítomnosti množstva potencionálnych ubikvitináčnych miest v sekvencii CHIP možno predpokladať autoubikvitináciu v rôznych doménach proteínu v závislosti na stave organizmu. Analýza ubikvitinácie proteínu CHIP za rôznych podmienok pomôže odhaliť preferenčné miesta ubikvitinácie v sekvencii, ktoré môžu súvisieť aj s aktivitou niektorých proteínov zapojených v onkogénnych signalizačných dráhach. K výskumu ubikvitinácie sme vytvorili metódu tandemovej hmotnostnej spektrometrie (liquid chromatography tandem-mass

spectrometry – LC-MS/MS) na identifikáciu diglycylových (GlyGly) zbytkov ubikvitínu na lyzínach a jej funkčnosť sme overili sledovaním autoubikvitinácie E3 ubikvitín ligázy CHIP za rôznych podmienok. Skúmali sme aj efekt prídavku ATP do reakčnej zmesi a časový priebeh ubikvitinácie proteínu CHIP.

„Ubikvitínový kód“ – modulácia významu ubikvitinácie

K posttranslačnej modifikácii jedinou molekulou ubikvitínu dochádza zriedka, cieľové proteíny sú väčšinou polyubikvitinované. Ubikvitín môže byť ďalej ubikvitinovaný na siedmych zbytkoch lyzínu a topológia polyubikvitinácie môže vytvárať komplexné vzorce s rôznym významom. Aktivita polyubikvitinácie je závislá na ich štruktúre a na množstve ubikvitínov [9]. Najfrekvencovanejšia je ubikvitinácia na Lys48 predurčujúca proteín k degradácii v proteazóme procesmi proteolýzy. Bolo dokázané, že najmenej štyri molekuly ubikvitínu musia byť pripojené k lyzínovému zbytku, aby bol rozpoznávaný 26S proteazómom [10]. Polyubikvitinácia na Lys63 aktivuje neproteolytické procesy súvisiace s internalizáciou membránových proteínov, odozvou imunitného systému, moduláciou aktivity kináz a fosfatáz zapojených aj v procesoch karcinogenézy [11,12]. Významný je popis polyubikvitinácie Met1, ktorý spája (lineárnu) polyubikvitináciu s aktiváciou dráhy NF- κ B (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells), ktorá rovnako zohráva dôležitú úlohu v karcinogenéze [13,14].

Ubikvitinácia v súvislosti s karcinogézou

Ubikvitinácia je úzko spätá s onkologickými ochoreniami, kde zohráva duálnu rolu. Deregulácia E2 a E3 ubikvitín ligáz všeobecne významným spôsobom prispieva k aberantnej ubikvitinácii, čo v mnohých prípadoch vedie k iniciácii a k progresii malígnych ochorení [15]. Medzi E2 ubikvitín ligázy so známou úlohou v kontrole procesov progresie bunecného cyklu patrí UBE2N/UBE2V1 enzým, ktorý katalyzuje polyubikvitináciu na Lys63. Aberantná polyubikvitinácia na Lys63 spúšťa aberantnú signalizáciu NF- κ B, ktorá u ma-

márneho karcinómu môže viesť k hyperaktivácii zápalu v makroprostredí nádoru [16,17].

E2 ubikvitín ligáza E2-EPF UCP zodpovedá za degradáciu E3 ubikvitín ligázy VHL (von Hippel-Lindau), ktorá destabilizuje transkripčné faktory zapojené v angiogenéze a metastázovaní – vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF), matrixové metaloproteinázy (MMP) a hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) [18,19]. Ďalším dobre popísaným príkladom je zapojenie E3 ubikvitín ligázy GP78 do metastázovania sarkómov. Knock-down GP78 vedie k zníženej ubikvitinácii a akumulácii nádorového supresoru KAI1, ktorý navodzuje apoptózu rakovinových buniek a regresiu sarkómov [20]. Inhibícia expzie, príp. inhibícia aktivity GP78 u metastatických sarkómov, by mohla viesť k inhibícii metastázovania sarkómov do pľúc.

E3 ubikvitín ligáza HUWE1 reguluje bunecnú adhéziu cez proteín TIAM1, ktorý sprostredkováva prepojenia medzi bunkami. Overexpzia HUWE1 spôsobuje aberantnú ubikvitináciu a degradáciu proteínu TIAM1, čo zvyšuje invazivitu a metastatický potenciál buniek [21].

Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)

Proteín CHIP spája chaperónový systém s ubikvitín-proteazómovým systémom. Skladá sa z troch tetratricopeptidových domén s chaperónovou funkciou, coiled-coil domény a z U-box domény s E3 ubikvitín ligázovou aktivitou (obr. 1). U-box interaguje s UbcH4/UbcH5 proteínmi s E2 ligázovou aktivitou, tým je umožnená ubikvitinácia nesprávne zložených proteínov [22].

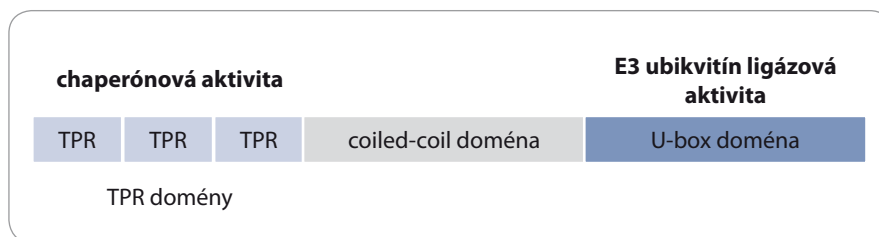
CHIP je zapojený do procesov charakteristických abnormálnou produkciou proteínov, ktoré môžu byť súčasťou onkogénnych signalizačných dráh. CHIP má duálnu rolu a môže vystupovať ako tumor supresor alebo ako onkogén. Tumor supresorová funkcia proteínu CHIP bola objavená u mnohých nádorov, kde ubikvitinácia onkogénov ako napr. *c-myc*, *SRC-3*, *HIF-1 α* , *ERBB2*, *EGFR*, a *NF- κ B* vedie k ich down-regulácii [23–28]. *In vivo* a *in vitro* štúdiami karcinómu pankreasu bolo dokázané, že zvýšenie hladiny proteínu CHIP

vedie k inhibícii metastázovania a rastu nádoru, zatiaľ čo knock-down proteínu CHIP spôsobuje metastatický zvrät. Ďalej bolo dokázané, že CHIP ubikvitináciou znižuje hladinu *EGFR*, čím inhibuje aberantné dráhy zapojené v malígnych procesoch [27]. U neskorých štádií kolorektálneho karcinómu je promótor proteínu CHIP hypermetetylovaný, čo prispieva k jeho významnej downregulácii a zvýšenej aktivite NF- κ B signalizácie [28]. Ďalej CHIP v úlohe tumor supresoru môže inhibovať IL8 indukovanú angiogénu prostredníctvom ubikvitinácie NF- κ B/p65 [29].

Na druhej strane viaceré publikácie popisujú zapojenie proteínu CHIP v degradácii tumor supresorových proteínov. CHIP teda možno považovať aj za onkogén. Tumor supresorový proteín FOXO indukovaný proteínom TNF α podlieha degradácii ubikvitináciou sprostredkovanou proteínom CHIP [30]. CHIP je zapojený aj do regulácie tumor supresorov spojených s apoptózou, medzi ktoré patrí hlavne p53, AIF a IRF-1 [31–33]. Úloha proteínu CHIP v onkogénnej signalizácii je komplikovaná a závisí na mnohých aspektoch. CHIP má vplyv na rôzne substráty, ale ich preferencia nie je dostatočne popísaná. Analýza ubikvitinácie proteínu CHIP za rôznych podmienok môže objasniť mechanizmy jeho účinku vplyvajúce na stabilitu proteínov zapojených v onkogénnych signalizačných dráhach.

Analýza ubikvitinácie hmotnostnou spektrometriou

V súčasnej dobe nachádzajú vo výskume ubikvitinácie veľmi dobré uplatnenie metódy hmotnostnej spektrometrie a imunochemické metódy, ktoré možno spolu kombinovať [34,35]. Hmotnostne spektrometrická analýza vychádza z predpokladu, že trypsin počas proteomickej prípravy vzorky neštiepi proteínovú sekvenciu v pozícii lyzínu modifikovaného ubikvitínom. V peptidovom digeste teda získavame tryptické peptidy s vynechaným štiepnym miestom za lyzíni nesúcimi GlyGly pochádzajúcim z ubikvitínu. Metódou LC-MS/MS možno určiť pozíciu ubikvitinácie v reťazci peptidu/proteínu a z výsledku možno predpokladať aj jej biologickú úlohu [36].



Obr. 1. Funkčné domény proteínu CHIP. Proteín CHIP sa skladá z troch TPR domén, z coiled-coil domény a z U-box domény. TPR domény majú chaperónovú funkciu a U-box doména má E3 ubikvitín ligázovú aktivitu. Proteín CHIP spája E3 ubikvitín ligázovú aktivitu s chaperónovou aktivitou.

TPR – tetra-tricopeptidová doména

Identifikácia ubikvitinovaných peptidov/proteínov je však pomerne komplikovaná kvôli ich nízkemu zastúpeniu vo vzorke. Dôvodom je rýchla degradácia ubikvitinovaných proteínov a nízka stechiometria modifikácie. Robustná platforma na LC-MS/MS identifikáciu endogénnej ubikvitinácie by mala obsahovať techniku špecificky obohacujúcu vzorku o peptidy nesúce GlyGly zbytok po proteolytickej digescii. Úspešnosť identifikácie ubikvitinovaných miest sa všeobecne zlepšila po komercializácii protilátok špecifických proti GlyGly zbytkom na lyzínoch. Imunochemickým obohatením vzorky o GlyGly modifikované peptidy možno izolovať a identifikovať ubikvitinované miesta v biologických vzorkách ako napr. bunecný lyzát alebo tkanivový lyzát [37,38]. Alternatívne možno použiť protilátku špecifickú proti intaktnému ubikvitínu alebo ubikvitín značený afinitnými značkami ako napr. hemagglutínin (HA), polyhistidín (His₆) alebo glutathion S transferáza (GST) [39–42]. Týmto spôsobmi možno obohatiť vzorku o ubikvitinované proteíny ešte pred zahájením proteolytického štiepenia [39].

K dokonalejšiemu popisu úlohy ubikvitinácie môže prispieť aj rozvoj hmotnostne spektrometrických metód umožňujúcich kvantifikáciu proteínov. Dá sa predpokladať, že kvantitatívne metódy hmotnostnej spektrometrie môžu určiť kvantitu ubikvitinovaného proteínu/peptidu, čo by umožnilo dynamicky sledovať vývoj zmeny modifikácie v čase, príp. medzi dvoma stavmi (tumor vs. zdravá kontrola). Týmto spôsobom možno dynamicky popísať molekulárnu príčinu onkologického ochorenia, príp.

stratifikovať onkologických pacientov na základe molekulárnej príčiny ochorenia.

Materiály a metódy

Ubikvitinácia reakcia

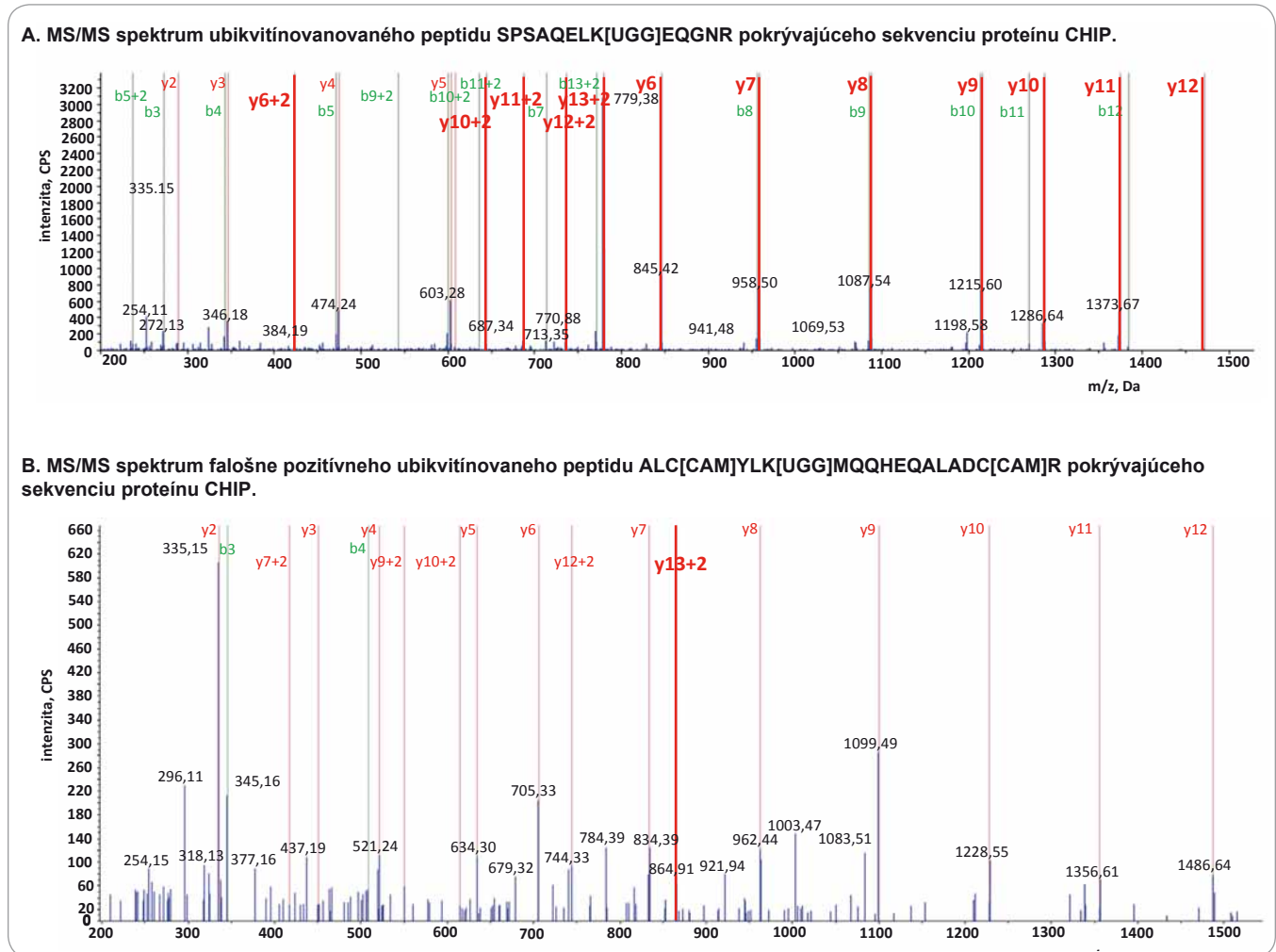
Ubikvitinácia reakcia *in vitro* bola uskutočnená v roztoku zloženom z 27 mM Hepes (pH 8,0), 6,5 mM MgCl₂, 0,543 mM DTT, 3,26 mM ATP (kontrolné vzorky boli pripravené bez ATP), 100 nM Ube1 (E1), 1 μ M UbCH5 α (E2), 3,2 μ g CHIP s His-tagom a 2 μ g ubikvitínu. Reakcia bola uskutočnená v intervaloch 5, 20 a 40 min, potom bola zastavená.

Štiepenie proteínov v roztoku

Proteíny boli 5 min sonifikované, následne bolo pridaných 2,5 μ l 200 mM dithiothreitolu a zmes bola kultivovaná pri 37 °C počas 1 hod. Alkylácia proteínov bola uskutočnená prídavkom 2,5 μ l 200 mM jodoacetamidu počas 30 min pri izbovej teplote v temne. Prebytočný jodoacetamid bol odstránený prídavkom 2,5 μ l 200 mM dithiothreitolu pri 37 °C, 15 min. Digescia proteínov na peptidy prebehla za účasti trypsinu (Promega, USA), ktorý bol pridaný v pomere 1 : 100 (enzým : proteín). Proteolytické štiepenie prebiehalo pri 37 °C cez noc. Vzorky boli odsolené podľa Bouchala et al [43].

Parametre LC-MS/MS merania proteínových digestov

LC-MS/MS analýza bola uskutočnená postupom inšpirovaným Faktor et al [44]. V skratke, peptidy boli separované na kvapalinovom chromatografe Eksigent ekspert™ nanoLC 400 (SCIEX, USA), ktorý bol priamo spojený s MS systémom TripleTOF 5600+ (SCIEX,



Obr. 2. Fragmentačné spektrum peptidu SPSAQLK[UGG]EQGNR (A) a fragmentačné spektrum peptidu ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R (B) so zvýraznenými produktovými iónami potvrdzujúcimi prítomnosť GlyGly modifikácie na lýzíne. Fragmentačné spektrum A naznačuje, že Lys8 nesie GlyGly zbytok ubikvitínu. V produktových iónoch y6–y12 dochádza k charakteristickému posunu m/z o +114 Da (GlyGly zbytok). Rovnaký posun m/z možno sledovať aj v b sérii produktových iónov (b8–b12) indikujúci prítomnosť GlyGly zbytku ubikvitínu. Fragmentačné spektrum B obsahuje len jeden produktový ión potvrdzujúci modifikáciu GlyGly. Ubikvitinácia peptidu ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R nebola potvrdená, keďže jediný charakteristický produktový ión s posunom +114 Da môže pochádzať z iného kofragmentovaného prekurzorového iónu.

MS/MS – tandemová hmotnostná spektrometria, CPS – counts per second

Canada). Peptidy boli zachytené a odsolené na trap kolóne μ -precolumn, 30 μ m i.d., 5 mm dĺžka, C18 PepMap 100, 5 μ m veľkosť častíc, 100 Å veľkosť pórov (Thermo Scientific, USA). Následne boli peptidy eluované na analytickú emitrovú kolónu 75 μ m \times 250 mm PicoFrit® (New Objective, USA) s náplňou ProntoSIL 120-3-C18 AQ, 3 μ m častice (Bischoff, Nemecko). Mobilná fáza A bola zložená z 0,1 % (v/v) kyseliny mravčej v H₂O a mobilná fáza B z 0,1 % (v/v) kyseliny mravčej v acetonitrile. Elúcia z analytickej kolóny začínala na 5 % mobilnej fázy B počas 30 min. Percentuálny podiel

mobilnej fázy lineárne stúpala na 40 % B počas 120 min a v nasledujúcich 5 min vzrástol až na 80 % B, na hodnote 80 % B zostal počas 5 min následne podiel mobilnej fázy B lineárne klesal na 5 % počas 2 min. Podiel mobilnej fázy B zostal na hodnote 2 % počas ďalších 28 min.

Hmotnostný spektrometer TripleTOF 5600+ pracoval v dáta dependentnom móde. TOF-MS spektrum (akumulatívny čas 250 ms) bolo zamerané v každom cykle nasledované fragmentáciou 20 najintenzívnejších prekurzorových iónov a ukončené zmeraním spektrier ich produktových iónov. Minimálna

intenzita prekurzorového iónu bola nastavená na hodnotu 50 cps (counts per second) a čas exklúzie na hodnotu 12 s. Akumulatívny čas prekurzorového iónu bol 100 ms.

Analýza LC-MS/MS dát

Analýza LC-MS/MS dát prebehla v programe ProteinPilot 4.5 (SCIEX, Canada). Parametre prehľadávania boli nastavené nasledovne: proteáza – trypsin, fixné modifikácie – karbamidomethyl na cysteíne, prehľadávanie s dôrazom na identifikáciu ubikvitinácie, prehľadávací databáza – Uniprot+Swissprot

Obr. 3. Zoznamy produktových iónov reprezentujúcich dva vybrané peptidy z proteínu CHIP nesúce GlyGly zbytok. Na základe identifikácie prehľadovacím algoritmom ProteinPilot 4.5.0.0. bola obom peptidom pridelená vysoká peptidová konfidencia (pep. konfidencia > 99 %). Zelenou farbou sú vyznačené produktové ióny spoľahlivo identifikované v fragmentačnom spektre tandemovej hmotnostnej spektrometrie. Červenou farbou sú podčiarknuté iba produktové ióny, ktoré potvrdzujú GlyGly zbytok v peptide a zahrňujú charakteristický posun m/z o 114 Da (zbytok GlyGly).

A. Peptid SPSAQLK[UGG]EQGNR s 21 produktovými iónmi potvrdzujúcimi prítomnosť GlyGly zbytku na Lys 8.

Zbytok	b	b +2	y	y +2
S	88.0393	44.5233	1557.7616	779.3844
P	185.0921	93.0497	1470.7295	735.8684
S	272.1241	136.5657	1373.6768	687.3420
A	343.1612	172.0842	1286.6448	643.8260
Q	471.2198	236.1135	1215.6076	608.3075
E	600.2624	300.6348	1087.5491	544.2782
L	713.3464	357.1769	958.5065	479.7569
K[UGG]	955.4843	478.2458	845.4224	423.2148
E	1084.5269	542.7671	603.2845	302.1459
Q	1212.5859	606.7964	474.2419	237.6246
G	1269.6070	635.3071	346.1833	173.5953
N	1383.6499	629.3286	289.1619	145.0846
R	1539.7510	770.3791	175.1190	88.0631

B. Peptid ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R s jedným produktovým iónom potvrdzujúcim prítomnosť GlyGly zbytku na Lys 6. Z tabuľky je zrejmé, že peptidová konfidencia nereflexuje pravdepodobnosť prítomnosti GlyGly zbytku v sekvencii peptidu, a že fragmentačné spektrá modifikovaných peptidov je nutné po identifikácii skontrolovať.

Zbytok	b	b +2	y	y +2
A	72.0444	36.5258	2349.0897	1175.0485
L	185.1285	93.0679	2278.0526	1139.5299
C[CAM]	345.1591	173.0832	2164.9685	1082.9879
Y	508.2224	254.6149	2004.9378	1002.9726
L	621.3065	311.1569	1841.8745	921.4409
K[UGG]	863.4444	432.2258	1728.7904	864.8989
M	994.4849	497.7461	1486.6526	743.8299
Q	1122.5434	561.7754	1355.6121	678.3097
Q	1250.6020	625.8047	1227.5535	614.2804
H	1387.6609	694.3341	1099.4949	550.2511
E	1516.7035	758.8554	962.4360	481.7216
Q	1644.7621	822.8847	833.3934	417.2003
A	1715.7992	858.4032	705.3348	353.1711
L	1828.8833	914.9453	634.2977	317.6525
A	1899.9204	950.4638	521.2137	261.1105
D	2014.9473	1007.9773	450.1765	225.5919
C[CAM]	2174.9780	1087.9926	335.1496	168.0784
R	2331.0791	1166.0432	175.1190	88.0631

(ver. 2) Homo sapiens. Analýza FDR (false discovery rate) prebehla proti obrátenej databáze.

Výsledky analýzy LC-MS/MS dát

Analýzou LC-MS/MS dát bolo identifikovaných 142 unikátnych peptidov pokrývajúcich sekvenciu proteínu CHIP z 99,7 %. Obr. 2A znázorňuje fragmentačné spektrum jedného z ubikvitinovaných peptidov SPSAQLK[UGG]EQGNR, ktorý sa podarilo identifikovať v reakčnej zmesi proteínu CHIP s ATP po inkubácii ubikvitinácie reakcie počas 20 min. Peptid nesie charakteristické vynechané štiepne miesto za lyzínom modifikovaným ubikvitínom. Na lyzíne je identifikovaný charakteristický GlyGly zbytok na Lys8 vzniknutý tryptickým štiepením ubikvitínu. Tento peptid nie je však jediný z identifikovaných ubikvitinova-

ných peptidov. LC-MS/MS analýza odhalila ubikvitináciu aj na ďalších lyzinoch a dá sa predpokladať, že niektoré identifikácie budú falošne pozitívne (obr. 2B). K filtrácii potenciálne pozitívne falošných priradení GlyGly modifikácie významne prispelo zaradenie validačného kroku do nášho postupu identifikácie ubikvitinácií. Validačný krok spočíva v kontrole fragmentačných spektier modifikovaných peptidov. Pri validácii spektier sa zameriavame na počet produktových iónov so zbytkom GlyGly (+114 Da) na lyzíne. Ukázalo sa, že niektoré peptidy identifikované s vysokou hodnotou peptidovej konfidencie (pep. konfidencia > 99 %) nesúce GlyGly zbytok obsahujú vo fragmentačnom spektre len niekoľko produktových iónov modifikovaných GlyGly zbytkom na lyzíne. Ich prekursorový peptid môže byť izo-

barický s peptidmi s inou sekvenciou. Dobrým príkladom je izobarický peptid, ktorý miesto GlyGly modifikácie má aminokyseliny GlyGly zaradené priamo v peptidovej sekvencii za alebo pred lyzínom. Existencia ubikvitinácie na peptidoch s nízkym počtom produktových iónov potvrdzujúcich GlyGly modifikáciu nemusí byť reálna a ich identifikácia je teda pravdepodobne falošne pozitívna. Ako reprezentatívny príklad uvádzame dva peptidy s rovnakou peptidovou konfidenciou (pep. konfidencia = 99 %) nesúce GlyGly zbytky na lyzíne (obr. 3A, 3B). V obr. 3A a 3B sú u oboch peptidov (SPSAQLK[UGG]EQGNR a ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R) zelenou farbou vyznačené m/z spoľahlivo identifikovaných produktových iónov z MS/MS spektier a zároveň v obr. 2A a 2B sú tieto produktové ióny zvýraznené

A

CHIP bez ATP

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKM
 QQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPALRIAKKKR
 WNSIEERRIHQESSELHSYLSRLTAAEFERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVD
 EKRRKRDIPDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRADIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLI PNLAMKEVIDA
 FISENGWVEDY

B

CHIP + 3,26 mM ATP

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKM
 QQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPALRIAKKKR
 WNSIEERRIHQESSELHSYLSRLTAAEFERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVD
 EKRRKRDIPDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRADIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLI PNLAMKEVIDA
 FISENGWVEDY

Obr. 4. Na obrázku je červenou farbou zvýraznená ubikvitinácia lyzínov v sekvencii CHIP-u s prídavkom (1B) a bez prídavku ATP (1A) do ubikvitináčnej reakčnej zmesi. Peptidy s vysokou konfidienciou (pep. konfidencia > 95 %) sú znázornené zelenou farbou, peptidy so stredne vysokou konfidienciou (pep. konfidencia ≤ 95 % a > 50 %) sú znázornené oranžovou farbou, nízko konfidentné peptidy (pep. konfidencia ≤ 50 %) sú znázornené červenou farbou a neidentifikované peptidy sivou farbou písma. CHIP je jednoznačne viac ubikvitinovaný v prítomnosti ATP, zatiaľ čo v neprítomnosti ATP k ubikvitinácii nedochádza.

ATP – adenosíntrifosfát

priamo v MS/MS spektre. Z obr. 2B a 3B vyplýva, že GlyGly zbytok na Lys6 v peptide ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R potvrdzuje len jeden produktový ión (obr. 2B, 3B), zatiaľčo pri peptide SPSAQELK[UGG]EQGNR (obr. 2A, 3A) zaznamenávame až 21 produktových iónov s charakteristickým posunom o 114 Da (GlyGly zbytok) potvrdzujúcim ubikvitináciu na Lys8. Z obr. 2A, 2B a 3A, 3B je zrejme, že pravdepodobnosť správnej identifikácie GlyGly zbytku lyzínu je odlišná u oboch peptidov a nesúvisí s peptidovou konfidienciou. Z tohto dôvodu doporučujeme pri identifikácii ubikvitinácie dôkladne prekontrolovať fragmentačné spektrá peptidov.

Overenie funkčnosti postupu identifikácie ubikvitinácie sme skúmali aj postupom vyplývajúcim z ATP-dependentej podstaty reakcie. Množstvo ubikvitinovaných lyzínov sme sledovali v prítomnosti a v neprítomnosti ATP v reakčnej zmesi. Výsledky LC-MS/MS analýz v oboch podmienkach sú zhrnuté v obr. 4A a 4B. Dáta jasne poukazujú na to, že dochádza k nárastu ubikvitinácie

lyzínov po pridaní ATP do reakčnej zmesi. Pokračovali sme výskumom dynamiky priebehu ubikvitináčnej reakcie v prítomnosti ATP v intervaloch 5, 20 a 40 min od započatia ubikvitináčnej reakcie. Z obr. 5A–C je jasný postupný nárast ubikvitinácie lyzínov s časom.

Diskusia

Literárna rešerš jasne naznačuje, že ubikvitinácia je sofistikovaným nástrojom regulácie proteostázy a má mnoho významov. Regulácia hladiny proteínu ubikvitináciou má duálny charakter a zohráva úlohu v mnohých nádorových ochoreniach. Zdá sa, že pozornosti neuniká ani možnosť cielenia liečebných postupov na ubikvitín ligázy a deubikvitináčnej enzýmy. V súčasnosti už bolo objavených niekoľko molekúl zasahujúcich do procesu ubikvitinácie s cieľom zastaviť malígne procesy, no ich využitie ešte stále nie je zavedené do klinickej praxe [45]. Ukazuje sa, že E3 ubikvitín ligázy majú najväčší potenciál pre tvorbu cielených terapeutických postupov, nakoľko sa vyznačujú vysokou sub-

strátovou špecificitou. Avšak z hľadiska zapojenia ubikvitinácie a ubikvitín ligáz v onkogenéze je stále mnoho neprebádaných malígných procesov, ktoré unikajú pozornosti výskumníkov a lekárov. Práve zapojenie „-omics“ metód môže ponúknuť bližší náhľad na tieto procesy. Tvorba hmotnostne spektrometrickej metódy na popis ubikvitinácie nám umožnila skúmať ubikvitináciu na špecifických miestach v sekvencii proteínu. Lokalizácia pozície ubikvitinácie v sekvencii proteínu je významná pre porozumenie jej biologickej úlohe [46–48]. Na proteíne CHIP sa nám podarilo identifikovať ubikvitináciu (pozn. GlyGly zbytok) na viacerých lyzínach. Autoubikvitinácia proteínu CHIP identifikovaná na Lys22 bola už v minulosti popísaná v publikácii od Graf et al [49] podobne ako aj ubikvitinácia na Lys30, Lys125, Lys221 a Lys255 v publikáciách od Lumpkin et al a Akimov et al [50,51]. Ubikvitinácia na Lys4, Lys7, Lys41, Lys223 a Lys234 nebola doposiaľ popísaná, treba však podotknúť, že ubikvitináciu v týchto pozíciách sa podarilo

A

CHIP + 3,26 mM ATP, 5 min

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKM
 QQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPSAALRIAKKKR
 WNSIEERRIHQESELHSYLSRLIAAERERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVD
 EKRRKRDIPTYLGGKISFELMREPCITPSGITYDRKIDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLIPNLAMKEVIDA
 FISENGWVEDY

B

CHIP + 3,26 mM ATP, 20 min

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKM
 QQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPSAALRIAKKKR
 WNSIEERRIHQESELHSYLSRLIAAERERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVD
 EKRRKRDIPTYLGGKISFELMREPCITPSGITYDRKIDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLIPNLAMKEVIDA
 FISENGWVEDY

C

CHIP + 3,26 mM ATP, 45 min

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKM
 QQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPSAALRIAKKKR
 WNSIEERRIHQESELHSYLSRLIAAERERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVD
 EKRRKRDIPTYLGGKISFELMREPCITPSGITYDRKIDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLIPNLAMKEVIDA
 FISENGWVEDY

Obr. 5. Časový priebeh ubikvitinačnej reakcie proteínu CHIP po 5 min (2A), 20 min (2B) a 45 min (2C) s prídavkom ATP do ubikvitinačnej reakčnej zmesi. Z obrázku 2A–C je zjavný nárast ubikvitinácie s postupom času.

ATP – adenosíntrifosfát

identifikovať vo vzorkách pripravených ubikvitinačnou reakciou *in vitro*. Z biologického hľadiska by bolo zaujímavé zistiť, či sa obdobná ubikvitinácia vyskytuje *in vivo*, a určiť jej zmysel.

Definícia pravidiel manuálnej kontroly peptidových LC-MS/MS spektier na potvrdenie prítomnosti GlyGly zbytku bola kľúčová pre overenie správnosti identifikácie ubikvitinovaných peptidov. Peptidová konfidencia priamo súvisí s kvalitou fragmentačného spektra peptidu, avšak ukázalo sa, že prehľadávací algoritmus v tejto hodnote nezohľadňuje pravdepodobnosť správnej identifikácie GlyGly zbytku. V analýzach ubikvitinomu teda môže dochádzať k identifikácii falošne pozitívnych peptidov s vysokou konfidenciou (peptidová konfiden-

cia > 95 %), kde sa LC-MS/MS spektrum GlyGly modifikovaného a nemodifikovaného peptidu líši len v jednom fragmentovom ióne. Dobrým príkladom je identifikovaný peptid ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R, u ktorého nie je možné s dostatočnou určitosťou potvrdiť prítomnosť GlyGly modifikácie (+114 Da) na lyzíne. Prítomnosť modifikácie potvrdzuje len jeden fragmentový ión obr. 2B a 3B, ktorý môže pochádzať z iného ko-fragmentovaného prekurzorového iónu.

Aplikáciou pravidiel manuálnej kontroly sa nám podarilo rozlíšiť dva peptidy so zdanlivo identickou pravdepodobnosťou prítomnosti GlyGly zbytku v sekvencii. Zavedený postup odporúčame aplikovať na potvrdenie prítomnosti lu-

bovolnej modifikácie peptidov alebo na odfiltrovanie falošne pozitívnych identifikácií modifikovaných peptidov. Nevýhodou je časová náročnosť postupu a teda aplikácia v komplexných peptidových vzorkách (digest tkaniva, modelových bunecných línií) je limitovaná.

Presná znalosť pozície ubikvitinácie nemusí byť dostačujúca pre výskum priebehu biologického procesu. Náhľad na dynamiku čiastočne poskytuje sledovanie vývoja ubikvitinácie v čase. Schopnosť sledovania zmeny počtu ubikvitinácií lyzínov v čase sme úspešne demonštrovali na proteíne CHIP. S predlžujúcim sa časom inkubácie ubikvitinačnej reakcie sa postupne zvyšoval počet ubikvitinovaných lyzínov. Sledovanie ubikvitinácie v čase prispelo k objavu ly-

zínov proteínu CHIP, kde k autoubikvitinácii dochádza prednostne.

Nevýhodou metódy je, že zo získaných dát nie je možné spoľahlivo určiť do akej miery boli ubikvitinované jednotlivé lyzíny za skúmaných podmienok. K dynamickému popisu ubikvitinácie jednotlivých lyzínov sa snažíme v súčasnosti vyvinúť semikvantitatívnu akvizíciu metódu. Vo vývoji semikvantitatívnej metódy sa snažíme aplikovať poznatky z label-free kvantitatívnej proteomiky. Pre presnejší popis dynamiky plánujeme využiť metódu SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical mass spectra), ktorá by teoreticky mala paralelne kvantifikovať všetky detekovateľné GlyGly modifikácie lyzínov počas jedinej LC-MS analýzy.

Dá sa predpokladať, že kvantitatívne metódy hmotnostnej spektrometrie, medzi ktoré patrí aj metóda SWATH, môžu určiť kvantitu ubikvitinovaného proteínu/peptidu, čo by umožnilo presnejšie sledovať zmeny modifikácie, aj medzi viacerými stavmi (napr. tumor vs. zdravá kontrola). Nemenej dôležitý je popis ubikvitinácie za rôznych podmienok, či už *in vitro*, alebo *in vivo*. Týmto spôsobom možno dynamicky popísať a objasniť príčiny zmien v hladinách proteínov, príp. určiť preferenciu substrátov ubikvitín ligáz v závislosti na biologickom stave. Detailnejšia charakterizácia proteostázy môže objasniť molekulárnu príčinu aberantnej signalizácie u niektorých nádorových ochorení.

Záver

Platforma na MS výskum ubikvitinácií bola vytvorená za zjednodušených podmienok na purifikovaných proteínoch, do budúcnosti sa však počíta s rozšírením na komplexné proteomické vzorky. Práve komplexné tkanivové vzorky obsahujú celkový náhľad na ubikvitinóm pacienta. Výskum ubikvitinácií v časových intervaloch umožňuje popísať lyzíny, u ktorých dochádza k ubikvitinácii prednostne, a lyzíny, u ktorých sa ubikvitinácia nevyskytuje, príp. je len veľmi málo pravdepodobná. Objav unikátnych ubikvitinácií môže napomôcť k objasneniu molekulárnej príčiny niektorých nádorových ochorení, čo by mohlo prispieť aj k zdokonaleniu niektorých súčasných

terapeutických metód v onkológii. Popis ubikvitinácie je len veľmi malým krokom k tvorbe nových postupov špecificky cieľných na molekulárnu príčinu nádorového ochorenia. Efektívne spracovanie získaných informácií bude vyžadovať zapojenie multioborového tímu a rozsiahlu validáciu.

Literatúra

- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U et al. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 11–15. doi: 10.1073/pnas.72.1.11.
- Ciechanover A, Elias S, Heller H et al. "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 1982; 257(5): 2537–2542.
- Ciechanover A. The 2008 Lindau Nobel laureate meeting: Aaron Ciechanover, Chemistry 2004. *J Vis Exp* 2009; (29): 1559. doi: 10.3791/1559.
- Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 503–533. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.503.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425–479. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
- Cheng Q, Cross B, Li B et al. Regulation of MDM2 E3 ligase activity by phosphorylation after DNA damage. *Mol Cell Biol* 2011; 31(24): 4951–4963. doi: 10.1128/MCB.05553-11.
- Herhaus L, Dikic I. Expanding the ubiquitin code through post-translational modification. *EMBO Rep* 2015; 16(9): 1071–1083. doi: 10.15252/embr.201540891.
- Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 203–229. doi: 10.1146/annurev-biochem-060310-170328.
- Nguyen LK, Dobrzyński M, Fey D et al. Polyubiquitin chain assembly and organization determine the dynamics of protein activation and degradation. *Front Physiol* 2014; 5: 4. doi: 10.3389/fphys.2014.00004.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M et al. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000; 19(1): 94–102. doi: 10.1093/emboj/19.1.94.
- Sehat B, Andersson S, Girnita L et al. Identification of c-Cbl as a new ligase for insulin-like growth factor-I receptor with distinct roles from Mdm2 in receptor ubiquitination and endocytosis. *Cancer Res* 2008; 68(14): 5669–5677. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6364.
- Yang WL, Zhang X, Lin HK. Emerging role of Lys-63 ubiquitination in protein kinase and phosphatase activation and cancer development. *Oncogene* 2010; 29(32): 4493–4503. doi: 10.1038/ncr.2010.190.
- Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M et al. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- κ B activation. *Cell* 2009; 136(6): 1098–1109. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.007.
- Filii BK, Gyrd-Hansen M. Met1-linked ubiquitination in immune signalling. *FEBS J* 2014; 281: 4337–4350. doi: 10.1111/febs.12944.
- Shi D, Grossman SR. Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets. *Cancer Biol Ther* 2010; 10(8): 737–747. doi: 10.4161/cbt.10.8.13417.
- Gallo LH, Ko J, Donoghue DJ. The importance of regulatory ubiquitination in cancer and metastasis. *Cell Cycle* 2017; 16(7): 634–648. doi: 10.1080/15384101.2017.1288326.
- Wu Z, Shen S, Zhang Z et al. Ubiquitin-conjugating enzyme complex Uev1A-Ubc13 promotes breast cancer metastasis through nuclear factor- κ B mediated matrix metalloproteinase-1 gene regulation. *Breast Cancer Res* 2014; 16(4): 75. doi: 10.1186/bcr3692.
- Jung CR, Hwang KS, Yoo J et al. E2-EPF UCP targets pVHL for degradation and associates with tumor growth and metastasis. *Nat Med* 2006; 12(7): 809–816. doi: 10.1038/nm1440.
- Tanimoto K, Makino Y, Pereira T et al. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 2000; 19(16): 4298–4309. doi: 10.1093/emboj/19.16.4298.
- Tsai YC, Mendoza A, Mariano JM et al. The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nat Med* 2007; 13(12): 1504–1509. doi: 10.1038/nm1686.
- Vaughan L, Tan CT, Chapman A et al. HUWE1 ubiquitylates and degrades the RAC activator TIAM1 promoting cell-cell adhesion disassembly, migration, and invasion. *Cell Rep* 2015; 10(1): 88–102. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.012.
- Rosser MF, Washburn E, Muchowski PJ et al. Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem* 2007; 282(31): 22267–22277. doi: 10.1074/jbc.M700513200.
- Paul I, Ahmed SF, Bhowmik A et al. The ubiquitin ligase CHIP regulates c-Myc stability and transcriptional activity. *Oncogene* 2013; 32(10): 1284–1295. doi: 10.1038/ncr.2012.144.
- Kajiro M, Hirota R, Nakajima Y et al. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat Cell Biol* 2009; 11(3): 312–319. doi: 10.1038/ncb1839.
- Ferreira JV, F6fo H, Bejarano E et al. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 2013; 9(9): 1349–1366. doi: 10.4161/auto.25190.
- Xu W, Marcu M, Yuan X et al. Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(20): 12847–12852. doi: 10.1073/pnas.202365899.
- Wang T, Yang J, Xu J et al. CHIP is a novel tumor suppressor in pancreatic cancer through targeting EGFR. *Oncotarget* 2014; 5(7): 1969–1986. doi: 10.18632/oncotarget.1890.
- Wang Y, Ren F, Wang Y et al. CHIP/Stub1 functions as a tumor suppressor and represses NF- κ B-mediated signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2014; 35(5): 983–991. doi: 10.1093/carcin/bgt393.
- Wang S, Wu X, Zhang J et al. CHIP functions as a novel suppressor of tumour angiogenesis with prognostic significance in human gastric cancer. *Gut* 2013; 62(4): 496–508. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301522.
- Li F, Xie P, Fan Y et al. C terminus of Hsc70-interacting protein promotes smooth muscle cell proliferation and survival through ubiquitin-mediated degradation of FoxO1. *J Biol Chem* 2009; 284(30): 20090–20098. doi: 10.1074/jbc.M109.017046.
- Esser C, Scheffner M, Höhfeld J. The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2005; 280(29): 27443–27448. doi: 10.1074/jbc.M501574200.
- Oh KH, Yang SW, Park JM et al. Control of AIF-mediated cell death by antagonistic functions of CHIP ubiquitin E3 ligase and USP2 deubiquitinating enzyme. *Cell Death Differ* 2011; 18(8): 1326–1336. doi: 10.1038/cdd.2011.3.
- Narayan V, Pion E, Landré V et al. Docking-dependent ubiquitination of the interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by the ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem* 2011; 286(1): 607–619. doi: 10.1074/jbc.M110.153122.
- Udeshi ND, Mertins P, Svinkina T et al. Large-scale identification of ubiquitination sites by mass spectrometry.

- rometry. *Nat Protoc* 2013; 8(10): 1950–1960. doi: 10.1038/nprot.2013.120.
35. van der Wal L, Bezstarosti K, Sap KA et al. Improvement of ubiquitylation site detection by Orbitrap mass spectrometry. *J Proteomics* 2018; 17(2): 49–56. doi: 10.1016/j.jpro.2017.10.014.
36. Xu G, Paige JS, Jaffrey SR. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat Biotechnol* 2010; 28(8): 868–873. doi: 10.1038/nbt.1654.
37. Udeshi ND, Mani DR, Eisenhaure T et al. Methods for quantification of in vivo changes in protein ubiquitination following proteasome and deubiquitinase inhibition. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(5): 148–159. doi: 10.1074/mcp.M111.016857.
38. Udeshi ND, Svinkina T, Mertins P et al. Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K-ε-GG) antibody enables routine quantification of 10,000s of ubiquitination sites in single proteomics experiments. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12(3): 825–831. doi: 10.1074/mcp.O112.027094.
39. Vasilescu J, Smith JC, Ethier M et al. Proteomic analysis of ubiquitinated proteins from human MCF-7 breast cancer cells by immunoaffinity purification and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 4(6): 2192–2200. doi: 10.1021/pr050265i.
40. Ogawa Y, Ono T, Wakata Y et al. Histone variant macroH2A1.2 is mono-ubiquitinated at its histone domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(1): 204–209. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.046.
41. Maine GN, Gluck N, Zaidi IW et al. Bimolecular affinity purification (BAP): tandem affinity purification using two protein baits. *Cold Spring Harb Protoc* 2009; 2009(11): 1–7. doi: 10.1101/pdb.prot5318.
42. Kirkpatrick DS, Weldon SF, Tsapralis G et al. Proteomic identification of ubiquitinated proteins from human cells expressing His-tagged ubiquitin. *Proteomics* 2005; 5(8): 2104–2111. doi: 10.1002/pmic.200401089.
43. Bouchal P, Roumeliotis T, Hrstka R et al. Biomarker discovery in low-grade breast cancer using isobaric stable isotope tags and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (iTRAQ-2DLC-MS/MS) based quantitative proteomic analysis. *J Proteome Res* 2009; 8(1): 362–373. doi: 10.1021/pr800622b.
44. Faktor J, Bouchal P. Building mass spectrometry spectral libraries of human cancer cell lines. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 4): 54–58. doi: 10.14735/amko20164554.
45. Liu J, Shaik S, Dai X et al. Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1855(1): 50–60. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.11.005.
46. Wilkinson KD, Tashayev VL, O'Connor LB et al. Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochemistry* 1995; 34(44): 14535–14546. doi: 10.1021/bi00044a032.
47. Deng L, Wang C, Spencer E et al. Activation of the IκappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; 103(2): 351–361. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00126-4.
48. Sun L, Chen ZJ. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16(2): 119–126. doi: 10.1016/j.ceb.2004.02.005.
49. Graf C, Stankiewicz M, Nikolay R et al. Insights into the conformational dynamics of the E3 ubiquitin ligase CHIP in complex with chaperones and E2 enzymes. *Biochemistry* 2010; 49(10): 2121–2129. doi: 10.1021/bi901829f.
50. Lumpkin RJ, Gu H, Zhu Y et al. Site-specific identification and quantitation of endogenous SUMO modifications under native conditions. *Nat Commun* 2017; 8(1): 1171–1182. doi: 10.1038/s41467-017-01271-3.
51. Akimov V, Barrio-Hernandez I, Hansen SVF et al. Ubi-Site approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nat Struct Mol Biol* 2018; 25(7): 631–640. doi: 10.1038/s41594-018-0084-y.

Dlouhé nekódující RNA – současné možnosti detekce a využití v klinické praxi

Long Non-Coding RNAs – Current Methods of Detection and Clinical Applications

Moráňová L., Bartošík M.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Dlouhé nekódující RNA (long non-coding RNA – lncRNA) jsou RNA molekuly o délce větší než 200 nukleotidů, které ovlivňují řadu fyziologických funkcí a mají významnou regulační roli v buňkách. Jejich hladiny jsou často změněny u různých malignit, a představují tak slibný biomarker pro diagnostiku, prognózu nebo rekurenci nádorových onemocnění. Díky důležitosti těchto molekul výrazně roste i počet publikací na toto téma. Mezi nejčastěji studované lncRNA patří např. HOTAIR, MALAT1 a PCA3. **Cíl:** V současné době jsou vyvíjeny různé metody pro analýzu či detekci lncRNA, obvykle založené na optických metodách pro detekci mediátorové RNA (mRNA), např. polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí, fluorescenční *in situ* hybridizace nebo sekvenování nové generace. Je však potřeba dbát na rozdíly ve struktuře mRNA a lncRNA. V této práci popisujeme nejenom standardní metody, ale i nové přístupy pro detekci lncRNA zahrnující např. chemiluminescenční a elektrochemické techniky. **Závěr:** I navzdory pokrokům a velkému množství publikovaných prací existuje pouze jeden schválený diagnostický test založený na detekci lncRNA, a to PCA3 test pro diagnostiku karcinomu prostaty analýzou moči. Ostatní jsou v současnosti pouze ve fázi vývoje a bude potřeba je validovat. Diagnostika založená na lncRNA i tak skýtá obrovský potenciál, a je proto velmi pravděpodobné, že se v blízké době objeví další diagnostické testy cílicí na jiné typy lncRNA.

Klíčová slova

dlouhá nekódující RNA – nádorové biomarkery – karcinogeneze – biosenzory

Summary

Background: Long non-coding RNAs (lncRNA) are more than 200-nucleotide-long RNA molecules that affect multiple physiologic phenomena and have important regulatory functions in cells. Their levels are often altered in various malignancies, thus they represent a potential biomarker for the diagnostics, prognosis or recurrence of cancer. Their importance has recently led to an enormous increase in a number of publications on the subject. The most frequently studied lncRNAs are HOTAIR, MALAT1 and PCA3. **Aim:** Numerous methods are currently being developed for the analysis or detection of lncRNA. They are mostly based on optical methods used for the detection of messenger RNAs, including polymerase chain reaction with reverse transcription, fluorescence *in situ* hybridisation or next-generation sequencing, but caution must be taken due to their structural differences. Here, we describe not only standard but also novel techniques for lncRNA detection, including chemiluminescent and electrochemical techniques. **Conclusion:** Despite the great progress and plethora of papers on this topic, there is only one single approved lncRNA-based diagnostic test, a PCA3 test for the diagnosis of prostate cancer from the patient's urine. All other tests are only in their research phase and need to be validated. Nevertheless, lncRNA diagnostics offer enormous potential and thus it is highly probable that other diagnostic tests on different lncRNA types will soon appear.

Key words

long non-coding RNA – tumor biomarkers – carcinogenesis – biosensing techniques

Práce byla podpořena projekty MŠMT – NPU I – LO1413 a GAČR 17-08971S.

This work was supported by MEYS – NPS I – LO1413 and Czech Science Foundation 17-08971S.

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 recommendation for biomedical papers.



Mgr. Martin Bartošík, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: martin.bartosik@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 28. 5. 2019

Přijato/Accepted: 30. 7. 2019

doi: 10.14735/amko20193565

Úvod

I když pouze 2 % lidského genomu tvoří geny kódující proteiny, velká většina genomu (> 70 %) je transkripčně aktivní, dávající vznik různým formám tzv. nekódujících RNA s významnými regulačními funkcemi [1,2]. Mezi ně patří krátké nekódující RNA o délce menší než 200 nukleotidů (nt, obvykle kolem 20–30 nt), zejména mikroRNA, malé interferující RNA nebo Piwi-interagující RNA a též rozsáhlá skupina tzv. dlouhých nekódujících RNA (long non-coding RNA – lncRNA) o délce větší než 200 nt (často až 100 000 nt). Dle NONCODE databáze [3] se v lidském genomu nachází více než 96 000 genů pro lncRNA a až 172 000 transkriptů těchto genů; naopak LNCipedia [4] udává střízlivější odhad, zaokrouhlený na cca 55 000 genů [5]. Tyto geny se nacházejí v různých oblastech genomu, a to jak v nekódujících regionech, tak i v intronech genů kódujících proteiny. Navíc mohou být prepisovány nejenom ze stejného řetězce jako protein-kódující geny (tzv. „sense“ transkripty), ale i z řetězce opačného („antisense“ transkripty), či dokonce mohou sdílet promotor s protein-kódujícím genem v opačném řetězci (divergentní lncRNA). Transkripty lncRNA jsou obvykle generovány RNA polymerázou II, obdobně jako mRNA mají většinou na 5'-konci metylguanozinovou čepičku, na 3'-konci poly(A) konec a podstupují sestřih. Na rozdíl od mRNA ovšem postrádají otevřený čtecí rámec, takže nemohou být překládány do proteinů.

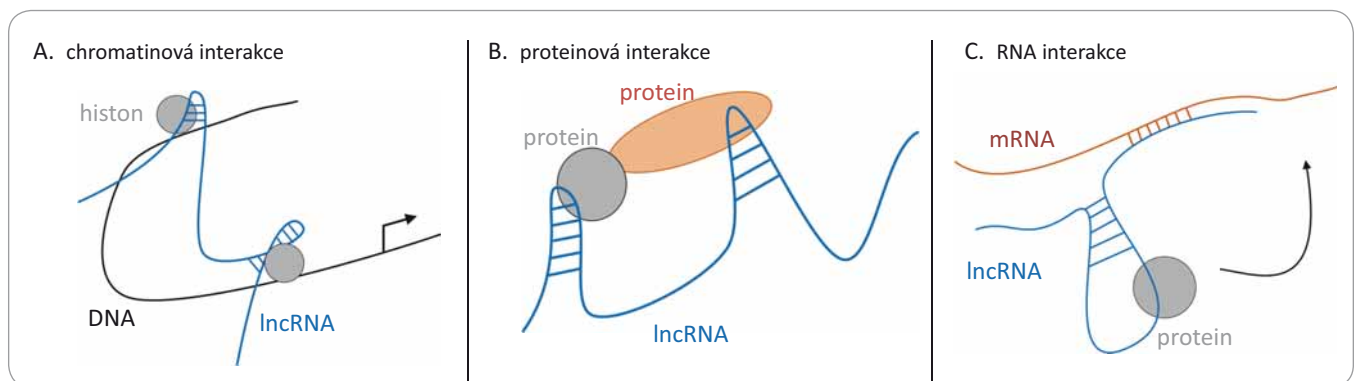
Geny kódující lncRNA jsou často pojmenovány dle sousedících protein-kódujících genů [6]. Jejich klasifikace je relativně složitá, dají se dělit např. dle umístění v genomu, způsobu aktivace nebo dle mechanismu účinku. Hlavní třídy lncRNA, detailněji popsané v přehledném článku Šány et al [7], jsou mj. mezigenové lncRNA (umístěné mezi dvěma geny), intronové lncRNA (umístěné uvnitř intronů genů), lncRNA asociované s telomery nebo pseudogeny (kopie genů neschopné kódovat proteiny). I když funkce většiny lncRNA transkriptů nejsou známy, lze obecně říci, že jejich úloha spočívá v regulaci genové exprese, modulaci proteinové aktivity či remodelaci chromatinu, příp. slouží jako prekurzory krátkých nekódujících RNA nebo jsou součástí systému jejich umlčení [8]. Obr. 1 naznačuje, že mechanismus účinku lncRNA je závislý na vazbě na DNA, RNA nebo protein. Vzhledem k jejich roli při regulaci genové exprese není překvapivé, že při patologických stavech jsou pozorovány změny jejich hladin, které mohou být detekovatelné dříve než viditelné morfologické změny. Tato skutečnost dělá z lncRNA ideální kandidáty nejen na biomarkery nádorových onemocnění [1,7,9–11], ale např. i kardiovaskulárních chorob [12] nebo Alzheimerovy choroby [13]. Díky důležitosti těchto molekul tak roste i počet publikací na toto téma; jenom v roce 2018 jich bylo přes 4 000 (graf 1). Bližší informace o funkci, klasifikaci nebo struktuře několika hlavních skupin

lncRNA je možné najít v článkách publikovaných v dřívějších ročnících Klinické onkologie [7,9]; v tomto článku se chceme zaměřit především na nejnovější poznatky v oblasti metod detekce a jejich aplikace do klinické praxe.

Role lncRNA v karcinogenezi a její aplikace do klinické diagnostiky

Dnes už není pochyb o tom, že deregulace lncRNA je implikována v různých patologických stavech a může vést až k maligní transformaci buněk. Role lncRNA přitom byla prokázána v podstatě u všech charakteristických znaků rakoviny (hallmarks of cancer) definovaných ve dvou dnes již legendárních článkách Hanahana et al [14,15]. Některé konkrétní lncRNA a jejich asociace s těmito znaky jsou blíže popsány v tab. 1. Jde např. o aktivaci proliferčních signálních drah, deregulaci nádorových supresorových drah nebo o účast při metastazování [11,16].

Jednou z nejvíce studovaných lncRNA je HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA). Tato lncRNA s délkou cca 2,2 kb reguluje dynamiku chromatinu a ovlivňuje transkripci jiných genů vazbou na histon metylázu PRC2 a histon demethylázu LSD1 [17,18]. Množství studií prokázalo deregulaci HOTAIR v desítkách nádorů, vč. nádorů prsu [19], tlustého střeva [20], slinivky břišní [21], vaječníků [22] nebo prostaty [23]. U nádorů tlustého střeva korelovala zvýšená hladina HOTAIR nejenom s progresí one-



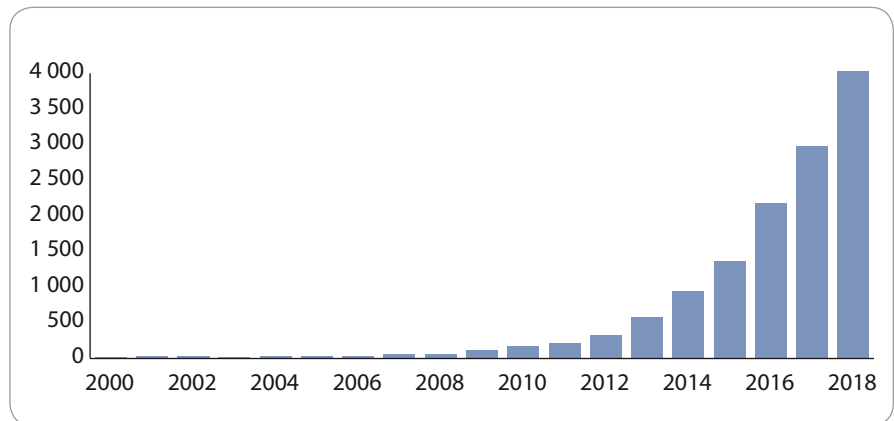
Obr. 1. Tři různé mechanismy působení lncRNA. Jedná se o interakce s: A) chromatinem (DNA), kdy dochází k remodelaci chromatinu po vazbě lncRNA; B) různými proteiny, kde lncRNA může modulovat protein-proteinové interakce; nebo C) mRNA, kde dochází k narušení translace.

lncRNA – dlouhé nekódující RNA, mRNA – mediátorová RNA

mocnění, ale zvýšila se i chemorezistence k cytostatikům [24].

Další diagnosticky zajímavou lncRNA je PCA3 (prostate cancer antigen 3), jejíž hladina je zvýšená u více než 90 % mužů s karcinomem prostaty [25]. V roce 2012 americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválil použití PCA3 diagnostického testu v moči mužů nad 50 let s předchozí negativní biopsií prostaty, který by tak mohl snížit počet opakovaných biopsií a zároveň poskytnout doplňkové informace ke standardnímu testu prostatického specifického antigenu (prostate specific antigen – PSA). Test na PCA3 má sice nižší citlivost než PSA test, na druhé straně vykazuje vyšší specifitu, a může tak predikovat karcinom prostaty u případů, kdy PSA test selhává [26]. Hladina PCA3 byla ve více než 90 % studovaných případů karcinomu prostaty asi 60–100× vyšší než ve zdravé prostatické tkáni [27] a zároveň nedetekovatelná v jiných typech nádorů [28]. PCA3 také může sloužit jako indikátor agresivity rozvíjejícího se nádoru prostaty [29]. Přes značné výhody tohoto biomarkeru se v ČR toto vyšetření zatím takřka neprovádí.

Některé lncRNA mohou dokonce indikovat metastatický potenciál nádoru. Mezi ně patří např. MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), obvykle s vysokou koncentrací v jádře, kde reguluje prometastatické



Graf 1. Nárůst publikační aktivity zabývající se dlouhými nekódujícími RNA od roku 2000 do roku 2018, dle Web of Science (hledaný výraz: lncRNA OR long noncoding RNA).

geny [30]. MALAT1 je vysoce konzervovaná lncRNA, jejíž umlčení vede ke snížení proliferace a migrace nádorových buněk [31] a k aktivaci tumor-supresorového genu *TP53* [32]. U některých typů nádorů byla pozorována zvýšená hladina MALAT1 korelující s progresí metastáz a celkově horší prognózou, např. u plicního adenokarcinomu, kolorektálního karcinomu, karcinomu slinivky břišní, karcinomu močového měchýře, karcinomu jícnu nebo gliomu [1,33–36]. Souhrnná analýza několika nezávislých studií prokázala, že tato lncRNA je spojená s horší prognózou, kratším přežíváním a rekurencí onemocnění [37].

Nicméně data z nedávné studie provedené na myších modelech naznačila, že v prsních nádorových buňkách má MALAT1 opačný, tj. potlačující účinek na vznik metastáz, a autoři tak navrhuji zpřesnění zažitého modelu definující MALAT1 jako prometastatické lncRNA [38].

Další efekt lncRNA je možné pozorovat na úrovni telomer, a to prostřednictvím tzv. TERRA (telomere repeat-containing RNA) molekul, které obsahují telomerové repetice UUAGGG na svém 3'-konci a podílejí se na regulaci telomerové homeostázy [39]. Vzhledem k tomu, že až 85 % lidských nádorů pře-

Tab. 1. Spojitost vybraných lncRNA a charakteristických znaků rakoviny (hallmarks of cancer).

Charakteristický znak	lncRNA	Efekt	Reference
zvýšená proliferace	HOTAIR	aktivace androgenového receptoru	[23]
	CCAT1	aktivace <i>Myc</i> dráhy	[52]
nedostatečná suprese růstu	LED	posiluje tumor supresorovou aktivitu; snížená exprese v nádorech	[53]
rezistence buněčné smrti	LINC00460	inhibuje apoptózu a podporuje progresi kolorektálního karcinomu	[54]
replikační nesmrtnost	TERRA	možný negativní regulátor telomeráz	[40]
angiogeneze	PVT1	aktivuje dráhu STAT3/VEGFA, podporující angiogenezi	[55]
metastazování	MALAT1	ovlivňuje prometastatické geny; zvýšená hladina při metastázách	[1]
	HOTAIR	zvýšená hladina, horší prognóza	
genová nestabilita	NORAD	přispívá ke genomové stabilitě	[56]
zánět a unikání imunitní odpovědi	NKILA	zvýšená hladina koreluje se zvýšenou buněčnou smrtí T lymfocytů	[57]
změněný metabolismus	MEG3	pozměňuje energetický metabolismus aktivací p53	[58]

lncRNA – dlouhé nekódující RNA

Tab. 2. Vybrané studie pro validaci lncRNA jako biomarkeru.

lncRNA	Onemocnění	Velikost souboru	Doba trvání (měsíce)	Stát (rok)	Reference
HOTAIR	kolorektální karcinom	157	35	Česká republika (2014)	[59]
HOTAIR	karcinom jícnu	156	–	Čína (2013)	[60]
HOTAIR	karcinom žaludku	300	60	Japonsko (2014)	[61]
HOTAIR	karcinom žaludku	1169	–	Čína (2014)	[62]
PCA3	karcinom prostaty	1913	–	USA (2012)	[63]
PCA3	karcinom prostaty	721	18	Nizozemsko (2010)	[64]
PCA3	karcinom prostaty	633	29	Japonsko (2013)	[65]
MALAT1	karcinom žaludku	150	26	Japonsko (2014)	[61]
MALAT1	nemalobuněčný karcinom plic	225	60	Německo (2003)	[66]
MALAT1	prsní karcinom	509	–	Itálie (2018)	[67]

lncRNA – dlouhé nekódující RNA

koná replikační limit daný délkou telomer (tím, že reaktivují expresi enzymu telomeráza), jeví se regulační role TERRA lncRNA jako zásadní [7]. Sampl et al zjistili, že expresní hladina TERRA negativně koreluje s malignitou gliomů [40]. Přesná role TERRA jakožto negativního regulátoru telomeráz *in vivo* však stále zůstává nejasná [41]. V tab. 2 jsou uvedeny příklady studií využívajících početnější soubory klinických vzorků pro validaci různých druhů lncRNA.

Metody detekce

V současné době existuje pouze jeden lncRNA test schválený pro klinickou diagnostiku, a to výše zmíněný PCA3 test (s názvem ProgenSA PCA3 Assay) od firmy Hologic, využívaný pro diagnostiku karcinomu prostaty. Detekce probíhá v moči po masáži *per rectum*, aby došlo k uvolnění buněk prostaty. Moč je následně modifikována přidáním média, které lyzuje uvolněné buňky a stabilizuje RNA. Princip samotného testu spočívá v hybridizaci cílové RNA na povrch magnetických kuliček, které slouží pro separaci cílové RNA. Dále proběhne reverzní transkripce pomocí první sady primerů a RNA amplifikace pomocí další sady primerů. Dochází tedy nejprve k přepisu lncRNA do komplementární DNA (complementary DNA – cDNA) a dále k její amplifikaci pomocí DNA dependentní RNA polymerázy T7. V závěru jsou RNA amplikony detekovány pomocí chemilumi-

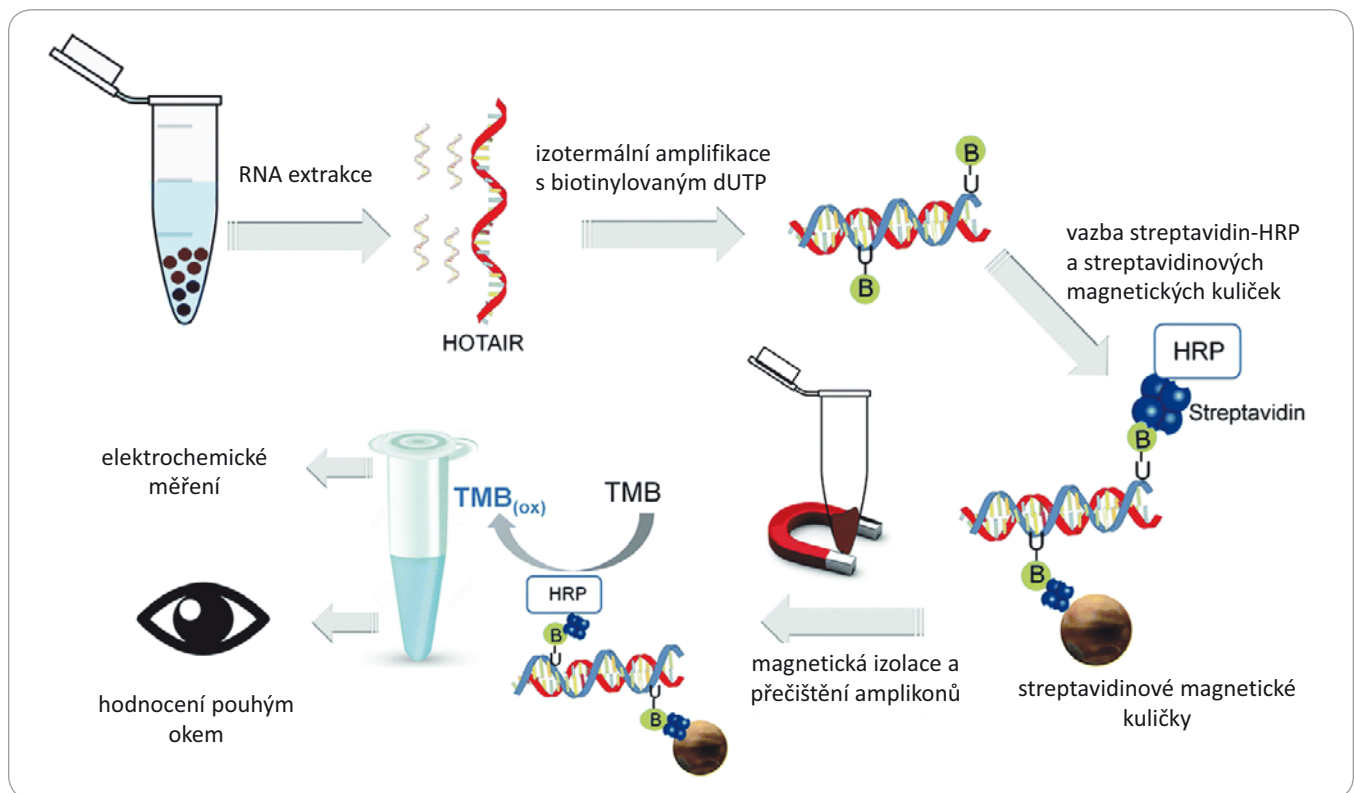
niscenčně značené DNA sondy komplementární k RNA. Kvantifikace se provádí měřením intenzity produkovaného záření a jejím porovnáním s referenčními vzorky, které jsou součástí diagnostické sady. Daný produkt je nabízen v lehce obměněné verzi specificky i pro PSA. Obě laboratorní stanovení se tedy dají provádnout současně, a je tak možné PCA3 hodnoty vztáhnout k hladině PSA [42].

PCA3 je možné detekovat také pomocí klasické imunoenzymatické metody (enzyme-linked immuno sorbent assay – ELISA). Tuto možnost komerčně nabízí společnost MyBioSource pod názvem PCA3 ELISA Kit. Ten je ovšem určen pouze pro výzkumné účely a nemá oprávnění pro použití v klinické diagnostice. Princip metody vychází z klasické sendvičové ELISA. PCA3 je zachycena pomocí PCA3-specifické protilátky a poté označena další specifickou protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. Na základě enzymatické reakce peroxidázy se substrátem vzniká barevný produkt, který je kvantifikován měřením absorbance při 450 nm [43].

I ostatní vyvíjené metody jsou určeny pouze pro výzkumné účely, obvykle se jedná o modifikaci metod pro detekci dlouhých RNA obecně, i když ne všechny jsou použitelné. Některé z nich určeny pro izolaci, identifikaci nebo nespecifickou amplifikaci mRNA např. využívají přítomnosti poly(A) konce na 3'-konci mRNA. Vzhledem k tomu, že ne všechny

lncRNA nesou poly(A) konec [44], může tak při vysokokapacitních analýzách docházet k zatížení velkými chybami. Technologie sekvenování nové generace přitom často využívá záchyt mRNA pomocí poly(T) oligonukleotidů. Společnost Novogene [45] tak nabízí protokol a reagentie k vytváření knihoven a sekvenací profilů lncRNA a firma Roche pod označením SeqCap lncRNA probes [46] nabízí doplňkové sondy lncRNA pro kompletní profilaci celého transkriptomu. Oproti tomu společnost Illumina v rámci standardního protokolu využívá metodu přípravy sekvenční knihovny z depletované RNA (celkové RNA zbavené ribozomální RNA), a tudíž nedochází ke ztrátě informace o lncRNA bez poly(A) konců. Tento postup tedy umožňuje celkovou analýzu lncRNA profilu bez nutnosti pořízení dodatečných reagentů nebo obměny protokolu [47].

Další metodou z klasického portfolia pro studium mRNA je polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí. Touto metodou nejprve dochází k přepisu RNA do cDNA a ta je následně amplifikována. V reálném čase je zaznamenáván nárůst fluorescence, který koresponduje s množstvím DNA ve vzorku. Některé společnosti vyvinuly reagentie pro přepis do cDNA pomocí univerzálních poly(T) primerů, které se vážou na poly(A) konce. Tento přístup je pro komplexní analýzu lncRNA nevhodný, dá se ovšem modifikovat jed-



Obr. 2. Schéma kolorimetrické a elektrochemické detekce HOTAIR kombinující izotermální amplifikace lncRNA, vazbu amplikonů na magnetické kuličky a enzymatickou reakci zprostředkovanou HRP. TMB jakožto substrát pro HRP je detekován volným okem nebo citlivěji elektrochemicky. Upraveno z [58], se svolením Royal Society of Chemistry.

HRP – křenuv peroxidáza, TMB – tetrametylbenzidin

noduchou kombinací poly(T) primerů a tzv. random hexamers (využívaných v nespecifické reverzní transkripci). Tuto vylepšenou a zjednodušenou variantu pro studium lncRNA nabízí např. společnost BioRad [48].

Klasickou metodou pro kvantifikaci lncRNA *in situ* je i fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která využívá fluorescenční hybridizační sondu komplementární ke studované lncRNA a umožňuje kvantifikaci a lokalizaci pomocí fluorescenčního mikroskopu. Firma LGC Biosearch Technologies nabízí sadu reagentů pod názvem Stelaris® RNA FISH a fluorescenčně značené sondy pro nejčastěji studované lncRNA vč. možnosti značení různými fluorofory pro simultánní detekci více biomolekul současně [49].

Další možnost kvantifikace lncRNA představuje elektrochemie, která nabízí relativně levné a nenáročné přístrojové vybavení, možnost miniaturizace a paralelního měření. Zajímavým příkladem

je elektrochemický biosenzor založený na izotermální amplifikaci s dUTP značeným biotinem [50]. Amplikony byly přes vazbu streptavidin-biotin navázány na streptavidinové magnetické kuličky a zároveň označeny peroxidázou konjugovanou s biotinem (obr. 2). Výsledný komplex byl inkubován s tetrametylbenzidem, jehož oxidovaný produkt vykazuje modré zbarvení pozorovatelné pouhým okem. Autoři kvantifikovali HOTAIR lncRNA spektrofotometricky při 652 nm a paralelně i elektrochemicky pomocí chronoamperometrie. Metoda byla vyvinuta na ovariálních nádorových liniích a validována na vzorcích plazmy od tří pacientek s epiteliálním ovariálním karcinomem a dvou benigních kontrol. Ještě novější je biosenzor pro detekci lncRNA MALAT1 pomocí zlatých nanočástic, polyamid-aminu, detekční sondy a peroxidázy [51]. Autoři zde demonstrovali použití biosenzoru na jaterních nádorových liniích, avšak použili vzorky krevní plazmy pouze pro hledání

případných interferencí s detekční metodou přidávkem syntetické molekuly MALAT1 do vzorků plazmy.

Závěr

Přítomnost, a tudíž snadná detekovatelnost lncRNA nejen v tkáních, ale především v tělních tekutinách nabízí možnost širokého využití lncRNA jako prognostického a prediktivního biomarkeru. Velké množství lncRNA skýtá obrovský potenciál k diagnostickému využití, avšak dobře prostudovaných mechanismů působení a funkcí lncRNA je doposud objasněno jen několik set. Díky tkáňové specificitě hladin lncRNA lze vybrat vhodné kandidáty pro včasný záchyt onkologických onemocnění i pro doplnění panelu již existujících biomarkerů za účelem zpřesnění diagnostiky. V posledních letech se provádějí zejména meta-analýzy kombinující výsledky jednotlivých studií, hledající na základě chování nádoru vhodný biomarker predikující jeho vlastnosti. I přes důležitost

lncRNA bude pro jejich zařazení mezi klinicky relevantní biomarkery důležité vyvinout spolehlivé metody jejich detekce a prokázat, že hladiny studovaných lncRNA skutečně korelují s karcinogenezí, prognózou nebo rekurencí nádorového onemocnění.

Literatura

- Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G et al. Long non-coding RNAs and their role in metastasis. *Cancer Genom Proteom* 2017; 14(3): 143–160. doi: 10.21873/cgp.20027.
- Mattick JS, Rinn JL. Discovery and annotation of long noncoding RNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22(1): 5–7. doi: 10.1038/nsmb.2942.
- noncode.org. An integrated knowledge database dedicated to ncRNAs, especially lncRNAs. [online]. Available from: <http://www.noncode.org/>.
- LNCipedia. A comprehensive compendium of human long non-coding RNAs. [online]. Available from: <https://lncipedia.org/>.
- Volders PJ, Anckaert J, Verheggen K et al. LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acid Res* 2018; 47(D1): D135–D139. doi: 10.1093/nar/gky1031.
- Gibbons HR, Shaginurova G, Kim LC et al. Divergent lncRNA GATA3-AS1 regulates GATA3 transcription in T-helper 2 cells. *Front Immunol* 2018; 9: 2512. doi: 10.3389/fimmu.2018.02512.
- Šána J, Faltejsková P, Svoboda M et al. Dlouhé nekódující RNA a jejich význam u nádorových onemocnění. *Klin Onkol* 2012; 25(4): 246–254. doi: 10.14735/amko2012246.
- Dykes IM, Emanuelli C. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA. *Genom Proteom Bioinform* 2017; 15(3): 177–186. doi: 10.1016/j.gpb.2016.12.005.
- Gromesová B, Kubáčková V, Bollová B et al. Potenciál dlouhých nekódujících molekul RNA v diagnostice nádorových onemocnění. *Klin Onkol* 2016; 29(1): 20–28. doi: 10.14735/amko201620.
- Qi P, Zhou XY, Du X. Circulating long non-coding RNAs in cancer: current status and future perspectives. *Mol Cancer* 2016; 15(1): 39. doi: 10.1186/s12943-016-0524-4.
- Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways. *Cancer Cell* 2016; 29(4): 452–463. doi: 10.1016/j.ccell.2016.03.010.
- Sallam T, Sandhu J, Tontozon P. Long noncoding RNA discovery in cardiovascular disease. *Circul Res* 2018; 122(1): 155–166. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311802.
- Luo Q, Chen Y. Long noncoding RNAs and Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2016; 11: 867–872. doi: 10.2147/CIAS.107037.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- de Oliveira JC, Oliveira LC, Mathias C et al. Long non-coding RNAs in cancer: Another layer of complexity. *J Gene Med* 2019; 21(1): e3065. doi: 10.1002/jgm.3065.
- Bhan A, Mandal SS. lncRNA HOTAIR: a master regulator of chromatin dynamics and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1856(1): 151–164. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.07.001.
- Gupta RA, Shah N, Wang KC et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464(7291): 1071–1076. doi: 10.1038/nature08975.
- Avazpour N, Hajjari M, Tahmasebi Birgani M. HOTAIR: a promising long non-coding RNA with potential role in breast invasive carcinoma. *Front Genet* 2017; 8: 170. doi: 10.3389/fgenet.2017.00170.
- Luo ZF, Zhao D, Li XQ et al. Clinical significance of HOTAIR expression in colon cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(22): 5254–5259. doi: 10.3748/wjg.v22.i22.5254.
- Yang SZ, Xu F, Zhou T et al. The long non-coding RNA HOTAIR enhances pancreatic cancer resistance to TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 2017; 292(25): 10390–10397. doi: 10.1074/jbc.M117.786830.
- Liu S, Lei H, Luo F et al. The effect of lncRNA HOTAIR on chemoresistance of ovarian cancer through regulation of HOXA7. *Biol Chem* 2018; 399(5): 485–497. doi: 10.1515/hsz-2017-0274.
- Zhang A, Zhao JC, Kim J et al. lncRNA HOTAIR enhances the androgen-receptor-mediated transcriptional program and drives castration-resistant prostate cancer. *Cell Rep* 2015; 13(1): 209–221. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.069.
- Xiao Z, Qu Z, Chen Z et al. lncRNA HOTAIR is a prognostic biomarker for the proliferation and chemoresistance of colorectal cancer via miR-203a-3p-mediated wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* 2018; 46(3): 1275–1285. doi: 10.1159/000489110.
- Wright CM. Long noncoding RNAs and cancer. In: Gray SG (ed). *Epigenetic Cancer Therapy*. Boston: Academic Press 2015: 91–114.
- Lu Y, Madu C. Prostate cancer biomarkers. In: Gupta RC (ed). *Biomarkers in Toxicology*. Boston: Academic Press 2014: 771–783.
- de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW et al. DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res* 2002; 62(9): 2695–2698.
- Bussemakers MJG, van Bokhoven A, Verhaegh GW et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999; 59(23): 5975–5979.
- Taille Adl, Irani J, Graefen M et al. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol* 2011; 185(6): 2119–2125. doi: 10.1016/j.juro.2011.01.075.
- Gutschner T, Hämmerle M, Eissmann M et al. The non-coding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res* 2013; 73(3): 1180–1189. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2850.
- Wang X, Li M, Wang Z et al. Silencing of long noncoding RNA MALAT1 by miR-101 and miR-217 inhibits proliferation, migration, and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2015; 290(7): 3925–3935. doi: 10.1074/jbc.M114.596866.
- Tripathi V, Shen Z, Chakraborty A et al. Long non-coding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. *PLoS Genet* 2013; 9(3): e1003368. doi: 10.1371/journal.pgen.1003368.
- Ying L, Chen Q, Wang Y et al. Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Biosyst* 2012; 8(9): 2289–2294. doi: 10.1039/c2mb25070e.
- Wu XS, Wang XA, Wu WG et al. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the ERK/MAPK pathway. *Cancer Biol Ther* 2014; 15(6): 806–814. doi: 10.4161/cbt.28584.
- Hu L, Wu Y, Tan D et al. Up-regulation of long noncoding RNA MALAT1 contributes to proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Oncol* 2015; 34(1): 7. doi: 10.1186/s13046-015-0123-z.
- Ma KX, Wang HJ, Li XR et al. Long noncoding RNA MALAT1 associates with the malignant status and poor prognosis in glioma. *Tumour Biol* 2015; 36(5): 3355–3359. doi: 10.1007/s13277-014-2969-7.
- Tian X, Xu G. Clinical value of lncRNA MALAT1 as a prognostic marker in human cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2015; 5(9): e008653. doi: 10.1136/bmjopen-2015-008653.
- Kim J, Piao HL, Kim BJ et al. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nat Genet* 2018; 50(12): 1705–1715. doi: 10.1038/s41588-018-0252-3.
- Oliva-Rico D, Herrera LA. Regulated expression of the lncRNA TERRA and its impact on telomere biology. *Mech Age Develop* 2017; 167: 16–23. doi: 10.1016/j.mad.2017.09.001.
- Sampl S, Pramhas S, Stern C et al. Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. *Transl Oncol* 2012; 5(1): 56–65. doi: 10.1593/tlo.11202.
- Cusanelli E, Chartrand P. Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. *Front Genet* 2015; 6: 143. doi: 10.3389/fgenet.2015.00143.
- Durand X, Moutereau S, Xylinas E et al. Progenitor PCA3 test for prostate cancer. *Exp Rev Mol Diagn* 2011; 11(2): 137–144. doi: 10.1586/erm.10.122.
- MyBioSource.com. PCA3 elisa kit: human prostate cancer antigen 3 (PCA3) ELISA kit. [online]. Available from: <https://www.mybiosource.com/pca3-human-elisa-kits/prostate-cancer-antigen-3-pca3/109022>.
- Yang Q, Wan Q, Zhang L et al. Analysis of lncRNA expression in cell differentiation. *RNA Biol* 2018; 15(3): 413–422. doi: 10.1080/15476286.2018.1441665.
- Novogene.com. lncRNA SEQUENCING. [online]. Available from: <https://en.novogene.com/next-generation-sequencing-services/gene-regulation/lncrna-sequencing/>.
- sequencing.roche.com. SeqCap lncRNA Probes. [online]. Available from: <https://sequencing.roche.com/en/products-solutions/by-category/target-enrichment/hybridization/seqcap-lncrna.html>.
- illumina.com. rRNA & Globin mRNA removal kit selection guide. [online]. Available from: <https://www.illumina.com/products/selection-tools/rrna-depletion-selection-guide.html>.
- bio-rad.com. lncRNA RT-qPCR workflow. [online]. Available from: <http://www.bio-rad.com/en-cz/category/lncrna-rt-qpcr-workflow?ID=OUJ92R15>.
- Coassin SR, Orjalo AV, Semaan SJ et al. Simultaneous detection of nuclear and cytoplasmic RNA variants utilizing Stellaris[®] RNA fluorescence in situ hybridization in adherent cells. In: Nielsen BS (ed). *In Situ Hybridization Protocols*. New York: Springer 2014: 189–199.
- Islam MN, Moriam S, Umer M et al. Naked-eye and electrochemical detection of isothermally amplified HOTAIR long non-coding RNA. *Analyst* 2018; 143(13): 3021–3028. doi: 10.1039/c7an02109g.
- Liu F, Li T, Zhang L et al. PAMAM/polyhedral nanogold-modified probes with DNAase catalysis for the amperometric electrochemical detection of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1. *J Biol Eng* 2019; 13(1): 21. doi: 10.1186/s13036-019-0149-4.
- Kim T, Cui R, Jeon YJ et al. Long-range interaction and correlation between MYC enhancer and oncogenic long noncoding RNA CARLo-5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(11): 4173–4178. doi: 10.1073/pnas.1400350111.
- Léveillé N, Melo CA, Rooijers K et al. Genome-wide profiling of p53-regulated enhancer RNAs uncovers a subset of enhancers controlled by a lncRNA. *Nat Commun* 2015; 6: 6520. doi: 10.1038/ncomms7520.
- Lian Y, Yan C, Xu H et al. A novel lncRNA, LINC00460, affects cell proliferation and apoptosis by regulating KLF2 and CUL4A expression in colorectal cancer. *Mol Ther Nucl Acid* 2018; 12: 684–697. doi: 10.1016/j.omtn.2018.06.012.
- Zhao J, Du P, Cui P et al. lncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer. *Oncogene* 2018; 37(30): 4094–4109. doi: 10.1038/s41388-018-0250-z.
- Munschauer M, Nguyen CT, Sirokman K et al. The NORAD lncRNA assembles a topoisomerase complex critical for genome stability. *Nature* 2018; 561(7721): 132–136. doi: 10.1038/s41586-018-0453-z.

57. Huang D, Chen J, Yang L et al. NKILA lncRNA promotes tumor immune evasion by sensitizing T cells to activation-induced cell death. *Nat Immunol* 2018; 19(10): 1112–1125. doi: 10.1038/s41590-018-0207-y.
58. Zhang X, Rice K, Wang Y et al. Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology* 2010; 151(3): 939–947. doi: 10.1210/en.2009-0657.
59. Svoboda M, Slyskova J, Schneiderova M et al. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis* 2014; 35(7): 1510–1515. doi: 10.1093/carcin/bgu055.
60. Li X, Wu Z, Mei Q et al. Long non-coding RNA HOTAIR, a driver of malignancy, predicts negative prognosis and exhibits oncogenic activity in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2013; 109(8): 2266–2278. doi: 10.1038/bjc.2013.548.
61. Okugawa Y, Toiyama Y, Hur K et al. Metastasis-associated long non-coding RNA drives gastric cancer development and promotes peritoneal metastasis. *Carcinogenesis* 2014; 35(12): 2731–2739. doi: 10.1093/carcin/bgu200.
62. Guo W, Dong Z, Bai Y et al. Associations between polymorphisms of HOTAIR and risk of gastric cardia adenocarcinoma in a population of north China. *Tumor Biol* 2015; 36(4): 2845–2854. doi: 10.1007/s13277-014-2912-y.
63. Crawford ED, Rove KO, Trabulsi EJ et al. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases. *J Urol* 2012; 188(5): 1726–1731. doi: 10.1016/j.juro.2012.07.023.
64. Roobol MJ, Schröder FH, van Leeuwen P et al. Performance of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) gene and prostate-specific antigen in prescreened men: exploring the value of PCA3 for a first-line diagnostic test. *Eur Urol* 2010; 58(4): 475–481. doi: 10.1016/j.eururo.2010.06.039.
65. Ochiai A, Okihara K, Kamoi K et al. Clinical utility of the prostate cancer gene 3 (PCA3) urine assay in Japanese men undergoing prostate biopsy. *BJU Int* 2013; 111(6): 928–933. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11683.x.
66. Ji P, Diederichs S, Wang W et al. MALAT-1, a novel non-coding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2003; 22(39): 8031–8041. doi: 10.1038/sj.onc.1206928.
67. Wang Z, Katsaros D, Biglia N et al. High expression of long non-coding RNA MALAT1 in breast cancer is associated with poor relapse-free survival. *Breast Cancer Res Treat* 2018; 171(2): 261–271. doi: 10.1007/s10549-018-4839-2.

Interakce onkogenních virových proteinů s proteiny rodiny p53

Oncogenic Viral Protein Interactions with p53 Family Proteins

Brychtová V., Hrabal V., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Buněčná transformace způsobená virovou infekcí je komplexní proces, kterého se účastní virové molekuly, hostitelská buňka a faktory okolního prostředí. Viry nejsou schopné samostatné reprodukce, a proto využívají signální, proteosyntetické a metabolické dráhy hostitelské buňky. Jedním z cílů virových molekul je nádorový supresor p53. Proteiny onkogenních virů jsou schopné funkčně inaktivovat p53, a tím deregulovat expresi mnoha genů zúčastněných při apoptóze, proliferaci a buněčné odpovědi na poškození DNA. Proteiny HbX viru hepatitidy B a NS2 a NS5A viru hepatitidy C interagují s p53, znemožňují jeho lokalizaci do jádra, a tím snižují jeho transkripční aktivitu. Dalším způsobem inaktivace p53 je zvýšení jeho degradace, čehož využívá virus Epstein-Barrové prostřednictvím proteinu BZLF1, virus Kaposiho sarkomu skrze protein LANA a lidské papilomaviry za účasti proteinu E6. Velký T antigen lidského polyomaviru Merkelových buněk přímo neinteraguje s p53, ale snižuje úroveň transkripce zprostředkované p53. Tax protein lidského T buněčného lymfotropního viru 1 posttranslačně modifikuje p53 a brání jeho interakci s transkripčními kofaktory. Protein p53 je jedním z nejprostudovanějších proteinů kvůli své nádorové supresorové funkci a úloze při udržování integrity genomu buňky. Díky tomu jsou také intenzivně studovány jeho evolučně příbuzné homology p63 a p73, které hrají roli při vývoji organismu. Jejich úloha v onkogenezi ještě nebyla úplně objasněna. **Cíl:** Tento přehledový článek popisuje dosud známé interakce proteinů p53, p63 a p73 s proteiny onkogenních virů.

Klíčová slova

viry – virové proteiny – p53 – p63 – p73 – tumorigeneze

Summary

Background: Cellular transformation induced by oncogenic viruses is a complex process including viral molecules, host cells and environmental factors. Viruses alone are unable to reproduce and thus they need a host to use their signalling, proteosynthetic and metabolic pathways. One target host molecule is the p53 tumour suppressor. Viral proteins functionally inactivate p53 and deregulate the expression of proteins active during apoptosis, cell proliferation and DNA damage response. Hepatitis virus B HbX protein and hepatitis virus C proteins NS2 and NS5A interact with p53 and prevent its localisation to the nucleus and thus reduce its transcriptional activity. Another mechanism lies in elevated p53 degradation caused by the BZLF1 protein of the Epstein-Barr virus, the LANA protein of the Kaposi sarcoma virus and human papilloma virus E6. The Merkel cell polyomavirus large T antigen does not interact directly with p53, however it acts through downregulation of p53 mediated transcription. The tax protein of human T cell lymphotropic virus type 1 modifies p53 posttranslationally and thus blocks its interaction with other factors of transcription machinery. Due to its tumour suppressor function and role in the maintenance of the genome integrity, the p53 protein is one of the best studied proteins. Following this, evolutionary homologues with important developmental functions p63 and p73 are intensively studied as well. Their roles in oncogenesis have not been clarified yet. **Purpose:** This review describes some of their known interactions with oncogenic viral proteins.

Key words

viruses – viral proteins – p53 – p63 – p73 – tumorigenesis

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

The work was supported 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 recommendation for biomedical papers.



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

Obdrženo/Submitted: 12. 6. 2019
Přijato/Accepted: 12. 8. 2019

doi: 10.14735/amko20193572

Úvod

Nádorová onemocnění zahrnují komplexní skupinu nemocí s různou etiologií. Jedním z faktorů podporujících nádorovou transformaci buněk jsou infekční agens zahrnující bakterie, viry a parazity [1]. Příspěvek virů k nádorové transformaci není v některých případech zcela jasný, na druhou stranu přítomnost některých virů jako např. lidského papilomaviru (human papillomavirus – HPV) byla celosvětově prokázána u více než 90 % případů invazivního karcinomu děložního hrdla [2]. Je známo, že samotná virová infekce není dostačující a nepůsobí jako kompletní karcinogen pro vznik nádoru, ale její úloha spočívá spíše v iniciaci nádorové transformace a podpoře nádorové progresu.

Lidské onkogenní viry (onkoviry) zahrnují širokou skupinu druhů, které využívají odlišné strategie. Mechanizmy, kterými zásadně přispívají ke vzniku nádorů, mají však společné rysy a ovlivňují stejné dráhy zapojené do kontroly buněčného cyklu [3]. Je známo, že virus v průběhu latentní infekce způsobuje změny na úrovni hostitelského genomu vznikem mutací a chromozomálních změn. Kromě genetických změn se v infikovaných buňkách kumulují i epigenetické změny vedoucí k aberantní metylaci hostitelských genů [4]. Cílem virových proteinů jsou především hostitelské proteiny regulující proliferaci, apoptózu, genomovou stabilitu, diferenciaci a rozpoznání imunitním systémem [5,6]. Z hlediska nádorové biologie jsou významné interakce virových proteinů s nádorovými supresory p53 a Rb, přičemž onkogenní potenciál virů spočívá především v jejich schopnosti potlačovat aktivitu nádorového supresoru p53 [7].

TP53 je nádorový supresorový gen – hlavní člen p53 rodiny proteinů, který se významně podílí na udržení genomové stability buněk. Protein p53 funguje jako kontrolní systém, který reaguje na různé stresové signály v buňkách a reguluje geny reagující na poškození DNA, hypoxii, apoptózu, senescenci a další [8,9]. Množství onkogenních virů kóduje onkoproteiny, které interagují s proteiny p53, p63 a p73 a různými mechanismy ovlivňují jejich aktivitu. U nádorů spo-

jených s virovou infekcí se zřídka vyskytují mutace nádorových supresorových genů a p53 je většinou inaktivován přímou interakcí s virovým proteinem nebo nepřímo skrze ovlivnění aktivity dalších signálních molekul.

Kromě onkogenních virů s p53 interaguje také další skupina virů, které nemají onkogenní potenciál a jimiž způsobená infekce nevede ke vzniku nádoru. Mezi tyto viry patří např. Zika virus, virus západonilské horečky, HIV-1 virus a další. Přehledně shrnuto v Aloni-Grinstein et al [10].

Onkogenní viry a nádorový supresor p53

Onkogenní viry přispívají k procesu neoplastické transformace buněk. V průběhu koevoluce se svými hostiteli si vyvinuly různé mechanismy pro zajištění reprodukce a k úniku před imunitním systémem hostitele [11]. V roce 1911 prováděl Peyton Rous experimenty na kuřatech, v rámci nichž zdravá kuřata infikoval filtrátem z tumoru kuřat se sarkomem. U infikovaných kuřat se následně začaly objevovat novotvary. Tyto experimenty vedly k objevu prvního zvířecího onkogenního viru, viru Rousova sarkomu [12]. První lidský onkogenní virus byl objeven až v roce 1964 Epsteinem a Barrovou. Pomocí elektronové mikroskopie pozorovali virové částice v buňkách Burkittova lymfomu [13]. Doposud bylo objeveno nejméně sedm virů, které jsou spojeny s tvorbou malignit u lidí. Patří mezi ně lidský polyomavirus Merkelových buněk (Merkel cell polyomavirus – MCPyV), viry z čeledi *Herpesviridae*: virus Epstein-Barrové (Epstein-Barr virus – EBV) a virus Kaposiho sarkomu (Kaposi sarcoma-associated virus – KSHV), virus hepatitidy B (hepatitis B virus – HBV), HPV, virus hepatitidy C (hepatitis C virus – HCV), lidský T buněčný lymfotropní virus typu I (human T-lymphotropic virus type 1 – HTLV-1); charakteristiky virů jsou přehledně shrnuty v tab. 1 [14].

Lidský polyomavirus Merkelových buněk

MCPyV je polyomavirus asociovaný s karcinomem z Merkelových buněk, velmi agresivním neuroendokrinním kož-

ním nádorem. Poprvé byly virové sekvence izolovány z karcinomu z Merkelových buněk v roce 2008 [15]. MCPyV je malý neobalený virus s genomem v podobě cirkulární dvouřetězcové molekuly DNA o velikosti přibližně 5,4 kb [16]. Genom MCPyV kóduje proteiny rané fáze exprese: malý T antigen (small T antigen – sT), velký T antigen (large T antigen – LT), 57kT antigen a proteiny pozdní fáze exprese VP1, VP2 [15,17,18].

Velký T antigen se přímo neváže na p53, ale pravděpodobně spolu nepřímo interagují. V luciferázovém reportérovém systému v buňkách H1299 transfekovaných různým titrem velkého T antigenu byla pozorována inhibice transaktivace reportérového konstruktu proteinem p53 [19]. Malý T antigen funguje jako aktivátor transkripce MDM2 a CK1 α , který následně ve spolupráci s MDM4 inhibuje funkci p53 v buňkách karcinomu z Merkelových buněk [20].

Virus Epstein-Barrové

EBV je gamma herpesvirus 4 spojený s řadou malignit B lymfocytů, T lymfocytů, NK (natural killer) buněk a epitelálních karcinomů [5]. Genom EBV je tvořen lineární dvouřetězcovou DNA o délce 172 kb [21] a kóduje přibližně 85 genů [22].

Latentní membránový protein 1 v epitelálních buňkách indukuje expresi TNF α indukovaného proteinu 3, který zabraňuje apoptóze zprostředkované proteinem p53 [23]. Virový protein BZLF1 funguje jako adaptor Elongin B/C-Cul2/5-SOCS-box protein ubiquitin ligázového komplexu, který označuje p53 pro degradaci, a tím snižuje jeho hladinu v buňce [24]. Jaderný antigen 3C viru Epstein-Barrové podporuje tvorbu komplexu s p53 a Gemin3 *in vivo*, a tím následně inhibuje transaktivaci p53 a apoptózu buňky [25].

Virus Kaposiho sarkomu

KSHV neboli lidský herpesvirus 8 je gamma herpesvirus a je jednou z příčin vzniku Kaposiho sarkomu [26]. Genom HHV8 představuje lineární dvouřetězcovou DNA o délce přibližně 165 kb [27]. Kóduje přibližně 90 genů a několik nekódujících RNA vč. mikroRNA (miRNA) [27,28].

Tab. 1 . Charakteristika jednotlivých onkogenních virů vč. jejich taxonomického zařazení, typu a velikosti genomu, buněčného tropismu, nádorových onemocnění, se kterými jsou spojeny, a virových molekul ovlivňujících aktivitu p53.

Virus	EBV	KSHV	HPV	MCPyV	HCV	HTLV-1	HBV
Taxonomie							
Skupina	I (dsDNA)	I (dsDNA)	I (dsDNA)	I (dsDNA)	IV (+ssRNA)	VI (ssRNA-RT)	VII (dsDNA-RT)
Čeleď	<i>Herpesviridae</i>	<i>Herpesviridae</i>	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Polyomaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Retroviridae</i>	<i>Hepadnaviridae</i>
Rod	lymphocryptovirus	rhadinovirus	alphapapillomavirus	alphapolyomavirus	hepacivirus	deltaretrovirus	orthohepadnavirus
Genom							
Nukleová kyselina	dsDNA	dsDNA	dsDNA	dsDNA	+ssRNA	ssRNA-RT	dsDNA-RT
Velikost genomu (kb)	172	165	8	5,4	9,6	9	3,2 [67]
Počet genů	85	90	8	5 [68]	9	4	4 [69]
Buněčný tropismus	lymfocyty, epiteliální buňky	B lymfocyty [70], endoteliální buňky [71]	buňky dlaždicového epitelu [72]	Merkelovy buňky	hepatocyty	T lymfocyty	hepatocyty
Nádorové onemocnění	Burkittův lymfom, nasofaryngeální karcinom [73], Hodgkinův lymfom [74], non-Hodgkinův lymfom [73]	Kaposiho sarkom, primární efuční lymfom [70]	nádory v anogenitální oblasti, nádory hlavy a krku	karcinom z Merkelových buněk	hepatocelulární karcinom	T buněčný lymfom dospělých	hepatocelulární karcinom
Virové molekuly ovlivňující aktivitu p53	LMP1, BZLF1, EBNA3C	ORF22, ORF 25, ORF 64, LANA, vIRF	E6, E7	LT, sT	NS2, NS3, NS5A, NS5B	Tax	HbX

EBV – virus Epstein-Barrové, KSHV – virus Kaposiho sarkomu, HPV – lidský papilomavirus, MCPyV – polyomavirus Merkelových buněk, HCV – virus hepatitidy C, HTLV-1 – lidský T buněčný lyfotropní virus typu I, HBV – virus hepatitidy B, dsDNA – dvouvláknová DNA, ssRNA – jednovláknová RNA, RT – se zpětnou transkripcí

Virové strukturální proteiny glykoprotein H (ORF22), hlavní kapsidový protein (ORF25) a tegumentový protein (ORF64) inhibují apoptózu zprostředkovanou proteinem p53. Všechny tři proteiny snižují úroveň exprese Bax a PIG3 [29], které jsou regulované proteinem p53 na transkripční úrovni [30,31]. Bax je aktivátor mitochondriální cesty apoptózy [32] a PIG3 se účastní buněčné odpovědi na poškození DNA [31]. S latencí asociovaný jaderný antigen (latency associated nuclear antigen – LANA) interaguje s p53 vazbou na jeho DNA-vazebnou doménu a zvyšuje úroveň polyubiquitinace a následné degradace p53 v proteazomu [33]. Virový interferon regulující faktor (viral interferon regula-

tory factor – vIRF) interaguje s p53 a snižuje úroveň fosforylace a acetylace p53, což inhibuje transkripční aktivaci proapoptotických proteinů p21 a Bax zprostředkovanou p53 [34].

Virus hepatitidy B

HBV je malý obalený virus, který vykazuje preferenční tropismus k hepatocytům. Epidemiologické studie ukazují souvislost mezi chronickou infekcí HBV a rozvojem hepatocelulárního karcinomu. Bylo popsáno osm genotypů a genom HBV je co do velikosti nejmenším lidským DNA virem.

Zásadní roli v transformaci hraje virový protein HbX (HBV kódovaný protein X;

16,5 kDa) kódovaný genem X. Jedná se o protein exprimovaný v průběhu akutní i chronické infekce, který se podílí na replikaci viru *in vivo* jako transaktivátor virových genů i genů hostitelské buňky. Protein HbX je sám o sobě slabým onkogenem, avšak na myších a buněčných modelech bylo ukázáno, že je schopný aktivovat signální dráhy, jako je MAP kinázová, Ras a Src a podporovat tak maligní transformaci buněk [35].

Jednou z hlavních nádorově supresorových funkcí proteinu p53 je schopnost indukovat apoptózu. Řada publikací ukazuje inaktivaci p53 v důsledku jeho interakce s proteinem HbX, který funguje jako transkripční kotransak-

tivátor. Z hlediska nádorové transformace je významná schopnost proteinu HbX způsobovat defekty v průběhu mitotického dělení. Vazbou na proteiny BubR1 a HBXIP narušuje jejich funkci při tvorbě mikrotubulů a dělicího vřeténka a podporuje tak chromozomální nestabilitu.

Při infekci jaterních buněk dochází k integraci virové DNA do DNA hostitelských buněk, a to jak v repetitivních oblastech, tak v oblastech aktivně přepisovaných genů. Často tak dochází ke vzniku chimérických virově-buněčných proteinů.

Z hlediska inaktivace p53 byly u hepatocelulárního karcinomu popsány dva hlavní mechanismy účinku onkovirů. Jedním z nich je přímá interakce proteinu HbX s proteinem p53 prostřednictvím jeho C-konce, která brání vstupu p53 do jádra [36]. Druhým je inhibice p53 prostřednictvím interakce s vysoce exprimovanou (v důsledku HbX) dlouhou nekódující RNA HUR1 (lnc HUR1), která inhibuje transkripční aktivaci p21 a Bax [37].

Lidský papilomavirus

HPV je malý neobalený virus tvořený dvouřetězcovou DNA o velikosti přibližně 8 kb, která kóduje osm genů vedoucích ke vzniku strukturních (L1, L2) a nestrukturních proteinů (E1, E2, E4, E5, E6 a E7). Z hlediska nádorové transformace jsou významné virové onkogeny E5, jejichž exprese vede k transformaci hostitelských buněk. Proteiny E6 a E7 interagují s nádorovými supresory p53 a pRb [38]. HPV zahrnují více než 200 typů rozdělených do pěti rodů, přičemž v rámci rodu alfa se na základě jejich onkogenního potenciálu rozlišují low-risk a high-risk kmeny [39]. Typy HPV-16, HPV-18 a HPV-31, HPV-33 a HPV-42 patří do high-risk skupiny a vedou ke vzniku nádorů v anogenitální oblasti a v oblasti hlavy a krku [40]. Typy HPV-6 a HPV-11 patří do skupiny low-risk a infekce jimi má za následek benigní proliferaci buněk [39].

Rozdíl mezi high-risk a low-risk typy HPV spočívá v lokalizaci a afinitě vazby HPV E6 s p53. U high-risk typů mechanismus degradace vyžaduje nejprve vazbu E6 na krátký motiv LxxLL E6-asociova-

ného proteinu (E6AP) ubiquitin ligázy, při které dochází k vytvoření vazebné kapsy potřebné pro interakci s p53 [26]. Následuje polyubiquitinace a degradace p53 ubiquitin-proteazomovou dráhou. High-risk E6 touto cestou podporuje proliferaci nádorových buněk [41]. High-risk E6 má dvě vazebná místa pro p53 – jedno v centrální oblasti, které se podílí na tvorbě heterotrimerního komplexu a degradaci p53, a druhé na C-konci p53. Vazby na C-konci se neúčastní E6AP a není relevantní z hlediska degradace p53 [42].

Low-risk HPV E6 také váže p53 v C-oblasti, ale tato interakce nijak neovlivňuje degradaci proteinu p53. Obecně se udává, že low-risk E6 interaguje s p53 s mnohem nižší afinitou [43].

Kromě uvedeného mají high-risk E6 i E7 množství dalších funkcí jako inhibice diferenciaci, apoptózy a imunitní odpovědi [44].

Virus hepatitidy C

Podobně jako u HBV je chronická infekce HCV častou příčinou vzniku hepatocelulárního karcinomu. Ačkoliv není zcela zřejmé, zdali je mechanismus vedoucí ke vzniku hepatocelulárního karcinomu vlivem HCV přímý, nebo nepřímý, mnoho prací poukazuje na epigenetické změny v hepatocytech infikovaných HCV [45].

HCV je malý obalený RNA virus, jehož genom tvořený jednořetězcovou RNA o velikosti přibližně 9,6 kb kóduje polyprotein o velikosti přibližně 3 000 aminokyselin. Virový polyprotein je po translaci štěpen virovými i hostitelskými proteázami na 10 menších strukturních a nestrukturních proteinů (C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B), z nichž většina je multifunkčních. Replikace viru probíhá v cytoplazmě, a nedochází tak k integraci virových sekvencí do genomu hostitelské buňky [46,47].

Virové proteiny NS2, NS3 a NS5A jsou zmiňovány v souvislosti s kancerogenezi, přičemž mezi jejich cíle v hostitelských buňkách patří i protein p53. Dráha proteinu p53 se zřejmě stala cílem virových proteinů z důvodu snahy o zablkování apoptózy nebo zastavení růstu infikovaných buněk, které umožňují přežití virů [48–50].

Virová cystein-proteáza NS2 vede ke změně lokalizace p53 v buňkách a brání buněčné odpovědi na poškození DNA. Přímá interakce mezi p53 a NS2 ani změna na úrovni regulace exprese p53 řízených genů však nebyla pozorována [48]. Na rozdíl od NS2 interaguje virová serin-proteáza NS3 svým N-koncem s C-koncovou oblastí proteinu p53 v oblasti oligomerizační domény, a je tedy možné, že tak brání tetramerizaci p53 [49]. Dalším z virových proteinů je NS5A, který přímo interaguje s proteinem p53 na jeho N-konci a zadržuje jej v perinukleárním prostoru buněk. Následkem toho klesá hladina proteinu p53 v jádře a je snížena exprese p53 regulovaných genů [50,51].

Některé práce ukazují, že HCV infekce může ovlivňovat aktivitu proteinu p53 nepřímo. NS5B interaguje s RNA helikázou DDX5 (p68), která je transkripčním koaktivátorem p53. Relokalizací DDX5 do cytoplazmy dochází k omezení její aktivity v jádře a snížení exprese p53 [52].

Lidský T buněčný lymfotropní virus typu I

HTLV-1 je první identifikovaný retrovirus, u kterého byla prokázána souvislost s rozvojem nádorového onemocnění, a to T buněčnou lymfocytární leukémií/lymfomem dospělých (ATLL). Kromě uvedeného způsobuje infekce virem HTLV-1 také další onemocnění, jako je s HTLV-1 spojená myelopatie/tropická spastická paraparéza, uveitidy a chronické neurovegetativní poruchy. Udává se, že až u 5 % infikovaných jedinců se po době latence, která může trvat řádově desítky let, rozvíjí ATLL [53].

HTLV-1 kóduje virový protein Tax a jeho exprese uděluje hostitelským buňkám imortalizovaný fenotyp a vede ke vzniku nádorů. Cílem proteinu Tax v buňkách jsou klíčové molekuly řídící proliferaci, buněčný cyklus a další významné signální dráhy, mezi jinými i nádorový supresor p53 [54].

Ukazuje se, že většina buněk infikovaných HTLV-1 nese wild type p53, který je ale funkčně inaktivovaný proteinem Tax. Bylo popsáno množství mechanismů vedoucích k transkripční inaktivaci p53, které nepřímo ovlivňují aktivitu p53. Ve

většinu případů protein Tax brání interakci transkripčních faktorů s jejich ko-faktory, čímž reguluje jejich transkripční aktivitu. Dochází především k hyperfosforylaci p53 na Ser15 a Ser392, která brání interakci s transkripčním faktorem TFIID a transkripčně znevýhodňuje p53 [55], a dále k inhibici p53 fosfatázou Wip1 zprostředkovanou modulací jaderných faktorů p300/CBP [53].

Onkogenní viry a proteiny p63 a p73

Proteiny p53, p63 a p73 jsou evolučně příbuzné, vykazují vysokou sekvenční homologii a podobnou doménovou strukturu. Obsahují tři hlavní funkční domény: N-koncovou transaktivací doménu (TA), centrální DNA-vazebnou doménu a oligomerizační doménu [56–58]. Proteiny p63 a p73 byly popsány roku 1998 [57], resp. 1997 [59], tedy až téměř 20 let po objevu p53 [60].

Latentní membránový protein 1 viru EBV indukuje expresi Δ Np73 v maligních B buňkách [61]. Izoforna Δ Np73 je dominantní negativní inhibitor p53 [62].

Jaderný antigen 3C viru Epstein-Barrové interaguje s p73 a v buněčných liniích SAOS-2 a HCTp53^{-/-}, které neexprimují p53, inhibuje apoptózu indukovanou doxorubicinem [63].

Jaderný protein viru HCV koimunoprecipituje s izoformami p73 α a p73 β v buněčných liniích HepG2 a SAOS-2. Interakce jaderného proteinu HCV s oběma izoformami p73 vede k jeho translokaci do jádra buňky. Nízká úroveň exogenní exprese jaderného proteinu HCV v buněčné linii SAOS-2 na reportérovém plazmidu zvyšuje úroveň aktivace promotoru p21 zprostředkované p73 α a p73 β . Naopak vysoká úroveň exogenní exprese snižuje schopnost p73 α aktivovat promotor p21, ale na schopnost aktivace proteinem p73 β vliv nemá [64].

V HeLa buňkách vystavených působení cykloheximidu a kotransfekovaných s HPV18 E6 a zvláště p53, TAp63 β nebo Δ Np63 β byla pozorována zvýšená rychlost degradace TAp63 β ve srovnání s Δ Np63 β . Degradace p53 pak probíhala nejrychleji. Izoforna TAp63 β hraje úlohu při formaci fokálních adhezí v epiteliálních buňkách. Snižování stability TAp63 β

vlivem E6 může přispívat k buněčné transformaci indukci růstu nezávislého na ukotvení buňky [65].

High-risk HPV E7 onkoprotein indukuje expresi proteinu p63, který hraje důležitou roli při opravě poškození DNA v buněčných liniích odvozených od karcinomu děložního čípku. High-risk HPV E7 indukovaná exprese p63 by tedy mohla být zásadním faktorem ovlivňujícím senzitivitu buněk karcinomu děložního čípku k radioterapii [66].

Závěr

Virová onkogeneze je komplexní proces, který závisí na interakci virů s hostitelskými proteiny. Onkoviry kódují regulační proteiny, které mají schopnost pozměňovat buněčnou signalizaci a ovlivňovat tak proliferaci hostitelských buněk. Tumorigeneze související s virovou infekcí spočívá v oslabení aktivity nádorového supresoru p53, přičemž mechanismus spočívá v přímé či nepřímé interakci. Důsledkem těchto interakcí je snížení stability p53, inhibice transkripce cílových genů p53 nebo zabránění translokace p53 do jádra, kde plní funkci jako transkripční faktor. Kromě interakcí s nádorovým supresorem p53 byly popsány i interakce s příbuznými proteiny p63 a p73, jejichž funkce jsou virovými proteiny také ovlivněny.

Literatura

- de Martel C, Ferlay J, Franceschi S et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012; 13(6): 607–615. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1): 12–19. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F.
- McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782(3): 127–150. doi: 10.1016/j.bbdis.2007.12.005.
- Fernandez AF, Esteller M. Viral epigenomes in human tumorigenesis. *Oncogene* 2010; 29(10): 1405–1420. doi: 10.1038/onc.2009.517.
- Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* 2014; 15(3): 266–282. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.011.
- Tornesello ML, Annunziata C, Tornesello AL et al. Human oncoviruses and p53 tumor suppressor pathway deregulation at the origin of human cancers. *Cancers (Basel)* 2018; 10(7): E213. doi: 10.3390/cancers10070213.
- Tornesello ML, Buonaguro L, Buonaguro FM. An overview of new biomolecular pathways in pathogen-related cancers. *Future Oncol* 2015; 11(11): 1625–1639. doi: 10.2217/fon.15.87.

- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381): 15–16. doi: 10.1038/358015a0.
- Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(10): 749–758. doi: 10.1038/nrc2723.
- Aloni-Grinstein R, Charni-Natan M, Solomon H et al. p53 and the viral connection: back into the future (double dagger). *Cancers (Basel)* 2018; 10(6): E178. doi: 10.3390/cancers10060178.
- Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(12): 878–889. doi: 10.1038/nrc2961.
- Rous P. A Sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* 1911; 13(4): 397–411. doi: 10.1084/jem.13.4.397.
- Burkitt D. A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* 1962; 194: 232–234. doi: 10.1038/194232a0.
- Bouvard P, Baan R, Straif K et al. A review of human carcinogens – part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009; 10(4): 321–322.
- Feng H, Shuda M, Chang Y et al. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008; 319(5866): 1096–1100. doi: 10.1126/science.1152586.
- MacDonald M, You J. Merkel cell polyomavirus: a new DNA virus associated with human cancer. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1018: 35–56. doi: 10.1007/978-981-10-5765-6_4.
- Shuda M, Arora R, Kwun HJ et al. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer* 2009; 125(6): 1243–1249. doi: 10.1002/ijc.24510.
- Shuda M, Feng H, Kwun HJ et al. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(42): 16272–16277. doi: 10.1073/pnas.0806526105.
- Borchert S, Czech-Sioli M, Neumann F et al. High-affinity Rb binding, p53 inhibition, subcellular localization, and transformation by wild-type or tumor-derived shortened Merkel cell polyomavirus large T antigens. *J Virol* 2014; 88(6): 3144–3160. doi: 10.1128/JVI.02916-13.
- Park DE, Cheng J, Berrios C et al. Dual inhibition of MDM2 and MDM4 in virus-positive Merkel cell carcinoma enhances the p53 response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019; 116(3): 1027–1032. doi: 10.1073/pnas.1818798116.
- Baer R, Bankier AT, Biggin MD et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 1984; 310(5974): 207–211. doi: 10.1038/310207a0.
- de Jesus O, Smith PR, Spender LC et al. Updated Epstein-Barr virus (EBV) DNA sequence and analysis of a promoter for the BART (CST, BARF0) RNAs of EBV. *J Gen Virol* 2003; 84(Pt 6): 1443–1450. doi: 10.1099/vir.0.19054-0.
- Fries KL, Miller WE, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* 1996; 70(12): 8653–8659.
- Sato Y, Kamura T, Shirata N et al. Degradation of phosphorylated p53 by viral protein-ECS E3 ligase complex. *PLoS Pathog* 2009; 5(7): e1000530. doi: 10.1371/journal.ppat.1000530.
- Cai Q, Guo Y, Xiao B et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C stabilizes Gemin3 to block p53-mediated apoptosis. *PLoS Pathog* 2011; 7(12): e1002418. doi: 10.1371/journal.ppat.1002418.
- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 266(5192): 1865–1869. doi: 10.1126/science.7997879.
- Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC et al. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(25): 14862–14867. doi: 10.1073/pnas.93.25.14862.

28. Samols MA, Hu J, Skalsky RL et al. Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 2005; 79(14): 9301–9305. doi: 10.1128/JVI.79.14.9301-9305.2005.
29. Chudasama P, Konrad A, Jochmann R et al. Structural proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus antagonize p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2015; 34(5): 639–649. doi: 10.1038/onc.2013.595.
30. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80(2): 293–299. doi: 10.1016/0092-8674(95)90412-3.
31. Polyak K, Xia Y, Zweier JL et al. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389(6648): 300–305. doi: 10.1038/38525.
32. Gross A, Jockel J, Wei M et al. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 1998; 17(14): 3878–3885. doi: 10.1093/emboj/17.14.3878.
33. Suzuki T, Isobe T, Kitagawa M et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA positively affects on ubiquitylation of p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 403(2): 194–197. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.004.
34. Nakamura H, Li M, Zarycki J et al. Inhibition of p53 tumor suppressor by viral interferon regulatory factor. *J Virol* 2001; 75(16): 7572–7582. doi: 10.1128/JVI.75.16.7572-7582.2001.
35. Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review). *Int J Oncol* 1999; 15(2): 373–379. doi: 10.3892/ijo.15.2.373.
36. Elmore LW, Hancock AR, Chang SF et al. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(26): 14707–14712. doi: 10.1073/pnas.94.26.14707.
37. Liu N, Liu Q, Yang X et al. Hepatitis B virus-upregulated LNC-HUR1 promotes cell proliferation and tumorigenesis by blocking p53 activity. *Hepatology* 2018; 68(6): 2130–2144. doi: 10.1002/hep.30098.
38. Vousden KH, Doniger J, DiPaolo JA et al. The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. *Oncogene Res* 1988; 3(2): 167–175.
39. Doorbar J, Egawa N, Griffin H et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 2015; 25 (Suppl 1): 2–23. doi: 10.1002/rmv.1822.
40. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286–2302.
41. Crook T, Tidy JA, Vousden KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 1991; 67(3): 547–556. doi: 10.1016/0092-8674(91)90529-8.
42. Li X, Coffino P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol* 1996; 70(7): 4509–4516.
43. Oh ST, Longworth MS, Laimins LA. Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11. *J Virol* 2004; 78(5): 2620–2626. doi: 10.1128/jvi.78.5.2620-2626.2004.
44. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 2009; 19(2): 97–113. doi: 10.1002/rmv.605.
45. Hamdane N, Juhling F, Crouch E et al. HCV-induced epigenetic changes associated with liver cancer risk persist after sustained virologic response. *Gastroenterology* 2019; 156(8): 2313–2329. doi: 10.1053/j.gastro.2019.02.038.
46. Bühler S, Bartschlag R. Promotion of hepatocellular carcinoma by hepatitis C virus. *Dig Dis* 2012; 30(5): 445–452. doi: 10.1159/000341688.
47. McGivern DR, SM Lemon. Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. *Oncogene* 2011; 30(17): 1969–1983. doi: 10.1038/onc.2010.594.
48. Bittar C, Shrivastava S, Bhanja Chowdhury J et al. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits DNA damage pathway by sequestering p53 to the cytoplasm. *PLoS One* 2013; 8(4): e62581. doi: 10.1371/journal.pone.0062581.
49. Ishido S, Hotta H. Complex formation of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor. *FEBS Lett* 1998; 438(3): 258–262. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01312-x.
50. Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ et al. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002; 21(31): 4801–4811. doi: 10.1038/sj.onc.1205589.
51. Majumder M, Ghosh AK, Steele R et al. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 2001; 75(3): 1401–1407. doi: 10.1128/JVI.75.3.1401-1407.2001.
52. Goh PY, Tan YJ, Lim SP et al. Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol* 2004; 78(10): 5288–5298. doi: 10.1128/jvi.78.10.5288-5298.2004.
53. Zane L, Yasunaga J, Mitagami Y et al. Wip1 and p53 contribute to HTLV-1 Tax-induced tumorigenesis. *Retrovirology* 2012; 9: 114. doi: 10.1186/1742-4690-9-114.
54. Pise-Masison CA, Mahieux R, Jiang H et al. Inactivation of p53 by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax requires activation of the NF- κ B pathway and is dependent on p53 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2000; 20(10): 3377–3386. doi: 10.1128/mcb.20.10.3377-3386.2000.
55. Tabakin-Fix Y, Azran I, Schavinsky-Kharpunsky Y et al. Functional inactivation of p53 by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein: mechanisms and clinical implications. *Carcinogenesis* 2006; 27(4): 673–681. doi: 10.1093/carcin/bgi274.
56. Vogelstein B, Kinzler KW. Tumour-suppressor genes. X-rays strike p53 again. *Nature* 1994; 370(6486): 174–175. doi: 10.1038/370174a0.
57. 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.
58. Yang A, Walker N, Bronson R et al. p73-deficient mice have neurological, phenomonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000; 404(6773): 99–103. doi: 10.1038/35003607.
59. Kaghad M, Bonnet H, Yang A et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; 90(4): 809–819. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80540-1.
60. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278(5701): 261–263. doi: 10.1038/278261a0.
61. Accardi R, Fathallah I, Gruffat H et al. Epstein-Barr virus transforming protein LMP-1 alters B cells gene expression by promoting accumulation of the oncoprotein DeltaNp73alpha. *PLoS Pathog* 2013; 9(3): e1003186. doi: 10.1371/journal.ppat.1003186.
62. Accardi R, Scalise M, Gheit T et al. IkappaB kinase beta promotes cell survival by antagonizing p53 functions through DeltaNp73alpha phosphorylation and stabilization. *Mol Cell Biol* 2011; 31(11): 2210–2226. doi: 10.1128/MCB.00964-10.
63. Sahu SK, Mohanty S, Kumar A et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interact with p73: Interplay between a viral oncoprotein and cellular tumor suppressor. *Virology* 2014; 448: 333–343. doi: 10.1016/j.viro.2013.10.023.
64. Alisi A, Giambartolomei S, Cupelli F et al. Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene* 2003; 22(17): 2573–2580. doi: 10.1038/sj.onc.1206333.
65. Ben Khalifa Y, Teissier S, Tan MK et al. The human papillomavirus E6 oncogene represses a cell adhesion pathway and disrupts focal adhesion through degradation of TAp63beta upon transformation. *PLoS Pathog* 2011; 7(9): e1002256. doi: 10.1371/journal.ppat.1002256.
66. Eldakhkhny S, Zhou Q, Crosbie EJ et al. Human papillomavirus E7 induces p63 expression to modulate DNA damage response. *Cell Death Dis* 2018; 9(2): 127. doi: 10.1038/s41419-017-0149-6.
67. Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 1980; 21(3): 801–809. doi: 10.1016/0092-8674(80)90443-2.
68. DeCaprio JA. Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2017; 372(1732): 20160276. doi: 10.1098/rstb.2016.0276.
69. Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol* 2004; 78(23): 12725–12734. doi: 10.1128/JVI.78.23.12725-12734.2004.
70. Staskus KA, Sun R, Miller G et al. Cellular tropism and viral interleukin-6 expression distinguish human herpesvirus 8 involvement in Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castlemans disease. *J Virol* 1999; 73(5): 4181–4187.
71. Raghu H, Sharma-Walia N, Veetil MW et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytotic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *J Virol* 2009; 83(10): 4895–4911. doi: 10.1128/JVI.02498-08.
72. D'Souza G, Burk RD, Zhong Y et al. Cervicovaginal human papillomavirus (HPV)-infection before and after hysterectomy: evidence of different tissue tropism for oncogenic and nononcogenic HPV types in a cohort of HIV-positive and HIV-negative women. *Int J Cancer* 2012; 131(6): 1472–1478. doi: 10.1002/ijc.27363.
73. Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22(33): 5108–5121. doi: 10.1038/sj.onc.1206556.
74. Vrzalikova K, Sunmonu T, Reynolds G et al. Contribution of Epstein-Barr Virus Latent Proteins to the Pathogenesis of Classical Hodgkin Lymphoma. *Pathogens* 2018; 7(3): E59. doi: 10.3390/pathogens7030059.

Kooperace genomických, transkriptomických a proteomických metod v detekci mutovaných proteinů

Cooperation of Genomic, Transcriptomics and Proteomic Methods in the Detection of Mutated Proteins

Zavadil Kokáš F., Faktor J., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Současná protinádorová terapie se vyznačuje vysokou nespecifitou, a to z důvodu různorodé povahy nádorů, která významně snižuje účinnost léčby. Masivní rozvoj genomických, transkriptomických a proteomických metod v posledních desetiletích umožnil detailní charakterizaci nádorů na genomové, transkriptomové a proteomové úrovni a jejich vzájemná kombinace tak představuje potenciál, jak zvýšit efektivitu procesu detekce neoepitidů a následného navržení specifické terapie. Mezi v současné době široce používané genomické a transkriptomické metody patří zejména celogenomové, celotranskriptomové, příp. exomové sekvenování, která umožňují detekovat jednonukleotidové polymorfizmy. V případě proteomických metod, pokud je k dispozici peptidová knihovna, je možné detekovat mutované proteiny v biologickém vzorku. Nedílnou součástí kooperace těchto metod jsou softwary, které umožní interpretovat získané výsledky, jejich vizualizaci, příp. zprostředkují konverzi mezi datovými formáty často specifickými pro použitou metodu/přístroj. **Cíl:** Článek primárně popisuje bioinformatickou analýzu vzorků v rámci genomických a transkriptomických metod a jejich možné limitace a související problémy, které musí být zvaženy v průběhu analýzy, zejména týkající se kvality vstupních dat. V textu je rovněž věnována pozornost problémům vycházejícím ze zarovnání sekvencí na referenční genom. Součástí publikace je popis softwaru TransPEM, který byl vytvořen za účelem konverze výsledků analýzy jednonukleotidových polymorfizmů do podoby peptidové knihovny sekvencí využitelné k detekci neoepitidů pomocí proteomických metod. Nechybí ani stručný popis proteomických metod využívajících tuto knihovnu a představení jejich omezení.

Klíčová slova

genomika – transkriptomika – proteomika – bioinformatika – vývoj softwaru

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported 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 recommendation for biomedical papers.



Mgr. Bc. Filip Zavadil Kokáš, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: filip.zavadil@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 6. 2019
Přijato/Accepted: 26. 8. 2019

doi: 10.14735/amko20193578

Summary

Background: Current anti-tumour therapy is characterised by high non-specificity due to the diverse nature of tumours, which can significantly reduce its efficiency. The massive development of genomic, transcriptomic, and proteomic methods has enabled the detailed characterisation of individual tumours at the genome, transcriptome and proteome levels. Whole-genome sequencing, whole-transcriptome sequencing and exome sequencing can be listed as examples of genomics and transcriptomics methods. Those methods are suitable for detecting single-nucleotide polymorphisms. In the case of proteomic methods, where a peptide library is available, it is possible to detect mutated proteins in a biological sample. Also important is software that interprets and visualises the results or facilitates conversion between data formats that are specific to the method. The combination of methods can in principle increase the likelihood of detecting new neoantigens and design-specific anti-tumour therapy. **Aim:** The article primarily describes the bioinformatics analysis of samples using the methods of genomics, transcriptomics and proteomics, and the possible problems which must be considered during the analysis. The article includes a description of TransPEM software designed to convert the results from the analysis of single nucleotide polymorphisms into a peptide library of sequences useful for the detection of neopeptides using proteomic methods. The publication is accompanied by a brief description of the proteomics methods using this peptide library and the summary of its limitations.

Key words

genomics – transcriptomics – proteomics – bioinformatics – software development

Úvod

Současná protinádorová terapie vychází zejména z histologického vyšetření nádoru, související analýzy symptomů pacienta a z jeho předchozí léčby. Terapie nádorů se vyznačují poměrně velkou nespecifitou a s tím související menší úspěšností a krátkou dobou přežití pacienta. Kvalitní charakteristika nádorů tedy představuje esenciální komponent pro zvolení, příp. vývoj terapie, která bude danému pacientovi tzv. ušita na míru.

Jednou z možností zkoumání nádorů představují tzv. omics metody [1], jejichž rozvoj v posledních desetiletích přinesl nové možnosti pro vývoj dokonalejší terapie. Z hlediska povahy zkoumané entity rozeznáváme metody genomické, epigenomické, transkriptomické, proteomické a metabolomické (schéma 1). Jejich vzájemná kooperace může být využita pro řadu výzkumných záležitostí, mezi něž bezesporu patří identifikace nových proteinových izoform [2] nebo detekce mutovaných proteinů. Prezentovaný článek je primárně věnován genomickým, transkriptomickým a proteomickým metodám a řeší jejich možnosti a limitace v souvislosti s bioinformatickou analýzou získaných dat.

Genomické a transkriptomické přístupy se vyznačují určitou podobností ve vlastním provedení, jelikož oba mohou být založeny na sekvenování nukleových kyselin. Široce používanými metodami jsou dnes techniky zprostřed-

kovávající genomové sekvenování, celotranskriptomové sekvenování a příp. exomové sekvenování [3]. Z pohledu přesnosti však existuje několik důležitých faktorů, které významně ovlivňují jejich výsledek a následnou interpretaci získaných dat.

Prvním důležitým aspektem všech metod je laboratorní příprava vzorků a následně experimentální provedení sekvenace. V současném výzkumu a diagnostice je nejrozšířenější sekvenační platformou Illumina [4], která se vyznačuje vysokou přesností, přijatelnou cenou a nenáročností na laboratorní vybavení. Její nevýhodou je ovšem relativně malá délka produkovaných readů ve srovnání s dříve využívanou Sangerovou metodou [5]. Tato skutečnost může výrazně komplikovat následnou bioinformatickou analýzu, zejména pokud se jedná o celotranskriptomové sekvenování [6]. Bioinformatická analýza získaných sekvenačních dat může být rozdělena do několika kroků, jejichž specifikace je závislá na povaze experimentu. Také volba vhodného softwaru v závislosti na vstupních datech a cílech experimentu představuje zásadní faktor pro korektní bioinformatickou analýzu. Ta je rozdělena na kontrolu kvality vstupních dat, mapování readů na referenci, vlastní analýzu v závislosti na požadavcích experimentu a konečně interpretaci výsledků [7].

V případě proteomiky je v současnosti dostupná široká škála hmotnostně spektrometrických metod, které je možné

rozdělit z hlediska přípravy vzorku na „top-down“ a „bottom-up“ přístupy. Metody „top-down“ zkoumají intaktní proteiny, zatímco metody „bottom-up“ analyzují peptidy získané proteomickým štěpením proteinů. „Bottom-up“ metody představují nejvýhodnější přístup pro kvalitativní i kvantitativní detekci proteinů ve vysoce komplexních biologických vzorcích, jako je nádorová tkáň, plazma nebo buněčná kultura, a proto se jim budeme dále věnovat. Tandemovou hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography tandem-mass spectrometry – LC-MS/MS) je možné využít pro kvalitativní analýzu, tj. identifikaci proteinů, a lze ji úspěšně kombinovat s genomickými i transkriptomickými metodami. Analýzu LC-MS/MS dat však komplikuje dostupnost tzv. prohledávacích knihoven, které slouží jako reference pro správnou identifikaci zkoumaného proteinu. A právě genomická a transkriptomická analýza je schopna nabídnout nejkvalitnější prohledávací knihovny reprezentující zkoumaný vzorek.

Metody kvantitativní „bottom-up“ analýzy, jako např. monitorování vybraných reakcí [8], je možné kombinovat s proteogenomikou zejména za účelem validace již identifikovaných mutovaných proteinů/peptidů. Platforma kombinující všechny popsané metody má potenciál detailně charakterizovat nádorovou tkáň a popsat proteiny/peptidy, které doposud unikaly pozornosti (schéma 2).

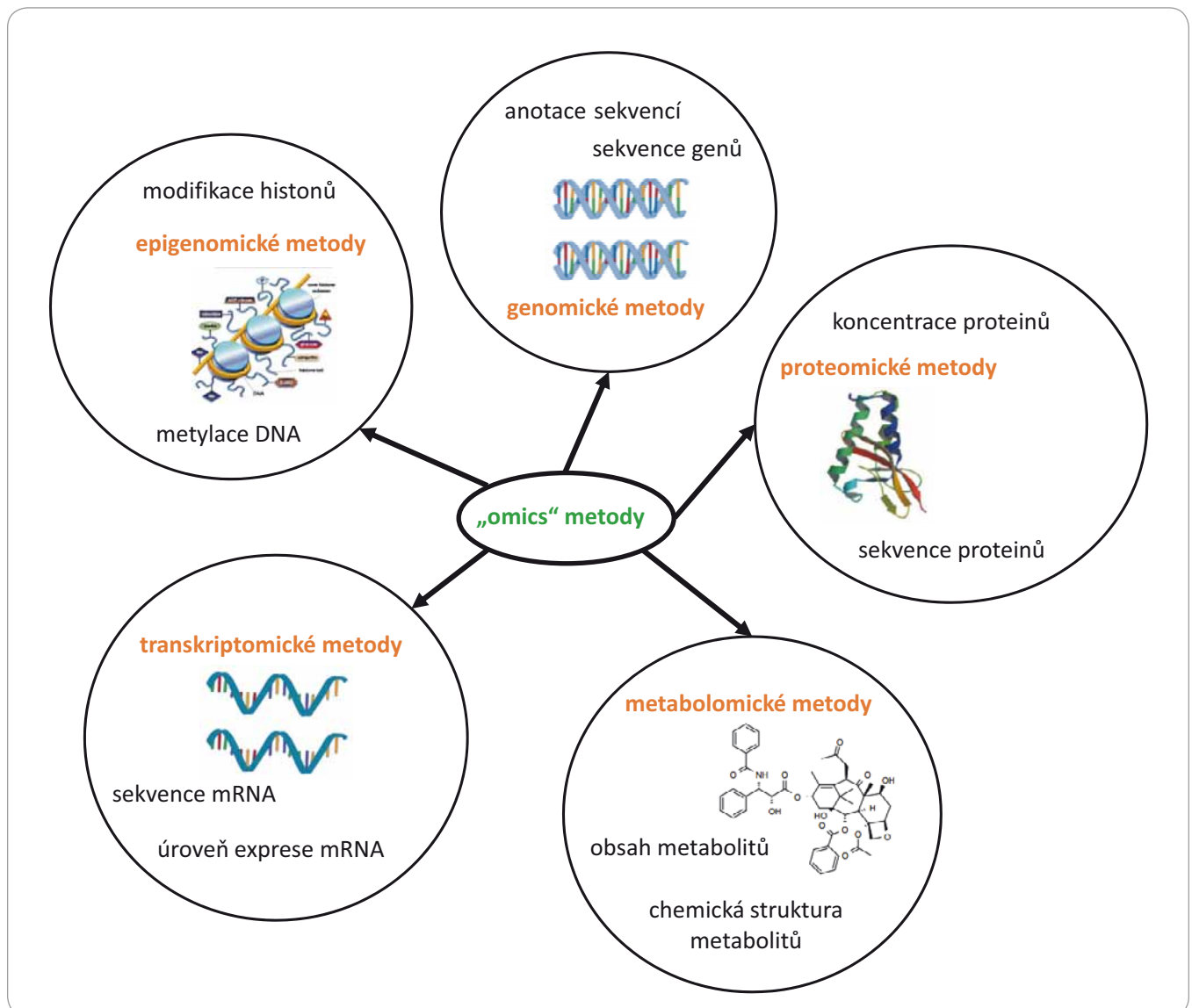


Schéma 1. Diagram zobrazující rozdělení „omics“ metod (zapsáno oranžovou barvou) a výsledků, které lze obdržet jejich prostřednictvím.

mRNA – mediátorová RNA

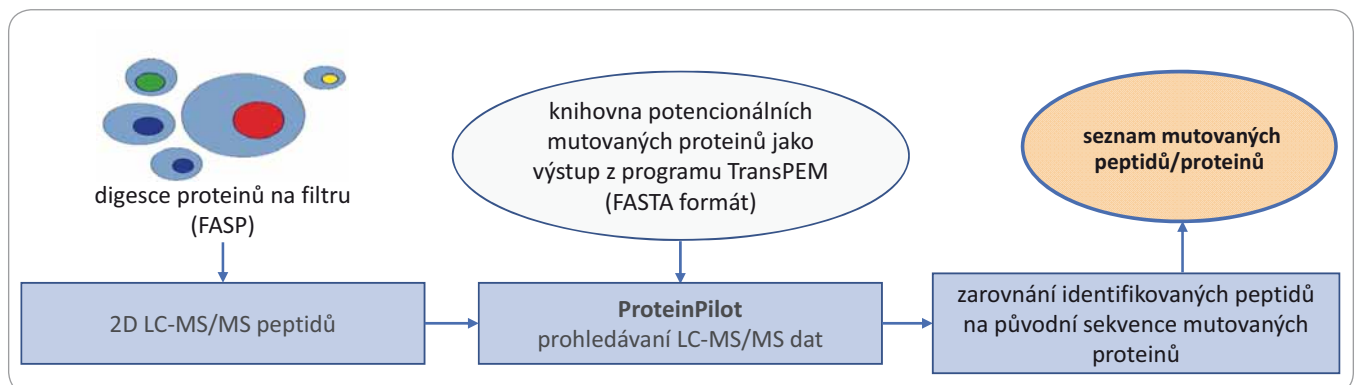


Schéma 2. Diagram zobrazující kombinaci softwaru TransPEM navazujícím na bioinformatickou analýzu jednonukleotidových polymorfizmů s proteomickou analýzou za účelem detekce mutovaných peptidů/proteinů.

LC-MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

Kvalita vstupních dat je základ

Prvním a zásadním krokem bioinformatické analýzy u sekvenace nukleových kyselin je kontrola kvality vstupních dat. Data jsou nejčastěji obdržena ve formě krátkých sekvencí, tzv. readů, přičemž kvalita každé báze v sekvenci může být odlišná [9]. U sekvenační platformy Illumina se například často setkáváme se sníženou kvalitou osekvenovaných bází na koncích readů. Za účelem posouzení kvality readů byl vyvinutý značný počet programů. Příkladem je FastQC [10], který je specifický pro platformu Illumina, nebo NGSQC (next-generation sequencing quality control) [11]. Mezi kritéria hodnocení kvality náleží zejména detekce obsahu sekvenačních adaptérů, zastoupení nukleotidů GC ve zkoumaných readech nebo sledování skóre kvality získaného ze vstupního souboru. Pokud se kvalita readů na základě těchto parametrů ukáže jako nevyhovující, je nezbytné provést opatření pro zlepšení jejich spolehlivosti, zejména ořezání readů, příp. odstranění vybraných readů. Operace ořezávání readů je široce používaná za účelem eliminace nekvalitních konců readů. K odstranění readů se přistupuje při výskytu kontaminace sekvenačními adaptéry. Obě operace mohou být samozřejmě kombinovány a v důsledku zlepšují kvalitu readů pro následné zarovnání na referenční sekvenci [2,12].

Volba softwaru pro mapování

Zarovnání readů na referenci (nejčastěji referenční genom) tvoří druhý krok v rámci bioinformatické analýzy sekvenačních dat. Volba programu určeného pro provedení typ sekvenování (exomové nebo celotranskriptomové) je dalším důležitým aspektem, který musí být zvážen zejména z důvodu odlišnosti mezi povahou dat poskytnutých sekvenováním exomů v porovnání se sekvenováním transkriptomu. Exomová sekvenování vycházejí z DNA jako vstupního materiálu, a tedy v průběhu mapování není třeba brát do úvahy alternativní sestřih primárního transkriptu RNA (pre-mRNA). Ve srovnání s celotranskriptomovým sekvenováním, v jehož případě ready obsahují sekvence transkriptu, které mohou být modifikované

alternativním sestřihem, je z hlediska výpočetní náročnosti vyhodnocení exomového sekvenování snadnější [13,14].

Mapování readů na referenci je rovněž ovlivněno několika negativními faktory, které musí být při vyhodnocování brány do úvahy. Nejčastěji uváděným negativním faktorem je tzv. problém multi-mapování, při němž je jeden read přiřazen na několik míst v použité referenci a který nastává zejména v oblastech genomu s vysokým obsahem repetitivních sekvencí. Tento problém může být do jisté míry odstraněn použitím technologie „paired-end“ sekvenování [15,16], při níž ready, které jsou v páru, poskytují přesnější zarovnání na referenci díky v součtu delší sekvenci. Velmi často se též objevuje problém krátkých readů, které jsou obecně náchylné k falešně pozitivnímu zarovnání ve srovnání s delšími ready. Řešení tohoto problému spočívá v použití jiné technologie sekvenování produkující delší ready, což ovšem výrazně zvyšuje cenu sekvenování [14,17].

Na základě povahy dat a zohlednění alternativního sestřihu se programy pro mapování readů na referenci dělí na dvě skupiny: „unspliced read aligners“ a „spliced read aligners“. První skupina sdružuje programy, které v rámci mapování readů nezahrnují alternativní sestřih, např. BWA [18] nebo Bowtie2 [19] a jsou primárně určeny pro zpracování dat z exomového nebo genomového sekvenování. Druhá skupina programů bere do úvahy alternativní sestřih transkriptů a je vhodná pro sekvenování transkriptomu (RNA-seq). Typickými a široce používanými softwary jsou Tophat2 [20], GSNAP [21] nebo QPALMA [22].

Detekce jednonukleotidových polymorfizmů

Analýza jednonukleotidových polymorfizmů (single nucleotide polymorphism – SNP) je nezbytná pro získání peptidové prohlédávací knihovny, která je nutná pro detekci potenciálních mutovaných peptidů proteomickými metodami. Hlavním problémem při detekci pravých SNP je jejich separace od artefaktů vzniklých v průběhu sekvenování, příp. v průběhu mapování readů na referenci [23]. Existuje několik volně do-

stupných softwarových balíčků široce používaných pro analýzu SNP, jako např. GATK [24], VarScan2 [25] nebo SAMtools [26], vzájemně se však ve schopnosti detekovat SNP liší [27]. Jejich výstupem je seznam predikovaných SNP. Na základě skutečnosti, jestli má SNP vliv na výsledný protein, rozlišujeme mutace nesynonymní (s vlivem na výslednou proteinovou sekvenci) a synonymní (bez vlivu na sekvenci aminokyselin, a to v důsledku degenerace genetického kódu). Pro případnou proteomickou analýzu jsou tedy důležité pouze mutace nesynonymní. Proteomické analýzy ovšem vyžadují SNP ve formátu peptidových sekvencí obsahujících tyto mutace, které tvoří referenční databázi nutnou pro následné prohlédávání MS dat, tzv. prohlédávací knihovny. Vyhledání specifické sekvence a změna příslušné aminokyseliny mohou být u dané sekvence provedeny manuálně na základě informací získaných z analýzy SNP, nicméně s narůstajícím počtem peptidových sekvencí a za předpokladu, že jedna mutace může vést ke vzniku několika výsledných proteinů (alternativní sestřih pre-mRNA), podstatným způsobem narůstá časová náročnost těchto operací a rovněž pravděpodobnost chyby způsobené lidským faktorem.

Za účelem automatizace popsaného procesu zejména z důvodu úspory času a minimalizace pravděpodobnosti vytvoření chybné sekvence byl vytvořen software TransPEM (software for Translation sequence into PEptide based on Mutation information) [28]. Představuje nový bioinformatický nástroj pro rychlou a robustní extrakci kódujících sekvencí z genomové sekvence a jejich translace do proteinů zohledňující výsledky analýzy SNP.

Vytvořené soubory obsahující všechny takto vytvořené proteinové sekvence mohou následně posloužit proteomické analýze jako prohlédávací knihovny. Pro svou činnost program vyžaduje celkem tři vstupní soubory. První ve formátu FASTA obsahující genomovou sekvenci, která musí být shodná s referencí, na kterou bylo provedeno mapování readů. Druhým je GTF soubor, který obsahuje informace o poloze genů a kódujících sekvencích v rámci genomu. Poslední

A. Neopeptid IIP^TVLMTEDIK (mutace A na P) se třemi produktovými ionty (y2, y3, y3 2+), potvrzujícími přítomnost mutované aminokyseliny ve zkoumané sekvenci.

EIF4G1_IIP^TVLMTEDIK A na P

Zbytek	b	b+2	y	y+2
I	114.0913	57.5493	1372.7756	686.8914
I	227.1754	114.0913	1259.6916	630.3494
P	324.2282	162.6177	1146.6075	573.8074
T	425.2758	213.1416	1049.5547	525.2810
V	524.3443	262.6758	948.5070	474.7572
L	637.4283	319.2178	849.4386	425.2230
M	768.4688	384.7380	736.3546	368.6809
T	869.5165	435.2619	605.3141	303.1607
E	998.5591	499.7832	504.2664	252.6368
D	1113.5360	557.2967	375.2238	188.1155
I	1226.6701	613.8387	260.1969	130.6021
K	1354.7551	677.8862	147.1128	74.0600

B. Neopeptid VSGSPEQAVEENLSSYFLDR (mutace S na F) s osmi produktovými ionty (y4-1, y9 2+), potvrzujícími přítomnost mutované aminokyseliny.

TACC3_VSGSPEQAVEENLSSYFLDR S na F

Zbytek	b	b+2	y	y+2
V	100.0757	50.5415	2227.0513	1114.0293
S	187.1077	94.0575	2127.9829	1064.4951
G	244.1292	122.5682	2040.9509	1020.9791
S	331.1612	166.0842	1983.9294	992.4684
P	428.2140	214.6106	1896.9874	948.9523
E	557.2566	279.1319	1799.8446	900.4260
Q	685.3151	343.1612	1670.8020	835.9047
A	756.3523	378.6798	1542.7435	771.8754
V	855.4207	428.2140	1471.7064	736.3568
E	984.4633	492.7353	1372.6379	686.8226
E	1113.5059	557.2566	1234.5953	622.3013
N	1227.5438	614.2780	1114.5527	557.7800
L	1340.6329	670.8201	1000.5098	500.7585
S	1427.6649	714.3361	887.4258	444.2165
S	1514.6969	757.8521	800.3937	400.7005
Y	1677.7602	839.3838	713.3617	357.1845
F	1824.8286	912.9180	550.2984	275.6528
L	1937.9127	969.4600	403.2300	202.1186
D	2025.9397	1026.9735	290.1459	145.5766
R	2209.0408	1105.0240	175.1190	88.0631

Obr. 1. Seznam produktových iontů reprezentujících dva vybrané neopeptidy identifikované prohlédacím algoritmem ProteinPilot 4.5.0.0 s vysokou peptidovou konfídencí (peptidová konfidence > 99 %). Zelenou barvou jsou vyznačeny produktové ionty spolehlivě identifikované v LC-MS/MS fragmentačním spektru. Červeně jsou podtrženy produktové ionty, které potvrzují aminokyselinovou záměnu a zahrnují ve své aminokyselinové sekvenci mutovanou aminokyselinu. Z obrázku je patrné, že peptidová konfidence nereflektuje pravděpodobnost přítomnosti mutace v sekvenci neopeptidů a že fragmentační spektra neopeptidů je nutné po identifikaci zkontrolovat.

soubor obsahuje výsledky z analýzy SNP poskytnuté např. programem VarScan2 [25] v tabulkovém formátu obsahující pro každé SNP chromozom, pozici v rámci chromozomu, referenční a mutantní alelu. Software TransPEM [28] poskytuje mutované a původní sekvence všech možných transkriptů daného genu. Ve srovnání s manuálním přístupem přináší významnou časovou úsporu a rovněž minimalizuje možné chyby prostřednictvím kontroly vstupních souborů a systému hodnocení a hlášení chyb vzniklých v průběhu získávání mutovaných sekvencí proteinů. Jelikož jsou generovány všechny možné peptidové

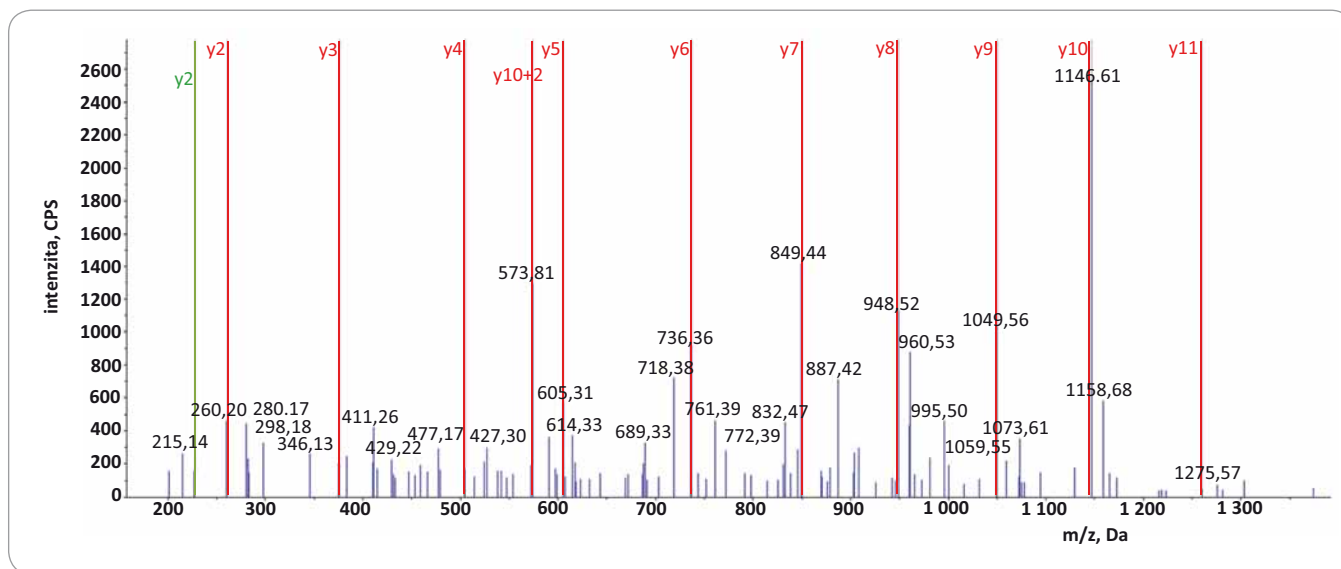
sekvence pro daný gen, je rovněž navýšena pravděpodobnost detekce neopeptidů, jelikož program tímto postihuje všechny možné podoby výsledného genového produktu.

Proteomická analýza mutovaných proteinů

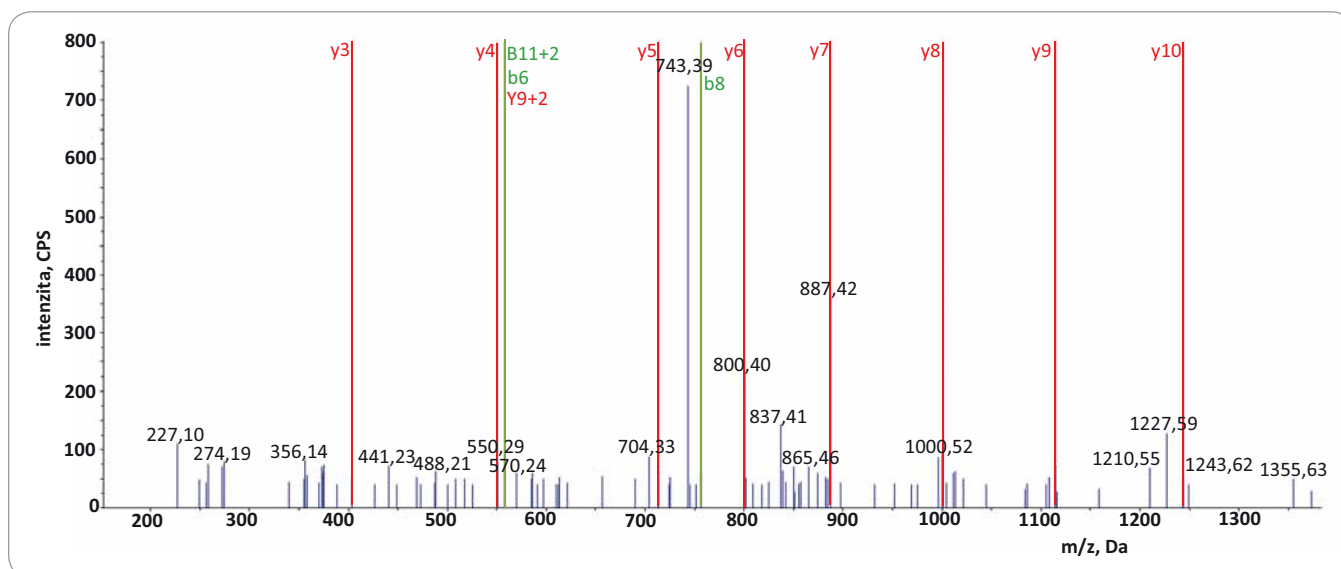
Tandemová hmotnostní spektrometrie nabízí informace o genové expresi na úrovni proteinů. Získané výsledky poskytují vyšší výpovědní hodnotu v porovnání s genomickými metodami, jelikož přímo popisují efektorové molekuly. Mezi největší úskalí LC-MS/MS patří různorodá ionizovatelnost peptidů, vysoký

dynamický koncentrační rozsah proteinů ve vzorku a nutnost mít k dispozici prohlédací knihovnu.

Výsledky LC-MS/MS analýzy jsou obvykle zatíženy nedostatečným pokrytím sekvence a nízkou efektivitou přiřazení změřených spekter k teoretickým spektrům obsaženým v prohlédacím knihovně. Ukázalo se, že až 10 % vysoce kvalitních a 65 % MS/MS spekter s nižší kvalitou není vůbec přiřazeno k sekvenci proteinu/peptidu, ze kterého pocházejí [29]. Genomické/transkriptomické metody umožňují získat prohlédací knihovnu šitou na míru pro danou LC-MS/MS analýzu. Přípravou těchto pro-



Obr. 2. Fragmentační spektrum produktových iontů reprezentující peptid IIPTVLMTEDIK z proteinu EIF4G1



Obr. 3. Fragmentační spektrum produktových iontů reprezentující peptid VGSPEQAVEENLSSYFLDR z proteinu TACC3.

hledávacích knihoven (jak bylo popsáno výše) je možné zvýšit efektivitu identifikace proteinů pomocí LC-MS/MS, a dokonce je možné identifikovat i peptidy/proteiny s mutovanou sekvencí.

Významně z toho benefitují LC-MS/MS přístupy zaměřené na identifikaci tzv. neopeptidů, které pokrývají mutovanou část sekvence proteinu. Software na prohledávání LC-MS/MS dat (např. ProteinPilot, Proteome Discoverer) v principu použije prohledávací mutantní knihovnu založenou na genomických/transkriptomických datech, kterou *in silico* naštěpí proteázou a vzniklé pep-

tidy posttranslačně modifikuje na základě pravidel definovaných uživatelem. Získaná data LC-MS/MS analýzy jsou následně importována a zpracována. Po dobu jejich zpracování dochází k přiřazení změřených spekter ke spektrům teoretickým, a pokud je mezi spektry nalezena dostatečná shoda, je peptid považován za identifikovaný. Identifikované peptidy jsou následně přiřazeny k příslušným sekvencím proteinů. Výsledkem analýzy dat LC-MS/MS je seznam identifikovaných proteinů a peptidů. V seznamu identifikací je potřeba vyhledat neopeptidy. V následujícím kroku je dále nutné

zjistit, jestli jsou neopeptidy unikátní, a tedy jestli jejich sekvence není sdílená s jinými proteiny. K tomuto účelu je využívána funkce peptid/protein BLAST. Za klíčovou součást nově vzniklé proteogenomické platformy považujeme zavedení verifikačního kroku, kterým ověřujeme, zda prohledávací algoritmus skutečně identifikoval neopeptid s aminokyselinovou záměnou. Problémem však zůstává, že současné prohledávací algoritmy neposkytují funkci zohledňující množství a kvalitu produktových iontů, které přímo obsahují mutované/ou aminokyseliny/ou v jejich sekvenci. Pro lepší pochopení pro-

blému uvádíme obr. 1, která reprezentuje dva neopeptidy identifikované se stejnou peptidovou konfidencí s pomocí prohledávacího algoritmu ProteinPilot 4.5.0.0 (peptidová konfidence = 99 %). V obr. 1 jsou zeleně vyznačeny m/z produktových iontů, které byly spolehlivě identifikovány v MS/MS spektrech obou neopeptidů (obr. 2 a 3). Z hlediska potvrzení přítomnosti mutované aminokyseliny v sekvenci ovšem neopeptidy nejsou rovnocenné a jejich neopeptidová konfidence není identická. Je zjevné, že mutace (A na P) v neopeptidu ILPTVLMTEEDIK potvrzuje jen produktové ionty z y a y 2+ série (y2, y3, y3 2+, podtrženy červenou barvou; obr. 1A), které jsou navíc velmi nespecifické vzhledem k nízkému m/z. K opačné situaci dochází u neopeptidu VSGSPEQAVEENLSSYFLDR (S na F; obr. 1B), u něhož vidíme až osm produktových iontů ze série y a y 2+ (y-1, y 2+, podtrženy červenou barvou) potvrzující mutaci. Z obr. 1A a B je zřejmé, že pravděpodobnost správné identifikace mutací je odlišná u obou neopeptidů a nedá se ztotožňovat s peptidovou konfidencí. Z tohoto důvodu doporučujeme při identifikaci neopeptidů důkladně kontrolovat fragmentační spektra a zároveň spatřujeme potenciál v tvorbě softwaru, který by určil neopeptidovou konfidenci a zautomatizoval proces jejího určení.

Závěr

Detailní popis nádorů zprostředkovaný vzájemnou kooperací genomických, transkriptomických a proteomických metod vede k účinnější detekci neopeptidů a potenciálně k výběru účinnější protinádorové terapie. Software TransPEM [28] zprostředkovává konverzi výsledků získaných prostřednictvím SNP analýzy do tvaru prohledávací peptidové knihovny, kterou lze následně využít proteomickými metodami k detekci neopeptidů. Software je ovládán prostřednictvím příkazové řádky a v současnosti neobsahuje grafické uživatelské rozhraní. Podrobnější popis softwaru je uveden v manuálu, který je ke stažení společně se zdrojovým kódem softwaru na webu Recamo.cz [28]. Popisováním kooperací genomických, transkriptomických a proteomických metod lze identifikovat imunogenní neoantigeny

dále využitelné v rámci přípravy protinádorových vakcín. Je ovšem nutné poukázat na skutečnost, že biologická funkce identifikovaných neoantigenů musí být dále objasněna jinými molekulárně biologickými metodami. Identifikovaný neoantigen s potenciálem pro tvorbu neoantigenových protinádorových vakcín by měl být rozpoznáván CD8 T lymfocyty. Rovněž navození efektivní imunitní odpovědi cílené na tumor specifické neoantigeny je komplikované a vyžaduje zapojení multioborového týmu vědců. Dalším důležitým aspektem je, že k navození tumor supresivního účinku neoantigenové vakcinace často dochází až po kombinaci s jinou formou imunoterapie, jako např. anti-PD1 anti-CTLA4 biologická léčba [30,31]. Úspěšná proteogenomická identifikace mutovaného peptidu, resp. neoantigenu, tedy představuje pouze velmi malý krok k vývoji specifické terapie.

Literatura

- Vucic EA, Thu KL, Robinson K et al. Translating cancer "omics" to improved outcomes. *Genome Res* 2012; 22(2): 188–195. doi: 10.1101/gr.124354.111.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol* 2016; 17: 13. doi: 10.1186/s13059-016-0881-8.
- Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D et al. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol Genet Metab* 2013; 110(1–2): 3–24. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.04.024.
- Liu L, Li Y, Li S et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 251364. doi: 10.1155/2012/251364.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 1977; 265(5596): 687–695. doi: 10.1038/265687a0.
- Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics* 2016; 107(1): 1–8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
- Wolf JBW. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Mol Ecol Resour* 2013; 13(4): 559–572. doi: 10.1111/1755-0998.12109.
- Faktor J, Michalova E, Bouchal P. p-SRM, SWATH a HRM – cílené proteomické přístupy na hmotnostním spektrometru TripleTOF 5600+ a jejich aplikace v onkologickém výzkumu. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): 110–115. doi: 10.14735/amko201415110.
- Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 1998; 8(3): 186–194.
- Babraham Bioinformatics. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. [online]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Dai M, Thompson RC, Maher C et al. NGSQC: cross-platform quality analysis pipeline for deep sequencing data. *BMC Genomics* 2010; 11 (Suppl 4): S7. doi: 10.1186/1471-2164-11-S4-S7.
- Yang IS, Kim S. Analysis of whole transcriptome sequencing data: workflow and software. *Genomics Inform* 2015; 13(4): 119–125. doi: 10.5808/GI.2015.13.4.119.

- Garber M, Grabherr MG, Guttman M et al. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods* 2011; 8(6): 469–477. doi: 10.1038/nmeth.1613.
- Martin JA, Wang Z. Next-generation transcriptome assembly. *Nat Rev Genet* 2011; 12(10): 671–682. doi: 10.1038/nrg3068.
- Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED et al. Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nature Genet* 2008; 40(6): 722–729. doi: 10.1038/ng.128.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009; 10(1): 57–63. doi: 10.1038/nrg2484.
- Góngora-Castillo E, Buell CR. Bioinformatics challenges in de novo transcriptome assembly using short read sequences in the absence of a reference genome sequence. *Nat Prod Rep* 2013; 30(4): 490–500. doi: 10.1039/c3np20099j.
- 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.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 2009; 10(3): R25. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 2013; 14(4): R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- Wu TD, Nacu S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics* 2010; 26(7): 873–881. doi: 10.1093/bioinformatics/btq057.
- De Bona F, Ossowski S, Schneeberger K et al. Optimal spliced alignments of short sequence reads. *Bioinformatics* 2008; 24(16): 174–180. doi: 10.1093/bioinformatics/btn300.
- De Wit P, Pespeni MH, Ladner JT et al. The simple fool's guide to population genomics via RNA-Seq: an introduction to high-throughput sequencing data analysis. *Mol Ecol Resour* 2012; 12(6): 1058–1067. doi: 10.1111/1755-0998.12003.
- 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.
- Koboldt D, Zhang Q, Larson D et al. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012; 22(3): 568–576. doi: 10.1101/gr.129684.111.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; 25(16): 2078–2079. doi: 10.1142/S0219720015500250.
- Yu X, Sun S. Comparing a few SNP calling algorithms using low-coverage sequencing data. *BMC Bioinformatics* 2013; 14: 274. doi: 10.1186/1471-2105-14-274.
- Recamo.cz. TransPEM (Software for Translation sequence into peptide based on mutation information). [online]. Dostupné z: <https://www.recamo.cz/cz/software/transpem/>.
- Ning K, Fermin D, Nesvizhskii A. Computational analysis of unassigned high-quality MS/MS spectra in proteomic data sets. *Proteomics* 2010; 10(14): 2712–2718. doi: 10.1002/pmic.200900473.
- Sahin U, Derhovanessian E, Miller M et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017; 547(7662): 222–226. doi: 10.1038/nature23003.
- Ott PA, Hu Z, Keskin DB et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017; 547(7662): 217–221. doi: 10.1038/nature22991.

Redakce časopisu **Klinická onkologie** vypisuje

SOUTĚŽ O NEJLEPŠÍ PRÁCI

v kategoriích:

Původní práce
Přehled
Kazuistika

Podmínky soutěže:

1. Do soutěže budou automaticky zařazeny všechny práce publikované v řádných číslech v roce 2019.
2. Práce budou hodnoceny členy redakční rady.
3. Hlavními kritérii hodnocení budou odborná úroveň, originalita a přínos zveřejněných údajů.
4. Výsledky soutěže budou vyhlášeny v časopise Klinická onkologie 1/2020.

Nejlepší práce v každé kategorii bude oceněna částkou 10 000 Kč.

Instrukce pro autory naleznete na internetových stránkách České onkologické společnosti ČLS JEP www.linkos.cz nebo na stránkách www.klinickaonkologie.cz. Dotazy můžete zasílat na adresu klinickaonkologie@mou.cz a své příspěvky vkládat do redakčního systému časopisu Klinická onkologie <http://redakce.ambitmedia.cz/ko>.

Proč publikovat v časopise Klinická onkologie?

Vaše práce budou dohledatelné ve 4 renomovaných světových bibliografických databázích MEDLINE/PubMed, EMBASE/Excerpta Medica, SCOPUS, Index Copernicus a tuzemské databázi Bibliographia medica chechoslovaca.

Vaše práce budou uznávány při hodnocení grantů, pro obhajoby doktorského studia a pro habilitační a profesorské řízení.

Vaše práce budou čteny. Časopis Klinická onkologie patří k nejčtenějším onkologickým časopisům!

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.
prof. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.

Širší redakční rada

prof. MUDr. Zdeněk Adam, CSc., Brno
doc. MUDr. Igor Andrašina, CSc., Košice
doc. MUDr. Soňa Balogová, Ph.D., Bratislava
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. Luboš Drgoňa, CSc., Bratislava
prof. MUDr. Ladislav Dušek, Ph.D., Brno
prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc., Praha
prof. MUDr. David Feltl, Ph.D., Ostrava
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Olomouc
prof. MUDr. Roman Hájek, CSc., Ostrava
MUDr. Jana Halámková, Ph.D., Brno

Čestní členové redakční rady

prof. MUDr. Josef Bilder, CSc., Brno
prof. Sándor Eckhardt, Budapešť
prof. MUDr. Ludovít Jurga, DrSc., Trnava
doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc., Bratislava

výkonný redaktor

prof. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

MUDr. Ivo Kocák, Ph.D.
MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.
MUDr. Jiří Novák

prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., Praha
doc. MUDr. Alexandra Kolenová, Ph.D., Bratislava
Andrea Lancia, M.D., Rome
assoc. prof. Jeong Eon Lee, M.D., Ph.D., Seoul
prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc., Brno
prof. MUDr. Michal Mego, DrSc., Bratislava
prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D., Olomouc
prof. MUDr. Beata Mladosičová, CSc., Bratislava
doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D., Praha
prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc., Bratislava
doc. RNDr. Martina Ondrušová, Ph.D., MPH, 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

prof. MUDr. Jan Klusterský, Brusel
prof. MUDr. Josef Koutecký, DrSc., Praha
prof. RNDr. Jan Kovařík, DrSc., Brno
prof. MUDr. Ivan Koza, DrSc., Bratislava

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

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

doc. MUDr. Jozef Mardiak, CSc., Bratislava
MUDr. Zdeněk Mechl, CSc., Brno
MUDr. Jaroslav Němec, CSc., Brno
MUDr. Viliam Ujházy, DrSc., Bratislava

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2018

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., Prusíkova 2577/16, Stodůlky, 155 00 Praha 5, tel./fax: +420 222 352 573/572.

Odpovědná redaktorka: Mgr. Barbora Kovářová, e-mail: barbora.kovarova@ambitmedia.cz.

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

Grafická úprava: Karel Zlevor. Jazyková korektura: Mgr. Ivana Dachary.

Vychází 6krát ročně. Předplatné na rok 2019 činí 540 Kč (22 eur).

Informace o předplatném a objednávky předplatitelů: www.predplatne-ambit.cz

Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá: Josef Seher, e-mail: josef.seher@ambitmedia.cz, tel.: +420 733 675 008.

Rukopisy vkládejte do redakčního systému: <http://redakce.ambitmedia.cz/ko>; případně 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. 10. 2019

