

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Mgr. Martin Pešta

**SLEDOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY
KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU
METODOU REAL - TIME PCR**

Disertační práce

II. interní klinika LF UK v Plzni

2006

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



Mgr. Martin Pešta

**SLEDOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY
KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU
METODOU REAL-TIME PCR**

Disertační práce

II. interní klinika LF UK v Plzni

2006

Obsah

1. Úvod	1
2. Přehled dosavadních znalostí	2
2.1. Obecná biologie nádorového procesu	2
2.1.1. Studium nádorového procesu <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	2
2.1.1.1. Vlastnosti nádorových buněk detekované <i>in vitro</i>	3
2.1.1.2. Vlastnosti nádorových buněk detekovatelné <i>in vivo</i>	4
2.1.2. Proces onkogeneze	7
2.1.2.1. Obecná charakteristika buněčného cyklu	7
2.1.2.2. Regulace buněčného cyklu	8
2.1.2.3. Apoptóza	10
2.1.2.4. Mutace antionkogenů a protoonkogenů v nádorové tkáni	13
2.1.2.5. Antionkogeny - nádorově supresorické geny	13
2.1.2.6. Úloha antionkogenů u sporadických nádorů	19
2.1.2.7. Protoonkogeny a onkogeny	19
2.1.2.8. Typy mutací měnících genetickou informaci	22
2.1.3. Proteiny rozrušující extracelulární matrix	23
2.1.3.1. Matrixové metaloproteinázy	23
2.1.4. Geny metabolismu fluoropyrimidinů	27
2.1.4.1. Thymidilát syntázy (TS), thymidin fosforylázy (TP) a dihydropyrimidin dehydrogenázy (DPD) a predikce účinnosti fluoropyrimidinů	27
2.2. Kolorektální karcinom	29
2.2.1. Epidemiologie	29
2.2.2. Formy kolorektálního karcinomu	30
2.2.3. Patogeneze kolorektálního karcinomu	33
2.2.4. Klasifikace nádorů kolon a rekta – grading, staging	34
2.2.5. Nádorové markery kolorektálního karcinomu	36
2.3. Měření genové exprese	40
2.3.1. Studium proteomu	40
2.3.2. Studium genomu	41
2.3.3. Studium transkriptomu	41
2.3.4. Kvantitativní analýza transkripce	42

2.3.5. Principy polymerázové řetězové reakce (PCR) a dalších metod genového inženýrství	44
2.3.6. Průtoková cytometrie	47
2.3.7. Imunoanalytické metody	47
2.3.8. Imunohistochemické metody	48
3. Cíl disertační práce	49
4. Metodika	50
4.1. Soubor nemocných s kolorektálním karcinomem	50
4.2. Vzorky pro stanovení exprese vybraných genů	50
4.2.1. Nádorové linie	50
4.2.2. Tkáňové vzorky	51
4.3. Stanovení exprese genů	51
4.3.1. Isolace celkové RNA	51
4.3.2. Reverzní transkripce (RT)	52
4.3.3. PCR v reálním čase (real-time PCR)	52
4.3.3.1. Primery pro stanovení jednotlivých genů	53
4.3.3.2. House-keeping gen	53
4.3.3.3. Primery matrixových metaloproteináz	54
4.3.3.4. Primery tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteináz	56
4.3.3.5. Přehled použitých primerů	57
4.3.3.6. Příprava standardů	57
4.3.3.7. Sekvence klonovaných standardů	59
4.3.3.8. Provedení polymerázové řetězové reakce v reálném čase	60
4.3.3.9. Záznamy PCR v reálném čase	62
4.3.3.10. Reprodukovatelnost stanovení	68
4.3.3.11. Stanovení exprese genů thymidylát syntázy (TS), thymidylát fosfatázy (TP) a dihydropyrimidin dehydrogenázy (DPD)	68
4.4. Detekce mutace genu K-ras kodonu 12	69
4.5. Klasifikace, terapie, přežití	70
4.6. Statistická analýza	71
5. Výsledky	73
5.1. Exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620	73

5.1.1. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620	73
5.2. Exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu	73
5.2.1. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na chorobném postižení kolorektální tkáně	73
5.2.2. Vztah exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 k vývoji nádorového onemocnění	78
5.2.3. Vztah exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 k vývoji nádorového onemocnění	79
5.2.4. Korelace mezi hladinami exprese mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1	80
5.2.5. Závislost délky bezpříznakového období na expresi genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1	81
5.2.6. Závislost délky celkového přežití na expresi genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1	82
5.3. Exprese mRNA TS, TP a DPD u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu	82
5.3.1. Hodnoty exprese genů TS, TP a DPD v závislosti na typu kolorektální tkáně	82
5.3.2. Hodnoty exprese genů TS, TP a DPD v závislosti na stádiu onemocnění	84
5.3.3. Závislost délky bezpříznakového období (DFI) na expresi genů TS, TP a DPD	85
5.3.4. Závislost délky celkového přežití (OS) na expresi genů TS, TP a DPD	85
5.3.5. Vzájemná závislost exprese TS, TP a DPD	87
5.4. Výsledky stanovení K-ras mutace kodonu 12 u nádorové benigní, maligní a normální kolorektální tkáně kolonu a rekta	87
6. Diskuse	88
6.1. Sledování exprese genů metodou kvantitativní RT PCR	88
6.2. Exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620	88
6.3. Exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu	89

6.3.1. Porovnání exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 v kolorektální tkáni	89
6.3.2. Korelace exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 s klinickým stavem onemocnění	90
6.4. Exprese mRNA TS, TP a DPD u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu	92
6.5. Stanovení K-ras mutace kodonu 12 u nádorové benigní, maligní a normální kolorektální tkáně kolonu a rekta	93
7. Závěry	94
8. Citovaná literatura	95
9. Publikace autora	102
10. Přílohy	105

Rád bych poděkoval všem osobám, bez jejichž přispění by tato práce nemohla vzniknout. Svému školiteli prof. MUDr. O.Topolčanovi CSc. za poskytnutí námětu, odborné vedení a za její finanční zajištění, doc. MUDr. R.Černému CSc. děkuji za odborné vedení v laboratorní části práce. MUDr. L.Holubcovi Jr. Ph.D. a MUDr. M.Černé Ph.D. děkuji za pomoc při hodnocení klinických dat. Ing. S.Kormundovi děkuji za pomoc při statistickém zpracování výsledků. Doc. MUDr. L.Holubcovi, CSc. děkuji za poskytování tkáňových vzorků a MUDr. Anně Fišerové, Ph.D. za poskytnutí vzorků nádorových linií. Mgr. J.Zehleové děkuji za pomoc při izolaci RNA. Doc. MUDr. J.Fínkovi Ph.D. děkuji, že umožnil použít údaje o klinickém vývoji pacientů.

1. Úvod

Kolorektální karcinom je nejčastějším nádorem zaživačího ústrojí a díky neustálému nárůstu během posledních desetiletí je druhým nejčastějším nádorem vůbec. Přestože je prognóza tohoto onemocnění při včasné diagnóze příznivá, a primární i sekundární prevenci je věnováno velké úsilí, umírá ročně na tento novotvar v České republice více než 4000 lidí. Toto ukazuje na nutnost dále rozvíjet studium tohoto nádoru a zvýšit znalosti jeho etiopatogeneze a léčby.

Podrobná znalost mechanismů kancerogeneze a biologických vlastností nádorů by mohly přispět k novým trendům v léčbě nádorů. Kumulace mutací vedoucích ke vzniku nejprve adenomu, posléze až karcinomu je velmi dobře známým genetickým modelem. V tomto ohledu je kolorektální karcinom jedním z nejprozkoumanějších nádorů. Realizace genetické informace však na takovém stupni poznání není.

Záměrem této práce bylo pokusit se o hledání genů, které by pomohly v charakteristice biologických vlastností nádoru a pomohly tak i při určení prognózy a výběru cílené terapie. Zabývali jsme se měřením genové exprese přímo ve tkáni primárního nádoru a na základě těchto výsledků se chceme pokusit o odhad chování nádoru s možným využitím při léčbě.

2. Přehled dosavadních znalostí

2.1. Obecná biologie nádorového procesu

2.1.1. Studium nádorového procesu *in vitro* a *in vivo*

Rakovina představuje velice komplexní onemocnění. Při posuzování biologické povahy nádorového procesu je užitečné si částečně zachovat oddělený pohled na nádorově transformovanou buňku v podmínkách *in vitro* a na rakovinu jako nemoc (*in vivo*). Izolované nádorové buňky vykazují v tkáňové kultuře některé typické charakteristiky, jako je immortalita, ztráta kontaktní inhibice a hustotní limitace růstu nebo onkogenicita. Existuje zjevné pojitko mezi těmito vlastnostmi a vývojem rakoviny jako onemocnění, avšak uvedené charakteristiky nevystihují tuto nemoc v celé její šíři. Aby mohlo vůbec dojít k pomnožení nádorových buněk *in vivo*, musí tyto buňky nejprve proklouznout systémem komplexního imunitního dozoru. Jen soubor této a dalších vlastností může definovat rakovinu jako nemoc a jen některé z nich jsme přitom schopni studovat na úrovni *in vitro*.

Jednou z nejcharakterističtějších vlastností rakoviny je určitá tendence k postupné progresi od benigního k malignímu a konečně metastatickému fenotypu. Při tomto procesu hrají zásadní roli následující vlastnosti nádorových buněk [1].

Vlastností nádorových buněk je jejich klonální povaha, tzn. že celá sekvence nádorové progresy začíná u jediné transformované buňky. U ženských nádorů byla tato vlastnost potvrzena pomocí inaktivace X-chromozomu - všechny nádorové buňky mají konstantně inaktivovanou tutéž kopii [2].

Na rakovinu můžeme do určité míry pohlížet jako na autoakcelerační proces. Postupujeme-li podél dráhy nádorové progresy, pak pravděpodobnost dosažení dalšího stadia progresivně vzrůstá.

Rakovina je heterogenní populací nádorových buněk. Pro vývoj nádorového onemocnění je charakteristické, že všechna stadia podél dráhy nádorové progresy začínají u buněk předcházejícího typu poškození a na počátku jsou vždy v menšině. Na genetické úrovni jsou v tomto ohledu zásadní dva procesy - postupující akumulace genetických změn podél dráhy nádorové progresy a selektivní interakce nádorových buněk s okolními stromálními a infiltrujícími imunitními a zánětlivými buňkami.

Dráhu nádorové progresy tedy můžeme velmi dobře charakterizovat v obecně genetických termínech, jako je variabilita, mutace a selekce [1].

2.1.1.1. Vlastnosti nádorových buněk detekované *in vitro*

Nesmrtelnost nádorové buňky

Nádorové buňky se transformací stávají jako populace relativně nesmrtelnými a s použitím odpovídajících technických postupů a při poskytnutí vhodného prostředí mohou žít bez časové limitace. Doba života transformované buňky a jejího potomstva tak přesáhne normálně netransformovanou buněčnou populaci dožívaných přibližně padesáti mitotických cyklů. Tato transformací získaná vlastnost je dána změnami v systému telomeráz a v telomerech autozómů. Diagnostickým průkazem imortalizace je schopnost populace nádorových buněk růst v cizorodém prostředí tkáňových kultur a přímo zakládat neomezeně rostoucí permanentní buněčné linie.

Proti nádorovým buňkám se netransformované buňky v primární kultuře ujímají v menším procentu explantací. V malém procentu případů se mění na permanentní buněčnou linii, která je polyklonální, polyploidní, morfologicky polymorfní. Dochází tedy, ve výjimečných případech, ke „spontánní“ maligní transformaci a imortalizaci *in vitro* [1].

Snížení závislosti na metabolických podnětech okolí

Nádorová buňka ztrácí potřebu přítomnosti komplexních bílkovinných růstových faktorů a trofických hormonů ve svém prostředí a je schopna růstu pouze se základními jednoduchými živinami. Tato vlastnost se projeví v tkáňové kultuře sníženým nárokem permanentních maligních linií na přítomnost sérových nedefinovaných složek kultivačního media.

Buňky mnohých nádorů mají schopnost růstu v anaerobním prostředí. Současně se snížením závislosti na podnětech okolí však dochází u nádorové buňky ke snížení schopnosti přejít při nedostatečném přísunu živin do klidové růstové fáze (G_0). Tuto schopnost mají takřka všechny somatické buňky. Při snížení hladin základních nutričních potřeb dochází u nádorové buňky spíše ke smrti v apoptóze, než k výjimečnému dlouhodobému přetrvávání v G_1 fázi, nebo přechodu do G_0 fáze [1].

Změna závislosti růstu na podložce

Transformované buňky nejsou svým růstem tak výrazně závislé na pevném povrchu jako netransformované somatické buňky. Většinou po adaptaci nebo jednoduché klonální selekci metabolizují a rostou dobře i v suspenzi. Schopnost růstu a tvorby kolonií v polotuhém médiu je využívána jako test malignizace v experimentálních systémech při testování onkogenních a potencionálně onkogenních virů [1].

Ztráta kontaktní inhibice

U nádorových buněk rostoucích *in vitro* dochází k snížení až ztrátě kontaktní inhibice a transformovaná buňka je schopna růst i ve směru další buňky a přes další buňku. Předpokládá se, že podobné mechanismy působí i v přirozených tkáňových podmínkách *in vivo*. Pokud dojde při libovolném druhu pohybu k vzájemnému dotyku stejných netransformovaných somatických buněk, je zastavena jejich aktivita ve směru dotyku a další pohyb - tedy i dělení, dojde ke kontaktní inhibici a pohyb pokračuje pouze volným směrem. S touto skutečností souvisí zvýšená saturační denzita nádorových buněk v tkáňové kultuře, která je příznakem a částečně i mírou malignity buněk *in vitro*. Saturační denzita je laboratorní hodnota definovaná jako maximální dosažitelný počet buněk na jednotku plochy kultivačního povrchu ve standardní buněčné kultuře [1].

2.1.1.2. Vlastnosti nádorových buněk detekovatelné *in vivo*

Antigenní změny nádorové buňky

Většina nádorových buněk je charakterizována snížením sumárního množství přirozených antigenů všech typů. Snížená denzita transplantačních histokompatibilních antigenů souvisí s jejich špatnou identifikovatelností vlastním imunitním systémem a projevuje se možností dlouhodobého přežívání. Na druhé straně takřka u všech experimentálních nádorů indukovaných fyzikální, chemickou, nebo biologickou - virovou cestou a i u většiny „spontánních“ zvířecích nádorů byly v jejich parenchymových buňkách nalezeny neoantigeny specifické pro nádorovou buňku. Část z nich je při odpovídající imunizaci schopna standardně vyvolat proti sobě dobře detekovatelnou reakci transplantačního typu.

Obecně byly antigeny nalezené na nádorových buňkách nazvány *nádorově specifickými antigeny (TSA)*, pokud byla jejich přítomnost prokázána výlučně na nádorových buňkách. *S nádorem spojenými (asociovanými) antigeny (TAA)*, nazýváme antigenní struktury přítomné na nádorových buňkách a za jistých okolností prokazatelné i na některých netransformovaných buňkách.

Část TSA vázaná na membrány vyvolává hostitelskou transplantační reakci, která je schopna odhrožít nádor nesoucí takový antigen, a podílí se tak na vztahu nádor-hostitel přímo v patogenezi růstu nádoru a v rozvoji nádorové nemoci. Tato část antigenů stabilně geneticky zakotvená v nádorové buňce a pro její maligní charakter nezbytná se již tradičně nazývá *nádorově specifické transplantační antigeny (TSTA)* a také *nádorové*

rejekční antigeny (TRA). Mezi maligně transformovanými buňkami a normálními aloantigeny hostitelských buněk byly v části případů nalezeny křížové antigenní reakce. Tato křížově reagující část TRA se nazývá s *nádorem spojené (asociované) transplantační antigeny (TATA)*.

Po stránce molekulární struktury patří TRA mezi peptidické molekuly prezentované na povrchu buňky molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) I. třídy.

Antigenní peptidy TRA jsou kódovány a exprimovány několika způsoby, podle kterých je můžeme dále rozdělit:

- Sdílené nádorové antigeny se vyskytují na tumorech bez ohledu na jejich histogenezi a etiologii

Jejich antigenní peptidy jsou kódovány geny přítomnými ve všech buňkách v inaktivním stavu a exprimované jsou asi náhodně pouze v několika typech nádorů. Příkladem jsou produkty genů z rodiny MAGE, přítomné přirozeně pouze v mužských semenných buňkách, kde však nedochází k jejich expresi na povrchu pro nepřítomnost MHC (HLA). Bílkovinné produkty těchto genů představují rejekční antigenitu více než třetiny melanomů, některých karcinomů plic, žaludku, jater a močového měchýře. Druhou možností v této skupině je, že je na povrchu netransformované buňky maskován např. glycidovým krytem a u nádorové buňky sníženou glykosylací demaskován. Příkladem je mucinovými proteiny nesená antigenita některých karcinomů pankreatu, vaječnicků a prsu.

- Tkáňově specifické antigeny jsou společné pro nádor a buňku, ze které vznikl

Příkladem je společná antigenita epidermálních melanocytů a některých maligních melanomů podmíněná peptidy tyrozinázy prezentovanými na buněčném povrchu v oblasti MHC stejně u benigní jako maligní buněčné populace. Při vzácné a často pouze lokální spontánní regresi některých melanomů skutečně dochází i k lokální depigmentaci zánikem normálních melanocytů.

- Antigeny vzniklé mutací jsou proteiny mutovaných protoonkogenů a antionkogenů nádorových buněk prezentované v MHC

Antigeny vzniklé tímto mechanismem patří mezi struktury s největší nádorovou specifitou. Proti řadě těchto bílkovin byly získány cytotoxické T-lymfocyty, ale nikdy nebyla proti nim nalezena účinná rejekční odpověď *in vivo*.

- Antigenita vzniklá overexpresí onkogenů teoreticky odpovídá nemutovaným, ale pouze kvantitativně nadbytečným onkoproteinům v buňce povrchově exprimovaným v oblasti MHC

Tyto proteiny jsou přítomné v nízkých hladinách i v normálních buňkách, ale u některých nádorů se svou koncentrací dostávají na hranici imunogenity pro T-buněčnou odpověď.

- Virem kódované antigeny po přepisu do hostitelského genomu mohou být peptidovými produkty prezentovány v oblasti MHC, a potom vystupovat jako rejekční antigeny

Příkladem je antigenita karcinomů čípku děložního podmíněná proteinem E7 kódovaným HPV 16. Tímto proteinem senzibilizované lymfocyty jsou cytotoxické vůči příslušným nádorovým buňkám [1].

Část nádorových antigenů je transformovanou buňkou prezentována mimo membránový povrch a nebo mimo oblast MHC a mnohdy jsou solubilně vyplavovány do oběhu hostitele. Jsou to již zmíněné TSA využitelné diagnosticky, nebo při sledování průběhu nádorové choroby, ale neuplatňující se v patogenezi nádorové choroby. Příkladem jsou onkofetální a embryonální stadiální antigeny přítomné na embryonální tkáni v určitém stadiu vývoje a nepřítomné v diferencovaných netransformovaných buňkách dospělého organismu, ale běžně nacházené v nádorových buňkách a séru nositelů řady nádorů. Patří sem např. α -fetoprotein (AFP) a karcinoembryonální antigen (CEA) [1].

Karyotypické změny

Karyotypické změny mohou mít charakter náhodný, daný chybami při rychlé proliferaci, tyto změny jsou nestabilní a nespecifické. Jiné odchylky karyotypu mají charakter stabilní a pak jsou pro daný druh nádoru specifické a z hlediska cytogenetického diagnostické. Konstantní translokace se vyskytují u řady leukemií a u některých lymfomů, ale i ovariálního a renálního karcinomu. Stabilní delece jsou charakteristikou dalších leukemií, retinoblastomu, neuroblastomu a Wilmsova tumoru. Standardní lokalizace zlomů a delecí je kromě diagnózy důležitá i pro lokalizaci specifických onkogenů a supresorických genů v základním výzkumu jednotlivých nádorů a pro studium interakcí jednotlivých genů v onkogenezi [1].

2.1.2. Proces onkogeneze

Proces onkogeneze na buněčné úrovni je úzce spjat s kontrolou buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy (programované buněčné smrti). Výše jmenované procesy jsou u vyšších organismů regulovány mnohastupňovými mechanismy, které zahrnují intracelulární a extracelulární kontrolní dráhy. Většina nádorových buněk obsahuje mnohočetné genetické změny, které podporují proces onkogeneze právě poškozením důležitých kontrolních drah. U nádorových onemocnění se takřka pravidelně setkáváme se dvěma základními typy genetických poškození. Prvním typem poškození jsou dominantní poruchy protoonkogenů a druhým typem jsou recesivní poruchy antionkogenů.

Genetické poruchy, které ovlivňují protoonkogeny, jsou zodpovědné za vyvolání stimulačních účinků, zatímco poruchy ovlivňující antionkogeny jsou zodpovědné za ztrátu jejich inhibiční funkce. Molekulární mechanismy kontroly buněčné proliferace zahrnují jak negativní, tak pozitivní regulátory [3].

2.1.2.1. Obecná charakteristika buněčného cyklu

Buněčné dělení je základním předpokladem růstu a vývoje všech organismů, ale i fixace náhodně vzniklých mutačních změn v sekvenci DNA. Kontrola buněčného cyklu je pro každou buňku stěžejní záležitostí a její narušení může mít za následek přeměnu normální buňky v buňku nádorovou, která nepodléhá regulačním mechanismům buňky a je schopna nekontrolovaného růstu. Buněčný cyklus je na základě morfologických a biochemických charakteristik rozdělen do několika základních fází (G_0 , G_1 , S, G_2 , a M fáze) a je ukončen rozdělením buňky za vzniku dvou dceřinných buněk. Perioda mezi n a $n+1$ mitotickou fází se označuje jako interfáze. Základní vlastností jednotlivých fází buněčného cyklu jsou uvedeny v následujícím přehledu:

- G_0 -fáze, klidová fáze buněčného cyklu, ve které buňka plní své základní funkce a udržuje bazální metabolismus.
- G_1 -fáze, interval mezi ukončením mitózy a začátkem syntézy DNA, je pro něj vlastní intenzivní syntéza všech typů RNA v jádře, v cytoplazmě probíhá proteo-syntéza a buňka roste. Délka G_1 -fáze obvykle určuje délku celého buněčného cyklu.
- S-fáze, v jádře probíhá replikace DNA a v cytoplazmě jsou syntetizovány histony. Po ukončení S-fáze buněčné jádro obsahuje dvojnásobné množství DNA.
- G_2 -fáze, interval mezi koncem syntézy DNA a začátkem mitózy, je typický dalším růstem buňky, proteosyntézou, přičemž ve zvýšené míře je syntetizován tubulin a další

proteiny sloužící k výstavbě mitotického aparátu. V G_2 -fázi cyklu probíhá kontrola ukončení DNA replikace před vstupem do mitózy.

- M-fáze, neboli mitotická. Proces mitotického dělení se sestává z řady na sebe navazujících změn, které dělíme do 6 fází, z nichž prvních pět (profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze) představuje dělení jádra. Šestou fází je vlastní rozdělení buňky neboli cytokineze. Mitotickým dělením se zabezpečuje vznik dvou geneticky identických buněk.

G_1 , S, G_2 a M fáze jsou součástí buněčného cyklu, ovšem ne všechny buňky procházejí tímto standardním schématem. Ačkoliv délka jednotlivých fází cyklu je do určité míry proměnlivá, největší variabilita byla pozorována v průběhu G_2 -fáze. Nejsou-li buňky v G_1 -fázi připraveny k replikaci DNA, vstupují do G_0 -fáze, klidového stadia, ve kterém mohou setrvat několik dní, týdnů nebo i let, než opět pokračují v proliferaci [1].

2.1.2.2. Regulace buněčného cyklu

Důležité procesy, jako je replikace DNA, mitóza a cytokineze, jsou řízeny řadou kontrolních systémů s cílem koordinovat jednotlivé fáze buněčného cyklu. Ve standardním buněčném cyklu je proliferační aktivita kontrolována prostřednictvím inhibitorů, které mohou zastavit cyklus ve specifických kontrolních bodech. Zpětněvazebně signály zde brání v činnosti samotného kontrolního systému, ve snaze zabránit spuštění dalšího procesu dříve, než byl dokončen předcházející. Klíčový význam inhibitorů spočívá v jejich schopnosti regulovat buněčnou proliferaci v rámci utváření integrity tkáně a organismu. Tato regulace se uskutečňuje v několika důležitých kontrolních bodech cyklu. První kontrolní bod je v G_1 -fázi, těsně před vstupem do S-fáze a druhý kontrolní bod je v G_2 -fázi před vstupem do mitózy. Kontrolní systém buněčného cyklu zde spouští proces, který zahajuje S-fázi. Následně v G_2 kontrolním bodě se spouští proces zahajující M-fázi.

Vlastní regulace buněčného cyklu je založena na dvou skupinách proteinů. První z nich je skupina *cyklin-dependentních kináz (cdk)*, které vykazují svoji aktivitu fosforylací určitých proteinů na serinu a treoninu. Druhou je skupina specializovaných *regulačních proteinů zvaných cykliny*, které se vážou na molekulu cdk kinázy a vytvářejí tak funkční komplex cyklinu s příslušnou kinázou, který se vyznačuje schopností fosforylovat odpovídající proteiny. Cyklické spojení, aktivace a následný rozpad komplexu cyklin/cdk jsou nezbytné pro progresi buněčného cyklu.

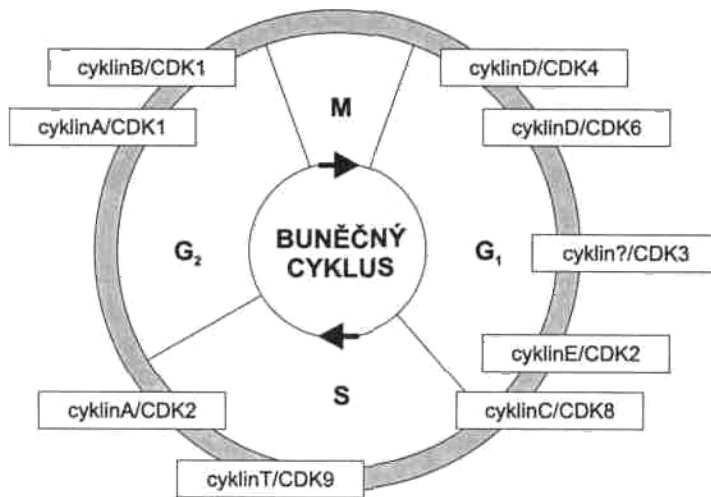
Existují dvě hlavní třídy cyklinu: mitotické cykliny, které se vážou na cdk molekuly během G_2 -fáze a jsou důležité pro vstup do mitózy. Dále D1 cykliny, které se vážou na cdk molekuly v průběhu G_1 -fáze a jsou důležité pro vstup do S-fáze cyklu. Jednotlivé kroky buněčného cyklu jsou pak regulovány těmito hlavními cdk komplexy:

- Přejchod G_1/S : (cyklin E/cdk2, cyklin D1-D3/cdk4, cyklin D1/cdk6). D-cykliny se převážně spojují s cdk4 nebo cdk6. D cykliny pravděpodobně odpovídají za spojení vnějších signálů s regulací buněčného cyklu.

S-fáze: (cyklin A/cdk2). Se vstupem buňky do S-fáze cyklu se snižuje množství cyklinu E a s ním spojená kinázová aktivita komplexu cyklin E/cdk2. Cdk2 uvolněná z cyklinu E mění svého partnera za cyklin A, který se účastní procesu DNA replikace. Kinázová aktivita cdk2 ve spojení s cyklinem E a A se zvyšuje poblíž G_1/S přechodu a klesá v M-fázi.

Přejchod G_2/M : (cyklin A/cdc2, cyklin B/cdc2). Komplex cyklin B/cdc2 je známý jako „*Maturation-promoting factor (MPF)*“. Jeho katalytická aktivita řídí vstup buněk do M-fáze cyklu. Cyklin B je syntetizován a kumulován v průběhu S a G_2 -fáze, kde tvoří komplex s cdc2. Cdc2 je v komplexu fosforylována na Thr-161 cdc2 aktivační kinázou (CAK), která je nezbytná pro aktivaci tohoto komplexu. CAK se skládá z cdk7 a cyklinu H. Naproti tomu je cdc2 inaktivována fosforylací na Tyr-15, Thr-14 prostřednictvím kináz Weel a Mik 1 nebo inhibičními proteiny p21 a p27. Proti tomuto mechanismu působí aktivační defosforylace v G_2/S přechodu prostřednictvím fosfatázy cdc25. Cdc2 (= cdk1) může asociovat rovněž s cyklinem A, který se v cyklu objevuje dříve než cyklin B. Aktivovaný komplex cyklin B/cdc2 fosforyluje řadu dalších proteinů, mezi které patří také strukturní proteiny jako histon H1, jaderný laminin, vimentin a kadesmon. Jejich fosforylace je důležitá pro kondenzaci chromozomů, rozpad jaderných lamel, intermediárních filament a reorganizaci mikrofilament. Všechny tyto pochody jsou nezbytné pro vstup buňky do M-fáze.

Obrázek 1: Schématické znázornění buněčného cyklu a jeho regulace



2.1.2.3. Apoptóza

Apoptóza je cílený, samodestrukční mechanismus buněk v němž buňka sama hraje aktivní úlohu. Stejně jako mechanismy proliferace a diferenciace, je apoptóza považována za kritický bod buněčné kontroly, která může být modulována fyziologicky buňkou samotnou nebo vnějším prostředím. Je také regulačním mechanismem počtu buněk v průběhu ontogeneze.

Existují velké rozdíly mezi apoptózou a nekrózou, z nichž největší je účinnost, s jakou jsou apoptotické buňky rozeznány a fagocytovány. Časná fagocytóza následovaná nitrobuněčnou degradací apoptotických buněk makrofágy, brání buď přímému poškození sousedních buněk nebo indukci zánětlivé odpovědi, která vzniká při uvolňování makromolekul z umírajících buněk (charakteristický znak nekrózy *in vivo*). Defekty v procesech podílejících se na kontrole programované smrti buněk mohou prodloužit životní cyklus buněk, čímž přispívají k neoplastické buněčné expanzi, která je nezávislá na buněčném dělení. Selhání normálních apoptotických drah rovněž přispívá k procesu karcinogeneze tvorbou tolerantního prostředí pro genetickou nestabilitu a akumulaci bodových mutací, umožňuje nefunkčnost kontrolních bodů buněčného cyklu, které by normálně indukovaly apoptózu, redukuje závislost na kyslíku a živinách a podporuje rezistenci k cytotoxickým protinádorovým látkám a radiaci.

Morfologické změny spojené s apoptózou

Strukturu změn v buněčné morfologii, které jsou charakteristické pro apoptózu, lze shrnout do tří skupin:

- smrštění buněk
- kondenzace, migrace a fragmentace chromatinu

- uchování struktury cytoplazmatických organel, ale při ztrátě prostorových vztahů

Mezi další charakteristiky patří tvorba tak zvaných „apoptotických tělísek“. Tyto struktury vázající se k membráně, které mohou, ale nemusí obsahovat chromatin, jsou velmi citlivé na fagocytózu.

Základní linie buněčné smrti apoptotického typu

Díky studiím volně žijící nematodi (*Caenorhabditis elegans*) byly objeveny tři základní geny Ced-3, Ced-4 a Ced-9 podílející se na kontrole kroku, kterým se rozhoduje definitivně o životě či smrti buňky. Homology těchto genů byly identifikovány rovněž u člověka a dalších živočišných druhů.

Kaspázy

U člověka existuje nejméně 13 homologů genu CED-3, jejichž produkty se nazývají kaspázy 1-13. Tyto proteázy existují jako inaktivní zymogeny u všech živočišných buněk, ale mohou být aktivovány proteolytickým štěpením svých inaktivních proforem, což vede k tvorbě podjednotek enzymaticky aktivních proteáz. Aktivace kaspáz byla dokumentována u většiny nádorových buněk, u nichž byla s využitím chemoterapeutických léků úspěšně indukována programovaná buněčná smrt.

Přenos apoptotických signálů byl prokázán u několika cytokinových receptorů TNF rodiny, mezi něž patří například TNF-R1 (CD120a), Fas (CD95), DR3 (Wsl-1; Tramp), DR4 (Trail-R1), DR5 (Trail-R2) a CAR-1. Tyto receptory jsou tvořeny evolučně zachovanou cytozolovou doménou, která je známá jako „*death domain*“ (DD), a je zodpovědná za získání adapterových proteinů jako je Fadd/Mort-1 do komplexu receptorů po jejich vazbě s ligandy. Protein Fadd/Mort-1 je tvořen jak DD, tak rovněž další doménou nezbytnou pro interakci s jinými proteiny nazývanou „*death effector domain*“ (DED). Tato oblast (DED) proteinu Fadd/Mort-1 se váže s homologními oblastmi (DED) pouze některých kaspáz (kaspáza 8 a 10). Takto neaktivní kaspáza (pro-kaspáza) je odštěpením pro-domén obsahujících DED uvolněna do cytoplazmy, kde jako aktivní proteáza může štěpit další neaktivní kaspázy (prokaspázy).

Byla objevena nová rodina proteinů IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) označovaných za supresory apoptózy působících jako inhibitory kaspáz. Bylo prokázáno, že IAP proteiny se váží s kaspázami 3, 7 a 9 a inhibují jejich funkci a neváží se s kaspázami 1, 6, 8 a 10. Není mnoho informací o expresi proteinů IAP rodiny v lidských

normálních tkáních a nádorech. Jeden z rodiny IAP proteinů „survivin“ je overexprimován u velké skupiny lidských nádorů.

Apaf-1 - Faktor aktivující apoptotické proteázy

Apaf-1 je dosud jediný homolog proteinu CED-4 identifikovaný u savců. N-terminální kaspázová doména zprostředkovává interakce s pro-doménou kaspázy 9 a umožňuje proteinu Apaf-1 indukovat samoaktivaci kaspázy 9. C-terminální oblast proteinu Apaf-1 se liší od CED-4 přítomností 12 tandemových kopií WD domény a hraje důležitou roli jako negativní regulátorová oblast, která udržuje tento protein v buňce v inaktivní formě, čímž brání vazbě s kaspázou 9. Apaf-1 tedy vyžaduje aktivační krok, který tomuto proteinu umožní interakci s kaspázami a spuštění mechanismů programované smrti buněk. Jedním ze známých mechanismů zodpovědných za aktivaci proteinu Apaf-1 je jeho interakce s cytochromem-c, který po vazbě na Apaf-1 uvolňuje represi funkce tohoto proteinu způsobenou WD doménou. Cytochrom-c je uchováván v mitochondriích mezi vnější a vnitřní membránou těchto organel. Po účinku stimulátorů apoptózy, jako jsou chemoterapeutické léky, záření a odstranění růstových faktorů, je tento cytochrom-c uvolněn do cytoplazmy.

Bcl.2

U člověka byla popsána Bcl-2 rodina apoptózu regulujících proteinů, která je tvořena nejméně 17 homology proteinu CED-9. Protein CED-9 byl identifikován jako velmi účinný supresor buněčné smrti u *Caenorhabditis elegans*, který se váže na CED-4, čímž brání aktivaci CED-3. Některé z rodiny Bcl-2 proteinů (např. Bcl-2, Bcl-X_p, Bcl-W, Mcl-1 a Al/Bfl-1) potlačují proces apoptózy stejným mechanismem účinku jako CED-9. Bylo prokázáno, že Bcl-X_p může interagovat s proteinem Apaf-1, homologem CED-4.

Také byla objevena řada antagonistů apoptózy (BAD, Bik, Bid atd.), které působí jako transdominantní inhibitory antiapoptotických proteinů. Protein s obdobnou funkcí byl nalezen rovněž u nematodů (EGL-1). Vazba těchto antagonistů s Bcl-2 nebo Bcl-X_L brání jejich interakci s Apaf-1 a dalšími proteiny stejně jako inaktivuje celou řadu jejich funkcí. Na rozdíl od nematodů byla u člověka objevena skupina pro-apoptotických proteinů patřících do Bcl-2 rodiny, které mají podstatný vliv na indukci apoptózy (např. Bax, Bak atd.). Tyto proteiny mají samostatnou cytodestruktivní aktivitu a schopnost interagovat s Bcl-2, Bcl-X_L a dalšími členy antiapoptotické rodiny proteinů. Na rozdíl od antiapoptotické rodiny Bcl-2 proteinů, která brání uvolnění cytochromu-c z mitochondrií, bylo prokázáno, že Bax se podílí na jeho uvolňování [1].

2.1.2.4. Mutace antionkogenů a protoonkogenů v nádorové tkáni

U nádorových onemocnění se takřka pravidelně setkáváme se dvěma základními typy genetických poškození. Prvním typem poškození jsou dominantní mutace protoonkogenů a druhým typem jsou recesivní mutace antionkogenů.

2.1.2.5. Antionkogeny - nádorově supresorické geny

Velká většina mutací, které vedou k vývoji nádorů, jsou mutace somatické a vyskytují se pouze v nádorových buňkách pacienta. Podíl zárodečných mutací je ve většině případů nízký (Li-Fraumeni syndrom, FAP).

Nádorově supresorické geny se od předchozích onkogenů odlišují tím, že kódují proteiny, které se podílejí na kontrole buněčného růstu a procesu diferenciace a ztráta jejich funkce je zodpovědná přímo za změněný fenotyp nádorové buňky. Existenci antionkogenů poprvé předpověděl A. Knudson v roce 1971 na základě statistické analýzy incidence retinoblastomu [4].

Tabulka 1: Seznam nejznámějších antionkogenů a mechanismus jejich účinku

Skupina	Gen	Typ nádoru	Lokalizace proteinu	Mechanismus účinku
Retinoblastom	RB-1	Retinoblastomy, osteosarkomy	Jádro	Transkripční regulátor/faktor
Li-Fraumeni	p53	Sarkomy, karcinom prsu, nádory mozku	Jádro	Transkripční faktor
Familial adenomatous polyposis (FAP)	APC	Adenomatózn) polypy, karcinom střeva	Cytoplazma	Regulátor funkce beta-kateninu
Wilmsův nádor	WT-1	Nefroblastom	Jádro	Transkripční faktor
Neurofibromatóza typu 1	NF-1	Neurofibromy, sarkomy, gliomy	Cytoplazma	P21-ras-GTP-ázový aktivátor
Neurofibromatóza typu 2	NF-2	Schwannomy, meningiomy	Cytoplazma	Ovlivňuje spojení cytoskeletu a membrány
Von-Hippel Lindau	VHL	Karcinomy z renálních buněk, feochromocytomy, hernangiomy	Jádro	Regulace elongace transkripce
Familiární melanom a karcinom pankreatu	pl6	Melanom, karcinom pankreatu	Jádro	Inhibitor cyklin dependentních kináz
Familiární karcinom prsu	BRCA1 BRCA2	Karcinomy prsu a vaječníku	Jádro?	Neznámý
Tuberózní skleróza	TSC2	Nádory ledvin a mozku	Golgi?	P21-rap-GTP-ázový aktivátor

Antionkogeny lze tedy definovat jako geny, jejichž represe, inaktivace, dysfunkce nebo ztráta mají za následek buněčnou transformaci. Při převážně monofaktoriálním vzniku nádoru lze vysledovat autozomálně dominantní typ dědičnosti u malignit

podmíněných právě antionkogeny. Jedná se o takzvanou teorii dvojího zásahu (*two hit hypothesis*) formulovanou Knutsonem, která vede ke ztrátě heterozygosity (LOH). Ztrátou heterozygosity (LOH) se rozumí vznik mutace, která funkčně vyřadí i druhou alelu genu (antionkogenu). První alela je již nefukční z důvodu přítomnosti zárodečné mutace [4].

Retinoblastomový gen (RB-1, OMIM: +180200, genový lokus 13q14.1-q14.2)

Retinoblastomový gen je prototyp nádorového antionkogenu, jeho inaktivace je klíčová ve vývoji řady lidských nádorů. Tento fosfoprotein (105 kD) má jadernou lokalizaci a hraje důležitou roli při kontrole transkripce jiných proteinů a jako regulátor buněčného dělení [5]. Je exprimován v každé buňce a existuje v různé fosforylovaných formách, což závisí na stadiu buněčného cyklu. V G_0 fázi se protein Rb nachází převážně v nefosforylované formě a působí jako supresor buněčného dělení, zatímco v případě, že je hyperfosforylován, ztrácí tuto svoji antiproliferační - antionkogenní funkci.

Ve své aktivní formě (hypofosforylovaný Rb) brání rovněž postupu buněk z G_2 do S fáze buněčného cyklu. Stimulací buněk růstovými faktory je Rb protein inaktivován celou řadou fosforylací a tyto buňky pak mohou přejít z G_1 do S fáze. Buňky nacházející se v S fázi se dále dělí bez dalších účinků růstových faktorů. Během následné M fáze jsou pak fosfátové skupiny z proteinu Rb odstraněny pomocí buněčných fosfatáz za vzniku hypofosforylované formy Rb proteinu. Molekulární účinek tohoto proteinu je založen na inaktivaci proteinů důležitých pro proces buněčné proliferace a v jádře je závislý především na interakci hypofosforylované formy Rb s rodinou transkripčních faktorů E2F.

V klidových buňkách oba proteiny tvoří v G_1 fázi navzájem komplex a brání tak transaktivaci některých genů zodpovědných za regulaci buněčného růstu.

V případě stimulace růstu buňky dochází ke zvýšení koncentrace cyklinů D a E, které tvoří s cyklin dependentními kinázami komplexy cyklin D/cdk4, cyklin D/cdk6 a cyklin E/cdk2 a jsou zodpovědné za hyperfosforylace Rb (přechod buněk z G_1 do S fáze), přičemž dochází k uvolnění E2F faktoru a k opětné kontrole buněčného dělení hypofosforylovanou formou Rb. Volný E2F faktor tvoří heterodimery s jinými proteiny buněčného cyklu a je schopen aktivovat transkripci mnoha cílových regulačních genů nesoucích E2F-DNA vazebné místo, které jsou nezbytné pro průběh S fáze buněčného dělení. Protein Rb samozřejmě interaguje i s jinými transkripčními faktory jako je N-myc a *c-myc*, u nichž snižuje jejich hladinu v buňce. Z předcházející konfrontace

poznatků je zřejmé, že nepřítomnost funkčního Rb proteinu, který není schopen regulovat transkripční faktor E2F, vede k uvolnění kontrolních bodů buněčného dělení a bezprostřednímu snadnému přechodu buněk do S fáze [5].

Gen P53 (OMIM: +191170)

Mezi nejčastěji se vyskytující mutace u lidských nádorů patří mutace antionkogenu P53. Gen P53, nacházející se na chromozomu 17p13.1, je mutovaný u více než 50 % většiny typů lidských nádorů. Tento gen kóduje jaderný fosfoprotein o molekulové hmotnosti 53 kDa, který je negativním regulátorem přechodu G₁/S fáze buněčného dělení [6-10]. Fosforylace proteinu p53 na rozdílných serinech probíhá během buněčného cyklu a této fosforylace se účastní řada kináz (cdc2, CKII, DNA-PK, PKC, atd.). Hlavní biochemickou funkcí nemutované přirozené formy proteinu p53 (*wild-type* p53) je kontrola normálního průběhu buněčného cyklu regulací transkripce a DNA-replikace. Protein p53 se vyskytuje v jádře a je schopen vazby na specifické sekvence DNA a je tedy potenciálním transaktivátorem všech genů nesoucí zmíněné specifické sekvence. Inaktivace obou alel genu P53 byla nalezena u většiny typů nádorů a zejména u karcinomů plic, tlustého střeva a prsu. Ve většině případů došlo k inaktivaci obou alel P53 v somatických buňkách, ale sporadicky se můžeme setkat i se zděděnou jednou deaktivovanou alelou pro gen P53. Jedinci s rodinným nádorovým syndromem děděným autozomálně dominantně a označovaným jako „*Li-Fraumeni syndrom*“ mají 25x vyšší šanci tvorby zhoubných nádorů do svých 50 let věku než normální populace a dokonce 90% penetranci nádorového onemocnění ve věku 70 let [11-13]. Z celé řady získaných poznatků je zřejmé, že protein p53 působí jako „molekulární strážce“, který brání rozšíření geneticky poškozených buněk.

Mechanismy poškozující DNA, UV světlo, mutagenní látky atd., zvyšují expresi transkripčně aktivního proteinu p53. Takto akumulovaný protein se váže na specifické sekvence DNA a stimuluje expresi řady genů, které zprostředkovávají dva důležité efekty p53:

- zastavení buněčného cyklu v pozdní G₁ fázi a
- programovanou smrt buňky.

Proteinem p53 indukovaný blok buněčného cyklu je způsoben p53 závislou indukcí inhibitoru cdk proteinu p21^{WAF1}. Protein p21^{WAF1} inhibuje tvorbu komplexu mezi cykliny a cdk, a tím brání fosforylaci proteinu Rb, která je nezbytná pro přechod buněk do S fáze [14]. Zastavení buněk před vstupem do S fáze umožňuje reparaci poškozené DNA. Protein p53 se na tomto procesu podílí rovněž přímo indukcí transkripce

GADD45 (*Growth Arrest and DNA Damage 45 protein*) proteinu podílejícího se na DNA reparaci [15]. Je-li poškozená DNA správně opravena, p53 aktivuje gen *mdm2*, který je zodpovědný za inhibici transkripční aktivity p53 zablokováním jeho transkripční domény.

V případě, že poškození DNA je příliš rozsáhlé a není opraveno v průběhu bloku v G₁ fázi, funkční protein p53 navodí programovanou smrt takto poškozených buněk aktivací apoptózu indukujících genů *bax* a *IGF-BP3*. Na základě výše popisovaných aktivit byl tento antionkogen označen jako „strážce genomu“ („*guardian of the genome*“). Stejně jako je tomu u jiných anti-onkogenů, mutace P53 genu nejsou odpovědné pouze za ztrátu jeho supresorické funkce, ale mohou P53 aktivovat jako onkogen s transformační aktivitou. Tento efekt je označován jako dominantně-negativní [1].

BRCA-1 a BRCA-2 geny (breast cancer predisposition gene, OMIM: +113705, OMIM: + 600185)

Tyto antionkogeny jsou spojovány s výskytem řady nádorů, ale nejčastěji nádorů prsu a ovária se vyskytují na chromozomech 17q12-21 (BRCA-1) and 13q12-13 (BRCA-2). Jedinci, kteří zdědí mutovanou alelu BRCA-1, mají zvýšenou predispozici k vývoji karcinomu prsu a ovaria a mírně zvýšené riziko tvorby karcinomu prostaty a tlustého střeva. Mutace v genu BRCA-2 zvyšují riziko vývoje karcinomu prsu u žen i u mužů, karcinomů ovaria a pravděpodobně i karcinomů prostaty, pankreatu a laryngu. Přibližně 5-10 % karcinomů prsu je hereditárního původu a v 80 % těchto případů se setkáváme s mutacemi v BRCA-1 a BRCA-2 [1]. Proteiny BRCA-1 a BRCA-2 se nacházejí v jádře a podílejí se na regulaci transkripce [16]. Mutace v BRCA genech nejsou tedy přímo odpovědné za regulaci buněčného růstu, ale umožňují vznik chyb při DNA replikaci, které vedou ke vzniku mutací v jiných regulačních genech, které se přímo podílejí na regulaci buněčného růstu.

APC gen (adenomatous polyposis coli, OMIM:+175100)

Zděděné mutace v APC genu, nacházejícího se na chromozomu 5q21, jsou příčinou FAP (familial adenomatous polyposis) [17], onemocnění charakterizovaného vývojem mnohačetných pre-maligních polypů ve druhé a třetí dekádě života. Téměř vždy jeden nebo více polypů projde procesem maligní transformace a vzniku karcinomu tlustého střeva. Somatické mutace tohoto genu byly rovněž nalezeny u sporadických karcinomů tlustého střeva (60 %), sporadických adenomů (63 %) a karcinomů trávicího traktu a jsou vždy asociovány s mutacemi jiných genů. Protein APC se podílí na negativní

regulaci Wnt signální dráhy vazbou na β -katenin, tím způsobuje jeho degradaci a udržuje jeho nízké hladiny v cytoplazmě [18,19]. Inaktivace genu APC a s tím spojená ztráta jeho proteinu vede ke zvýšení hladiny β -kateninu, který přejde do jádra a zvýší buněčnou proliferaci. Důležitost APC- β -katenin signální dráhy v procesu nádorové přeměny buňky je nepřímo potvrzena skutečností, že u karcinomů tlustého střeva s funkčním APC byly nalezeny mutace, které se vyskytují v β -kateninu a jsou odpovědné za jeho stabilizaci a odolnost vůči APC degradaci. Převážná většina mutací v APC u FAP je odpovědná za vznik stop kódonů nebo posunu čtecího rámce - „frame shiftu“. Mutace se vyskytují v celém rozsahu genu, nejvíce však v rozsahu kodonů 1250-1400 15. exonu. Mutace v různých oblastech genu mají rozdílný efekt na vývoj polypósy, což lze doložit počty polipů u konkrétních postižených osob [20]. K dnešnímu dni bylo popsáno 583 mutací tohoto genu [21].

Geny NF-1 (neurofibromatosis type 1, OMIM:+162200) a NF-2 (neurofibromatosis type 2, OMIM:+607379)

Gen NF-1 se nachází na chromozomu 17q11.2 a svou funkcí se podobá genu APC. U jedinců, kteří zdělili jednu mutaci v genu NF-1, se v důsledku ztráty druhé alely tohoto genu vyvíjí mnoho benigních neurofibromů, z nichž některé se později mohou vyvinout v neurofibrosarkomy. Děti, u kterých se vyskytuje tento typ onemocnění, mají rovněž větší riziko pro vývoj akutní myeloidní leukemie. Inaktivace obou alel NF-1 genu byla popsána navíc u melanomů a neuroblastomů, což potvrzuje jeho úlohu jako nádorového supresoru. Protein kódovaný NF-1 genem se jmenuje neurofibromin a patří do rodiny GTP aktivujících proteinů. Tento protein umožňuje přeměnu neaktivní formy proteinu *ras* ve formu aktivní a má důležitou roli při regulaci signálních přenosů řízených p21 proteinem. Zárodečné mutace genu NF-2 jsou odpovědné za predispozici jedince k tvorbě neurofibromatózy typu 2. U těchto pacientů se vyvíjí oboustranný neurinom-schwannom akustického nervu. Proteinový produkt tohoto genu se nazývá merlin a tvoří komplex na jedné straně s aktinem a na druhé straně s transmembránovým proteinem CD44, který se podílí na interakcích buněčné matrix [1].

WT1 gen (Wilmsův tumor, OMIM:+607102)

Tento gen se nachází na chromozomu 11p13 a jeho delece nebo mutační inaktivace byla nalezena u dědičné i sporadické formy Wilmsova nádoru dětí. Wt1 protein je tkáňově specifický regulátor transkripce, který pravděpodobně inhibuje transkripci genů

podporujících růst a vyskytuje se hlavně v močovém ústrojí během embryonálního vývoje [22].

VHL gen (Von Hippel-Lindau OMIM:+608537)

Dědičné mutace tohoto genu, který se nachází na chromozomu 3p26-p25, se vyskytují u dědičných forem nádorů renálních buněk, feochromocytomů, hemangioblastomů centrálního nervového systému, ale i angiomů sítnice a ledvinných cyst. Mutace tohoto genu jsou rovněž nalézány u sporadických nádorů z renálních buněk. Protein VHL reguluje transkripci elongace RNA polymerázou a není doposud jasné, jak tento proces může být spjat s procesem nádorové přeměny buňky [1].

Rodina genů kódujících glykoproteiny typu Cadherinů (Cadherin 1- Cadherin 22)

Cadheriny jsou glykoproteiny, jejichž funkcí je spojování a vzájemná adheze epiteliálních buněk. Ztráta těchto proteinů vede ke snadnému rozvolnění epiteliálních buněk, které pak mohou lokálně invadovat nebo metastazovat. U řady nádorů (nádory jícnu, tlustého střeva, prsu, ovaria a prostaty) byla sledována snížená exprese E-cadherinu na povrchu buněk. Tak jako je tomu u jiných antionkogenů, zárodečné bodové mutace v genu kódujícím E-cadherin mohou vést k tvorbě dědičné predispozice vzniku žaludečního karcinomu. Z hlediska molekulárně biologického existují dvě příčiny, které ovlivňují normální funkci proteinu E-cadherinu:

- primární redukce exprese proteinu E-cadherinu inaktivací genu (chromozom 16q) kódující tento protein bodovými mutacemi,
- sekundární redukce exprese E-cadherinu bodovými mutacemi v genu kódujícím expresi proteinu P-kateninu, který je ve funkční formě schopen vazby na intracelulární oblast cadherinů, čímž stabilizuje jejich expresi [1].

DCC gen (Deleted in Colorectal Carcinoma, OMIM:+420170)

Antionkogen DCC je deletován u nádorů tlustého střeva a rekta a je lokalizován na chromozomu 18q21-22. Gen kóduje membránový receptor s vysokou homologií s jinými molekulami buněčného povrchu, které se podílejí na interakcích buňka-buňka a interakcích buňka-matrice. Z těchto důvodů se předpokládá, že DCC je zodpovědný za regulaci buněčného růstu a diferenciaci tím, že integruje signály přicházející z buněčného prostředí [1].

2.1.2.6 Úloha antionkogenů u sporadických nádorů

Supresorové geny byly původně objeveny u familiárních nádorových syndromů jako je familiární retinoblastom nebo Li-Fraumeni syndrom. Delece a/nebo mutace obou alel mohou vést ke vzniku různých typů familiárních syndromů a přitom se mnohé supresorické geny (mimo antionkogen p53) jeví jako tkáňově specifické. Nicméně alterace těchto genů jsou popisovány rovněž u různých typů sporadických nádorů (jako jsou mutace Rb u nádorů prsu a plic a mutace NF1 u melanomů). Doba vzniku mutací u tkáňově specifických antionkogenů je velmi kritická pro vývoj nádorového onemocnění, čímž lze vysvětlit, proč u pacientů s vrozenou mutací v Rb genu dochází ke vzniku retinoblastomu v dětském věku, zatímco získané mutace Rb genu se mohou nacházet u řady nádorů v různém věkovém rozmezí [1].

2.1.2.7. Protoonkogeny a onkogeny

Onkogenní aktivace může být způsobena kvantitativními nebo kvalitativními změnami exprese protoonkogenů, genů podporujících růst. Kvalitativní změny jsou způsobeny změnami ve struktuře genu mající za následek syntézu abnormálního genového produktu (onkogenu), které má zvýšenou funkci. Kvantitativní změny ovlivňují regulaci genové exprese, které vedou ke zvýšené nebo nepřiměřené produkci strukturálně nezměněné formy normálního proteinu podporujícího růst.

Tyto změny způsobují následující mechanismy:

- Inzerce retrovirů do buněčného genomu ovlivňuje kontrolu buněčných genů silnými retrovirovými promotory, které jsou zodpovědné za aberantní expresi protoonkogenů, což má za následek konstitutivní expresi normálního proteinu.
- Genové amplifikace protoonkogenů jsou zodpovědné za zvýšenou produkci DNA matrice pro tvorbu mRNA, což vede k nesprávné expresi kódovaných proteinů.
- Chromozomové přestavby, translokace nebo inverze, mohou nejčastěji aktivovat protoonkogeny vznikem abnormální transkripční regulaci postižených genů (translokací odlišných regulačních elementů) nebo vznikem zkrácených nebo fúzovaných genů s abnormální funkcí.
- Bodové mutace mohou vést ke strukturálním nebo regulačním změnám ovlivňujícím projev protoonkogenů.

Velká většina protoonkogenů kóduje proteiny, které se podílejí na přenosu vnějších růstových a diferenciacních signálů z povrchu buňky do cytoplazmy a do jádra. Jako onkogeny mohou působit kvantitativně nebo kvalitativně změněné exprese genů:

- růstových faktorů
- receptorů pro růstové faktory
- přenašečů signálů vázaných na membránu
- cytoplazmatických přenašečů signálů
- jaderných transkripčních faktorů
- cyklinů a cyklin-dependentní kináz (cdk) [1].

Geny růstových faktorů působící jako onkogeny

Konstitutivní exprese růstových faktorů buňkami, které exprimují receptory pro tyto faktory, může vést k tvorbě autokrinní proliferací smyčky zodpovědné za autonomní růst vycházející z buňky samotné. Některé z těchto autokrinních smyček jsou specifické pouze pro určité typy buněk, jako je produkce peptidů shodných s bombensinem buňkami malobuněčného karcinomu plic. Jiné, jako je TGF α (transforming growth factor α) se vyskytují u řady nádorů různého histogenetického původu. Růstový faktor TGF α je příbuzný s EGF (epidermal growth factor) a je zodpovědný za indukci proliferace vazbou na EGF receptor [1].

Geny receptorů prorůstových faktorů působící jako onkogeny

Onkogenní formy těchto receptorů se vyznačují trvalou dimerizací a aktivací bez vazby odpovídajících růstových faktorů a dodávají stabilní signály pro vstup buněk do mitózy.

Mezi nejznámější členy rodiny EGFR patří tři geny (C-ERB B1, C-ERB B2, C-ERB B3), jejichž zvýšená exprese normální formy se vysvětluje v některých případech genovou amplifikací, zatímco u větší skupiny případů molekulární podstata těchto změn není známa. Bodové mutace vedoucí k inaktivaci těchto genů nejsou velmi časté. Normální forma C-ERB B1 má zvýšenou expresi proteinu u 80% spinocelulárního karcinomu plic a méně často u karcinomů močového měchýře, GIT a astrocytomů. C-ERB B2 (c-neu) je oproti C-ERB B1 amplifikován u vysokého procenta lidských karcinomů prsu, ovária, adenokarcinomů plic, žaludku a slinných žláz [1].

Geny přenašečů signálů vázaných na membránu působící jako onkogeny

Tato skupina onkogenů se může rozdělit dle povahy produktů na skupinu s aktivitou tyrozinkinázovou a skupinu s aktivitou GTP-ázovou.

Protoonkogen C-ABL má tyrozinkinázovou aktivitu kontrolovanou negativní regulační doménou. V případě chronické myeloidní leukémie a u některých akutních lymfoblastických leukémií je kontrolní funkce negativní regulační domény eliminována translokací genu C-ABL z chromozómu 9 na chromozom 22 t(9,22), kdy dochází k fúzi C-ABL s částí genu BCR (break point cluster region) za vzniku hybridního genu kódujícího fúzní protein s potentní tyrozinkinázovou aktivitou.

Mezi nejčastěji mutované onkoproteiny přenašečů signálů patří geny rodiny

RAS - Harvey (Ha), Kirstein (Ki), neuroblastoma (A) – vázající guanidin 5' trifosfát (GTP). 15 – 20% všech lidských nádorů obsahuje mutace v genech RAS K-ras mutace jsou u 30% plicních karcinomů, u 50% kolorektálních karcinomů

a u 90% karcinomů pankreatu [23-25]. Normální ras proteiny jsou přítomny v buňce jak v aktivní (signály přenášející), tak inaktivní formě. V neaktivní formě se ras váže s GDP a v případě, že buňky jsou stimulovány růstovým faktorem dochází k aktivaci ras výměnou GDP za GTP. Takto aktivovaný ras interaguje s cytosolovým proteinem raf-1, čímž dochází ke stimulaci MAP kinázy. Tato kináza aktivuje cílové transkripční faktory v jádře a tím podporuje průběh mitózy. V normálních buňkách je ras v aktivní formě pouze přechodně, protože jeho vlastní GTPázová aktivita hydrolyzuje GTP za vzniku GDP a tím se přeměňuje do inaktivní formy [1].

Geny jaderných transkripčních faktorů působící jako onkogeny

Stimulace buněk mitogenními látkami vyvolává fosforilaci velkého množství buněčných proteinů na serinu a treoninu. Rodina c-raf protoonkogenů se skládá ze 3 molekul (C-raf, A-raf, a B-raf) se serin/treonin kinázovou aktivitou. Protein C-raf je bezprostředně fosforilován PKC protein kinázou C v okamžiku, kdy klidové buňky jsou stimulovány mitogeny (jako PDGF, EGF), což má za následek zvýšení jeho katalytické aktivity. Onkogenní změna C-raf-1 je způsobena delecí v N-koncové oblasti a vede k permanentní aktivaci proteinkinázové aktivity [1].

Geny cyklinů a cyklin-dependentních kináz (cdk) působící jako onkogeny

Postup buněčného cyklu u savčích buněk je koordinován aktivací cyklinů a cyklin-dependentních kináz (cdk). Mutace, které rozvrací regulační aktivitu cyklinů a cdk a které byly nalezena u mnohých nádorů podporují proces buněčné proliferace. Z těchto

důvodů jsou cykliny a některé cyklin-dependentní kinázy (cdk) považovány za protoonkogeny. Zvýšená exprese Cyklinů D byla zaznamenána u nádorů prsu, jícnu jater a u lymfomů. Genová amplifikace cdk4 je běžná u melanomů, sarkomů a glioblastomů [1].

2.1.2.8. Typy mutací měnících genetickou informaci

Mutace je změna genotypu, jejíž molekulární podstatou je *nukleotidová substituce*, *delece* nebo *inzerce*. *Nukleotidová substituce*, výměna nukleotidu (jednořetězcová nukleotidová kys.) nebo nukleotidového páru (dvořetězcová nukleotidová kys.) probíhá dvěma způsoby: *transicí* (výměna purinového nukleotidu za purinový a pirimidinového za pirimidinový) a *transverzí* (výměna purinového nukleotidu za pirimidinový a naopak).

Pro *nukleotidovou substituci* se v současnosti také používá termín „*single nucleotide polymorphism*“ (SNP). Ve strukturních genech může vést substituce ke změně smyslu kodonu nebo ke vzniku terminačního kodonu. Substituce měnící kodon pro určitou aminokyselinu v kodon pro jinou aminokyselinu se označují jako *mutace měnící smysl kodonu*. Pokud tato mutace nemění konformaci polypeptidového řetězce, jedná se o *konzervativní nukleotidovou substituci*. Změní-li se kodon pro aminokyselinu v kodon nesmyslný (terminační), jde o *mutaci nesmyslnou (beze smyslu)*. V rámci téže kodonové rodiny vedou ke změně smyslu kodonu jen ty substituce, které se týkají prvních dvou nukleotidu.

Delece je ztráta jednoho nebo více nukleotidů z nukleotidové sekvence, *inzerce* je naopak vložení jednoho nebo více nukleotidů do nukleotidové sekvence. Mutace způsobená delecemi nebo inzercemi, které nejsou násobkem tří nukleotidů a mění proto čtecí rámec, se označuje jako *posunová*.

Alela příslušného genu převládající v přírodní populaci se označuje jako *standardní alela*. Od ní se odvozuje *alela mutantní*, tj. alela změněná mutací, která nemusí být funkční, což se může odrazit ve fenotypu. Mutantní alely, které se ve fenotypu neprojevují, jsou výsledkem tzv. tiché mutace, spočívající ve změně kodonu, která se neprojevuje ve funkci polypeptidového řetězce.

Geny jsou v různé míře mutabilní, tzn. mají schopnost mutovat. Asi neexistují geny, které by nebyly mutabilní, protože tato vlastnost vyplývá z chemických vlastností bází. Mutace mohou vznikat spontánně, *spontánní mutace*, nebo mohou být indukované, *indukované mutace*, a to fyzikálním faktorem nebo chemickou látkou (mutagenem).

Kromě mutace se na změnách genetické informace podílí též rekombinace. Může dojít k *obecné rekombinaci*, která je výsledkem crossing-overu probíhajícím mezi kterýmikoliv geny nebo sekvencemi alel homologických vazbových skupin. Nebo může proběhnout *specifická rekombinace*. Tato je výsledkem crossing-overu uskutečňujícího se mezi homologickými sekvencemi dvou jinak nehomologických vazbových skupin. *Obecná rekombinace* může být *intergenová*, probíhající mezi geny homologických vazbových skupin, nebo *intragenová*, vznikající mezi nukleotidovými sekvencemi alel téhož genu.

K *obecné rekombinaci* dochází u všech eukaryot a to mezi virovými genomy, kterými je infikována hostitelská buňka a během meiózy a mitózy.

Specifická rekombinace se týká integrace genomu některých fágů a jiných virů do chromozomu hostitelské buňky. Byla např. popsána v souvislosti s integrací viru HIV a dalších retrovirů do chromozomu hostitelské buňky [26].

2.1.3. Proteiny rozrušující extracelulární matrix

2.1.3.1. Matrixové metaloproteinázy

Matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou rodina vysoce konzervovaných endopeptidáz, které mají schopnost degradovat většinu komponent bazální membrány. Matrixové metaloproteinázy se prostřednictvím remodelace extracelulární matrix (ECM) uplatňují při procesech migrace buněk extracelulární matrix, prostřednictvím změny extracelulární matrix metaloproteinázami mohou buňky přejít do proliferace, apoptózy nebo morfogeneze. MMPs mohou také měnit aktivitu biologických faktorů jako jsou růstové faktory a receptory růstových faktorů [27]. Jejich fyziologická a patologická funkce se projevuje také v modulaci extracelulární matrix během embryogeneze, ovariálního cyklu nebo při zánětu a nemocech jako revmatická artritida, fibróza jater, ledvin [28]. Účastní se také procesu degradace ECM a BM ve vztahu k nádorové invazivitě [29, 30, 31]. Regulace matrixových metaloproteináz probíhá na několika úrovních, na úrovni jejich transkripce, jejich aktivace a prostřednictvím specifických tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMPs) [27].

V současnosti je známo více než 28 lidských matrixových metaloproteináz a nové jsou stále objevovány. Klasifikace a nomenklatura MMPs je založena na kombinaci substrátové aktivity *in vitro*, aminokyselinové sekvenci a proteinové struktury. Některé matrixové metaloproteinázy zachovávají historické číslování. Typy MMPs nevázané na membránu jsou klasifikovány podle jejich substrátové aktivity: kolagenázy (MMPs 1, 8, 13 a 18), želatinázy (MMP-2 a MMP-9), stromelysiny (MMPs 3, 10 a 11), matrilysiny

(MMP-7 a MMP-26), makrofágová elastináza (MMP-12), enamelysin (MMP-20), membránové MMPs (MT-MMPs; MMPs 14-17, 24 a 25) a v současnosti objevené matrixové metaloproteinázy (MMPs 19, 21, 23, 27 a 28) jsou ve skupině nezařazené, tabulka 2.

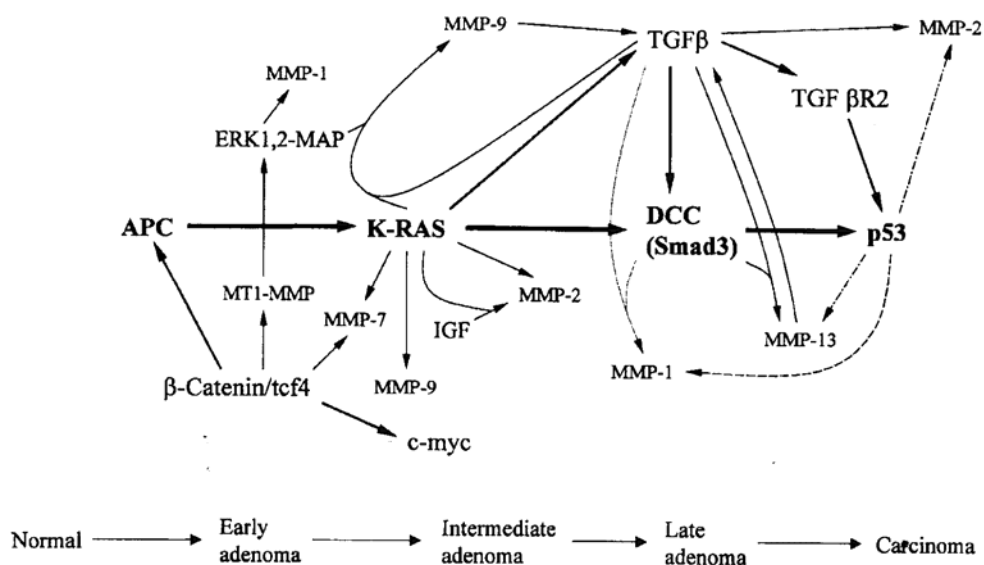
Tabulka 2: Přehled matrixových metaloproteináz s jejich substrátovou specifikitou.

<i>Matrixové metaloproteinázy</i>			
<i>skupina</i>	<i>druh</i>	<i>zkratka</i>	<i>primární substrát</i>
<i>kolagenázy</i>	<i>intersticiální kolagenáza</i>	<i>MMP-1</i>	kolagen typu I, II, III, VII, VIII, IX, gelatin
	<i>neutrofilní kolagenáza</i> <i>kolagenáza 2</i>	<i>MMP-8</i>	kolagen typu I, II, III
	<i>kolagenáza 3</i>	<i>MMP-13</i>	aggrekan, kolagen I, II, II, gelatin
	<i>xenopus kolagenáza</i>	<i>MMP-18</i>	
<i>gelatinázy</i>	<i>gelatináza A</i>	<i>MMP-2</i>	kolagen typu IV, V, VII, X, elastin, fibronektin, gelatin, prokolagenáza-3
	<i>gelatináza B</i>	<i>MMP-9</i>	kolagen typu IV, V, elastin, gelatin
<i>stromelyziny</i>	<i>stromelyzin-1</i>	<i>MMP-3</i>	kolagen typu III, IV, V, IX, kolagenáza 1, entaktin, fibronektin, gelatin, laminin, proteoglykany
	<i>stromelyzin-2</i>	<i>MMP-10</i>	kolagen typu III, IV, V, IX, fibronektin, gelatin, laminin, proteoglykany
	<i>stromelyzin-3</i>	<i>MMP-11</i>	fibronektin, laminin, a-1-proteinase inhibitor
<i>matrilyziny</i>	<i>matrilyzin</i>	<i>MMP-7</i>	kolagen typu IV, elastin, entaktin, fibronektin, gelatin, laminin, tenascin
	<i>matrilyzin-2</i>	<i>MMP-26</i>	fibrinigen, fibronektin
<i>elastázy</i>	<i>metaloelastázy</i>	<i>MMP-12</i>	elastin, fibrinigen, fibronektin
<i>metaloproteinázy membránového typu</i>	<i>MT1-MMP</i>	<i>MMP-14</i>	kolagen I, II, III, fibronektin, prokolagenáza-3, progelatináza A, proteoglykany
	<i>MT2-MMP</i>	<i>MMP-15</i>	progelatináza A
	<i>MT3-MMP</i>	<i>MMP-16</i>	kolagen III, fobronektin, gelatin
	<i>MT4-MMP</i>	<i>MMP-24</i>	
	<i>MT5-MMP</i>	<i>MMP-25</i>	progelatináza A
	<i>enamelyzin</i>	<i>MMP-20</i>	
<i>neklasifikované metaloproteinázy</i>		<i>MMP-19</i>	
		<i>MMP-23</i>	
		<i>MMP-27</i>	vitronektin
		<i>MMP-28</i>	epilysin

Studie jednotlivých matrixových metaloproteináz ukázaly zvýšenou expresi některých MMPs (MMP-2, MMP-7, MMP-9) ve tkáni kolorektálního karcinomu. Některé studie prokázaly statisticky významnou spojitost jejich exprese či aktivity u kolorektálního karcinomu s prognózou a dalšími klinickými údaji ale jiné ji popřely a tak vztah ke stádiu onemocnění, prognóze a dalším klinickým zůstává nejasný [27, 32]. Nyní jsou objasňovány různé role specifických MMPs v časných stádiích onkogeneze kolorektálního karcinomu. Je zajímavé zmínit, že několik MMPs se nachází na stejném chromozómovém úseku - 11q23. Tento region se ukazuje být amplifikován u několika solivních nádorů [33]. Transkripce některých MMPs, zejména MMP-7 a MT1-MMP, je aktivována klíčovými onkogeny a tumor-supresorovými geny podílejícími se na onkogenezi kolorektálního karcinomu.

V současnosti je středem zájmu u časných stádií kolorektálního karcinomu úloha metaloproteinázy MMP-7 (matrilysin), která specificky štěpí kolagen IV, elastin, intaktin, fibronectin, želatinu, laminin a tenascin. Ukázalo se, že jak mRNA genu pro matrilysin, tak matrilysinová aktivita jsou přítomny v kolorektálních adenomech. Bylo zjištěno, že absence matrilysinu potlačuje intestinální nádorový růst u myši náchylných k obdobám lidské adenomatózní polypózy (Min mice). V posledních letech došlo k objasnění mechanismů, kterými MMP-7 ovlivňuje časná stádia kolorektálního karcinogeneze. Matrilysin je jeden z cílových genů, transkripčně aktivovaných, komplexem β -catenin-tcf4, který patří mezi klíčové transkripční faktory, uplatňujících se v časných stádiích kolorektální karcinogeneze [34, 35].

Obrázek 2: Kontrolní mechanismy transkripce MMPs



Další analýzy kontrolních mechanismů transkripce MMP-7 ukázaly, že transkripce kontrolována komplexem β -catenin-tcf-4 je dále podporována transkripčními faktory PEA3 sub-family [35]. Z výše uvedeného je vyvozováno, že exprese PEA3 sub-family transkripčních faktorů spolu s hromaděním komplexu β -catenin-tcf-4 vede u kolorektálních adenomů k up-regulaci transkripce genu MMP-7. Znamená to, že transkripční up-regulace exprese MMP-7 je kontrolována geny, které jsou důležité v časných stádiích karcinogeneze.

MMP-2 degraduje molekuly kolagenu IV, který je hlavní komponentou BM, dále kolagen V, VII, X a želatinu [36]. Latentní proenzymová forma MMP-2 je udržována cysteinovým zbytkem na N-terminální peptidové doméně, který zasahuje na zinkový atom v katalytickém centru. Proteolytické odštěpení tohoto zbytku N-terminální domény aktivuje enzym [37]. Zvýšená exprese mRNA MMP-2 byla některými autory zaznamenána v nádorové kolorektální tkáni oproti normální tkáni [38, 39], jinými autory pozorována nebyla [40].

Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMPs) jsou hlavními endogenními regulátory aktivity MMPs ve tkáních. Do současnosti byly nalezeny 4 tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4 [41]. TIMP-2 se váže specificky nekovalentní vazbou na pro-form MMP-2 [42] a inhibuje jeho enzymatickou aktivitu. TIMP-1 reguluje aktivitu MMP-7. Bylo zjištěno, že zvýšené exprese TIMP-1 a TIMP-2 *in vivo* potlačuje metastázy [43], také však byla zjištěna zvýšená exprese TIMP-1 v nádorové tkáni [39].

U následujících dvou matrixových metaloproteináz a dvou tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteináz jsme se rozhodli u nádorových linií kolorektálního karcinomu a tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu kvantifikovat expresi a korelovat ji s vlastnostmi a klinickými stavy vzorků, abychom zjistili jejich potenciální využití jako nádorových markerů. Výběr jsme provedli na základě výše uvedených publikací.

- MMP-2 (72kDa, typ IV kolagenáza, želatináza A, OMIM:*120360 genový lokus:16q13)
- MMP-7 (92kDa, matrilysin, PUMP, OMIM: *178990, genový lokus:11q21-q22)
- TIMP-2 (21kDa, OMIM: *188825, genový lokus: 17q25)
- TIMP-1 (21kDa, OMIM: *305370, genový lokus: Xp11.3-p11.23)

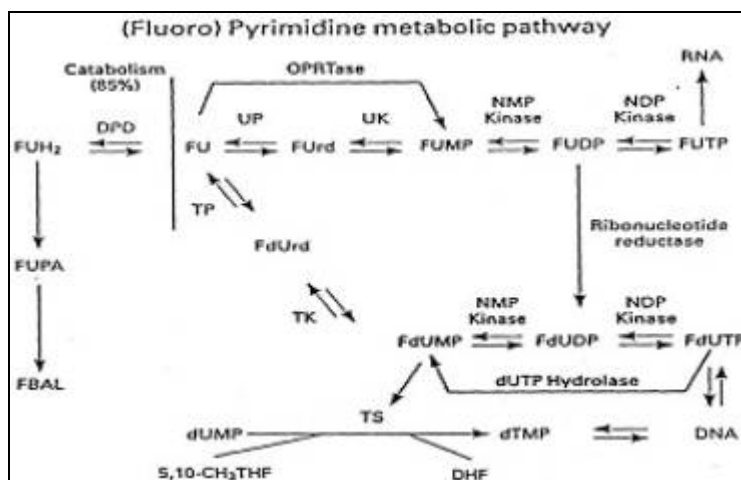
2.1.4. Geny metabolismu fluoropyrimidinů

2.1.4.1. Thymidilát syntázy (TS), thymidin fosforylázy (TP) a dihydropyrimidin dehydrogenázy (DPD) a predikce účinnosti fluoropyrimidinů

Mezi nejčastěji podávaná cytostatika u mnoha nádorových diagnóz patří 5-fluorouracil. Tento fluoropyrimidin se používá standardně při léčbě kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku, slinivky břišní, karcinomu ánu, karcinomu prsu nebo nádorů hlavy, krku a jícnu. 5-fluorouracil je základním cytostatikem pro léčbu kolorektálního karcinomu. Výhodou je relativně omezená toxicita. Mechanismus protinádorového působení 5-fluorouracilu je komplexní. Nejdůležitějším je zpomalení syntézy DNA v důsledku inhibice enzymu thymidylát syntázy (TS). Také syntéza RNA je 5-fluorouracilem negativně ovlivněna, neboť v důsledku metabolizace léku dochází k zařazování 5-fluorouridin trifosfátu do nově syntetizované mRNA, což následně vede ke vzniku chyb při translaci.

Další fluoropyrimidin, Capecitabin, je podáván jako neaktivní, a je aktivován až přeměnou enzymem thymidin fosforylázou (TP) na 5-fluorouracilu.

Efekt 5-fluorouracilu nastává teprve po intracelulární konverzi na nukleotid fluorouridinmonofosfát (5-FUMP), kdy vzniká vlastní aktivní látka, kterou je buď 5-fluorouridinmonofosfát (FdUMP) nebo 5-fluorouridintrifosfát (FUTP). První je mohutným inhibítorem thymidilát syntázy. Blokuje tedy tvorbu deoxythymidintrifosfátu (kyseliny thymidilové) a tím i syntézu DNA. Druhý z obou antimetabolitů se inkorporuje do RNA a poškozuje její funkci (44, 45, 46, 47).



Obrázek 3: Mechanismus aktivace, detoxikace a protinádorového účinku 5-fluorouracilu. DPD (dihydropyrimidin dehydrogenáza), FU (Fluorouracil), Furd (Fluorouridin), FUMP (Fluorouridin monofosfát), FUDP (Fluorouridin difosfát), FUTP

(Fluorouridin trifosfát), NMP (nukleotid monofosfát kináza), NDP (nukleotid difosfát kináza), TP (thymidin fosforyláza), FdUrd (Fluorodeoxyuridin), TK (thymidinkináza), TS (thymidylát syntáza), FdUMP (Fluorodeoxyuridin monofosfát), FdUDP (Fluorodeoxyuridin difosfát), FdUTP (Fluorodeoxyuridin trifosfát), dUMP (deoxyuridin monofosfát), dTMP (deoxythymidin fosfát), DHF (dihydrofolát).

Odbourávání 5-fluorouracilu na inaktivní metabolity je zajišťováno enzymem dihydropyrimidin dehydrogenázou (DPD). Tento enzym je přítomen ve zdravých i v nádorových buňkách. Nedostatečná aktivita DPD ve zdravých buňkách způsobuje vysokou toxicitu léčby, naopak nadměrná aktivita enzymu pozorovaná u některých nádorů vysvětluje jejich rezistenci k 5-fluorouracilu. Snížená katalytická aktivita enzymu je způsobena bodovými nebo sestřihovými mutacemi v jeho genu. Bodové nebo sestřihové mutace v genu pro DPD způsobují záměnu některých aminokyselin v proteinu DPD, čímž dochází ke snížení jeho katalytické aktivity, tabulka 3 [48].

Tabulka 3: Mutace v genu DPD způsobující snížení jeho katalytické aktivity

delece	295-298delTCAT, 1897delC
sestřihová mutace	IVS14+1GA
záměny	G62A, T85C, A496G, C703T, G1003C(T), G1156T, G2657A, G2983T)

Četnost mutací v genu pro DPD je v běžné populaci popisována mezi 1 - 5,8% [49,50]. Se sníženou expresí fyziologické varianty DPD se setkáváme buď jako s náhodným nálezem u asymptomatických jedinců nebo jako součástí vzácného, autosomálně recesivního onemocnění, projevujícího se neurologickými defekty⁵⁾ a též u nemocných, u kterých se v důsledku léčby fluoropyrimidiny vyskytne významná, život ohrožující toxicita. Aktivita DPD je u žen asi o 15% nižší než u mužů. Na konečné přeměně 5-fluorouracilu se podílí thymidin fosforyláza (TP), která se nachází jak v nádorové tak nenádorové tkáni [51, 52].

Poslední studie dále prokazují, že vysoké nádorové koncentrace enzymu thymidylát fosforylázy (TP) a thymidylát syntázy (TS) jsou negativním prediktivním faktorem léčebné odpovědi na 5-fluorouracil a jeho deriváty [117, 118, 119]. Stanovení exprese DPD by mohlo předejít toxickým, život ohrožujícím komplikacím, což je problematické zejména u pacientů s adjuvantní léčbou.

- thymidylát fosforyláza (TP, OMIM: *131222, genový lokus: 22q13.32-qter)
- thymidylát syntáza (TS, OMIM: *188350, genový lokus: 18p11.32)
- dihydropyrimidin dehydrogenázy (DPD, OMIM: +274270, genový lokus: 1p22)

2.2. Kolorektální karcinom

2.2.1. Epidemiologie

Kolorektální karcinom patří mezi tři nejčastější nádory v celosvětovém měřítku. V civilizovaných zemích je incidence kolorektálního karcinomu vysoká, řadí se na druhé místo (hned za karcinom plic u mužů a karcinom prsu u žen). V zemích střední a jihovýchodní Evropy výskyt kolorektálního karcinomu dramaticky narůstá, v USA se naproti tomu příliš nemění a v Asii či v Africe vykazuje incidence tohoto onemocnění pokles [3].

Česká republika patří v tomto onemocnění jak v incidenci, tak v úmrtnosti k zemím s nejhoršími výsledky. Od roku 1960 došlo v České republice k enormnímu nárůstu incidence a kolorektální karcinom tvoří 12,1% všech nádorů u mužů a 13,7% všech nádorů u žen. Nárůst hrubé incidence za toto období byl o 341% u nádorů kolon a o 164% u nádorů rekta. Jeden z faktorů, který též výrazně ovlivňuje incidenci je věk. Incidence začíná exponenciálně narůstat zhruba od 50 let věku, kdy je incidence 0,39 nemocných na 1000 obyvatel/rok, v 80-ti pak dosahuje hodnoty 4,5 nemocných na 1000 obyvatel/rok. Maxima dosahuje po 70 letech věku, kdy tvoří 21,2% všech nádorů u žen, je v tomto věku dokonce na 1.místě před nádory prsu, a 20,2% všech nádorů u mužů, je na 2.místě za nádory plic (pokud nezahrnujeme novotvary kůže).

Podle geografické distribuce kolorektálního karcinomu patří Plzeň-město a Plzeň-jih k okresům s vůbec nejvyšší incidencí v ČR, což v tabulce 4 dokládá přehled počtu nárůstu nových onemocnění kolorektálním karcinomem na chirurgické klinice v Plzni v letech 1955 – 1999 [53]:

Tabulka 4: Počet nových onemocnění kolorektálním karcinomem na chirurgické klinice v Plzni v letech 1955 – 1999

Období	Ca colon	Ca rekta	Celkem
1955 – 1969	426	397	823
1970 – 1984	601	532	1133
1985 – 1999	896	1062	1958
Celkem	1923	1991	3914

V roce 2002 bylo dle údajů z Národního onkologického registru hlášeno celkem 8022 případů zhoubných novotvarů a novotvarů *in situ* kolorekta, což je 12,4% z celkového počtu zhoubných novotvarů. U mužů byl výskyt častější než u žen, 4710

případů nových onemocnění. U žen bylo hlášeno 3312 nových onemocnění. Počet zemřelých mužů na kolorektální karcinom byl v roce 2002 2460, počet zemřelých žen na kolorektální karcinom byl 1893. Úmrtnost mužů na kolorektální karcinom je celosvětově nejvyšší, u žen je úmrtnost vyšší pouze v Maďarsku [54].

Dalším alarmujícím faktem je počet onemocnění zachycených v pozdním, tedy III a IV stadiu. U mužů je to 45% kolorektálních nádorů a u žen 47%. Bližší údaje o procentuelním podílu jednotlivých stádií u mužů a žen jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Podíl jednotlivých stádií kolorektálního karcinomu u mužů a žen v ČR

Stadium	I	II	III	IV
Muži	33%	22%	16%	29%
Ženy	34%	19%	20%	27%
Stadium	I + II		III + IV	
Muži	55%		45%	
Ženy	53%		47%	

2.2.2. Formy kolorektálního karcinomu

Velkou většinu kolorektálních karcinomů (85-90 %) tvoří onemocnění formou tzv. karcinomu „sporadického“, který nepatří ani k jednomu z hereditárních syndromů. 10-15 % onemocnění kolorektálním karcinomem zaujímají hereditární syndromy, pro které je charakteristický, ve velké většině, autozomálně dominantní typ dědičnosti.

Avšak i u tzv. karcinomu „sporadického“ můžeme pozorovat rodinný výskyt. Proto tento typ kolorektálních karcinomů dále rozdělujeme na kolorektální karcinomy se sporadickým výskytem v pravém slova smyslu (65-75% všech kolorektálních karcinomů) a sporadickým kolorektální karcinom s rodinným výskytem (20-30% všech kolorektálních karcinomů), které však nepatří k žádnému typu hereditárních syndromů.

Hereditární formy kolorektálního karcinomu bývají obvykle klasifikovány podle dvou hlavních skupin: s mnohočetnými adenomatózními polypy- polypózní formy – např. Familiární adenomatózní polypóza (FAP) a bez mnohočetných adenomatózních polypů – nepolypózní – zahrnující Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom I, II).

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom)

Je to nejčastěji se vyskytující dědičná forma kolorektálního karcinomu, je autozomálně dominantně dědičné onemocnění. Riziko vzniku tohoto onemocnění je

způsobeno mutacemi v mismatch repair genech (MMR). Tyto geny se účastní oprav strukturních chyb molekuly DNA. Fenotypovým projevem nefunkčních MMR genů je hromadění somatických mutací v nádorové tkáni. Tento projev můžeme u nemocných s Lynchovým syndromem detekovat zjištěním změn v mikrosatelitních sekvencích DNA (tzn. nestabilitu mikrosatelitů /MSI/) pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). MSI můžeme tímto způsobem zjistit přibližně u 90% nemocných s Lynchovým syndromem. V rodinách s mnohočetným výskytem kolorektálního karcinomu se doporučuje DNA analýza zárodečných mutací MMR genů. Nejčastěji jsou zárodečné mutace nalezeny v hMLH1 a hMSH2 genech.

Amsterdamská kritéria pro výběr pacientů k vyšetření MMR genů [55]:

- *V rodině jsou alespoň tři příbuzní s histologicky verifikovaným kolorektálním karcinomem, jeden z nich je příbuzný prvního stupně ostatních dvou; je vyloučena familiární adenomatózní polypóza.*
- *Jsou postiženy alespoň dvě po sobě jdoucí generace.*
- *Alespoň u jednoho nemocného byl kolorektální karcinom diagnostikován do 50 let věku.*

Pokud je nalezena u nemocného nebo u jeho potomka mutace v některém z MMR genů, je možné cílené vyšetření dalších příbuzných, a tak u asymptomatických jedinců potvrdit nebo vyloučit nosičství káuzální mutace a riziko onemocnění Lynchovým syndromem.

Familiární adenomatózní polypóza (FAP)

Druhá nejčastěji se vyskytující dědičná forma kolorektálního karcinomu, je autozomálně dominantně dědičné onemocnění. U FAP se v tlustém střevě nachází více než 100, ale obvykle nepočitatelné množství různě velkých adenomů, jejichž velikost kolísá od mikroskopických rozměrů do několika centimetrů. Bez profylaktické kolektomie vzniká u těchto nemocných ve věku kolem 40-50 let jeden nebo více karcinomů tlustého střeva. Ve všech případech je možno prokázat vrozenou mutaci APC genu. Pokud jedinec zdědí zárodečnou mutaci jedné alely APC genu, má téměř 100% riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Somatické mutace druhé alely APC genu v buňkách střevní sliznice vede ke ztrátě funkce tohoto tumor-supresorového genu, tzv. ztrátě heterozygoty, a rozvoji procesu karcinogeneze.

Juvenilní polypóza

Juvenilní polypóza je charakteristická přítomností více než 5 juvenilních polypů v celém zažívacím traktu, žaludek – rektum a dále rodinným výskytem. Juvenilní polypóza dětského věku je velmi vzácná a prognosticky nepříznivá. K smrti dochází v časném věku.

Juvenilní polypy

Jedná se o nejčastější typ polypů u dětí a mladistvých, ale příležitostně vznikají i u dospělých. Obvykle jsou lokalizovány v rektu a projevují se krvácením. Nemocní se solitárními juvenilními polypy nejsou ohroženi vznikem kolorektálního karcinomu a nevyžadují další sledování.

Peutzův-Jeghersův syndrom

Je to dědičné autozomálně dominantní onemocnění pravděpodobně vázané na chromozom 19. Polypy se mohou vyskytovat v celém zažívacím traktu, ale nejčastěji postihují tenké střevo. Dysplastické změny jsou v Peutzových-Jeghersových polypech extrémně vzácné, ale přesto se doporučuje pravidelné sledování nemocných a odstraňování všech polypů větších než 1,5 cm.

Hyperplastické (metaplastické) polypy a polypóza

Jde o nejčastější polypy u dospělých. Jsou lokalizované na vrcholcích řas, jejich průměr nepřesahuje 5 mm. Často bývají mnohočetné a seskupené kolem karcinomu rekta. Vykazují podobné histochemické reakce jako adenomy a karcinomy tlustého střeva, ale jejich patogeneze a význam zůstávají nejasné [53].

2.2.3. Patogeneze kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom je nádor, jehož patogeneze je asi nejlépe pochopena, vzhledem ke známému genetickému modelu, který byl navržen již v r. 1990 Vogelstein a v upravené podobě publikován v r. 1996 [56]. V současnosti jsou známy dvě cesty maligní transformace buněk střevní sliznice.

První zahrnuje poruchy genů reparace DNA (mismatch-repair genes), mezi nejčastěji mutované patří geny označované hMLH1 a hMSH2. Defektní reparační systém vede k rychlé kumulaci mutací. Ty lze monitorovat jako kumulující se chyby v citlivých oblastech, kterými jsou mikrosatelity (opakující se identické sekvence DNA různé délky). Mikrosatelitová instabilita (MSI) je markerem poruchy genů zodpovědných za

výskyt replikačních chyb a mutací. Mikrosatelitovou instabilitu nalézáme především u hereditárně podmíněných forem nepolypózních kolorektálních adenokarcinomů a asi u 10-15 % případů sporadických karcinomů [56].

Druhá cesta či molekulární mechanismus kolorektální kancerogeneze je charakterizován celkovou instabilitou genomu. Ta zahrnuje postupné mutace více funkčně odlišných genů, která vedou především k nerovnováze mezi proliferací, diferenciací a zánikem buněk. Známa je sekvence poruch v protoonkogenu K-ras a supresorových genech APC (adenomatous polyposis coli), DCC (deleted in colorectal carcinoma) a p53. Důsledkem deregulace nebo mutace klíčových genů kontrolujících buněčný cyklus a zánik buněk apoptózou je nakonec růstová dysbalance, která vede k nádorovému růstu [58].

Vývoj kolorektálního karcinomu probíhá v těchto fázích [3]:

-normální epitel

-„field defekt“ – představuje iniciální prekancerózní změnu sliznice tlustého střeva charakterizovanou profilací a odchýlnou diferenciací epitelu krypt. Běžným histologickým vyšetřením jej nelze od normální sliznice odlišit, lze jej však odlišit vyšetřením imunohistochemickým.

-ložiska aberantních krypt – odpovídají skupinám strukturálně a cytologicky odlišných krypt. Počet krypt značně kolísá. Epitel krypt může být normální, hyperplastický nebo dysplastický a rozlišují se podle toho 3 typy ložisek aberantních krypt – typický, hyperplastický a mikroadenomy.

-adenom s nízkým rizikem maligního zvratu

-adenom s vysokým rizikem maligního zvratu

-maligní zvrát adnomu (adenokarcinom v adenomu)

-adenokarcinom

-metastazující adenokarcinom

Nejčastější predisponující změny jsou:

- Adenomatózní polypy jakékoliv etiologie: k malignímu zvratu dochází ve 30 – 50 % případů a jeho riziko závisí na velikosti a histologickém typu polypů. Nejvyšší je u vilózních, nejnižší u tubulárních.

- Ulcerózní kolitida: maligní zvrát je častý a pravděpodobnost stoupá s délkou trvání onemocnění – po 20 letech 5%, po 25 letech 12%. Při pankolitidě je pravděpodobnost vzniku malignity až 35%.

- Crohnova choroba: maligní zvrát je méně častý než u ulcerózní kolitidy a bývá většinou v postižených úsecích střeva. Může se vyskytnout též tumor metachronní, či v jizvě po předcházející operaci.

- Předcházející karcinom: znamená zvýšené riziko vzniku nové malignity. Rizikové pro tumor sigmatu je též předchozí ozáření malé pánve pro nádorové onemocnění [3].

2.2.4. Klasifikace nádorů kolonu a rekta – grading, staging

Anatomické dělení

Dle kritérií Union Internationale Contre le Cancer (UICC) je anatomické dělení následující:

<i>Kolon:</i>		<i>Rektum:</i>	
apendix	(C18.1)	rektosigmoideum	(C19)
cékum	(C18.0)	rektum	(C20)
vzestupný tračník	(C18.2)	řit' a řitní kanál	(C21)
hepatická flexura	(C18.3)	řitní kanál	(C21.1)
příčný tračník	(C18.4)	kloakogenní zóna	(C21.2)
lienární flexura	(C18.5)	léze přesahující rektum,	
sestupný tračník	(C18.6)	řit' a řitní kanál	(C21.8)
sigmoideum	(C18.7)		

Staging

Pro určování klinického stadia bylo vypracováno mnoho systémů. Základem většiny těchto klasifikačních systémů tvoří stupeň penetrace nádoru střevní stěnou, stupeň postižení regionálních uzlin a přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastáz. Nejstarším a jedním z nejpoužívanějších je Dukesova klasifikace, ta ve své novější verzi dělí pacienty do stadií A-D. Dalším nejpoužívanějším systémem je TNM klasifikace, která používá dělení do stadií I-IV, přičemž pokud tyto dvě klasifikace porovnáme, pak jednotlivá stadia Dukesovy klasifikace odpovídají stádiím v TNM klasifikaci. Dle doporučení České gastroenterologické společnosti je v České republice oficiálně uznána TNM klasifikace.

Dukesova klasifikace:

A: tumor neprorůstá muscularis propria

B: tumor prorůstá muscularis propria

C: postižení regionálních uzlin

D: vzdálené metastázy

TNM klasifikace:

(TNM= klinická, pTNM= patologická)

I tato klasifikace je založena na posouzení rozsahu primárního tumoru (T), postižení lymfatických uzlin (N) a přítomnosti vzdálených metastáz (M).

Stadium 0: Tis, N0, M0

Stadium I: T1 nebo T2, N0, M0

Stadium II: T3 nebo T4, N0, M0

Stadium III: jakékoliv T, N1-3, M0

Stadium IV: jakékoliv T nebo N, M1

Primární tumor (T):

T0: primární tumor nenalezen

Tis: karcinoma in situ neprorůstá mukózu

T1: tumor proniká submukózu

T2: tumor proniká muscularis propria

T3: tumor proniká skrze muscularis propria do subserózy nebo do neperitonealizované perikolické či perirektální tkáně

T4: tumor proniká viscerálním peritoneem nebo přímo do okolních orgánů a struktur

TX: primární tumor nemůže být detekován

Postižení regionálních lymfatických uzlin (N):

N0: bez metastáz v regionálních uzlinách

N1: 1-3 metastázy v perikolických nebo perirektálních lymfatických uzlinách

N2: metastázy ve 4 nebo více perikolických a perirektálních lymfatických uzlinách

N3: metastázy v uzlinách podél cévních struktur

NX: regionální lymfatické uzliny nemohou být posouzeny

Vzdálené metastázy:

M0: vzdálené metastázy nejsou přítomny

M1: vzdálené metastázy jsou přítomny

MX: přítomnost vzdálených metastáz nemůže být posouzena

Histopatologický grading:

Jde o vyjádření stupně diferenciaci nádorových buněk.

G1: dobře diferencované tumory

G2: středně diferencované tumory

G3: málo diferencované tumory

G4: nediferencované tumory

GX: grading nemůže být stanoven

Reziduální nádor:

R0: žádný reziduální nádor

R1: mikroskopický reziduální nádor

R2: makroskopický reziduální nádor

Histopatologická klasifikace karcinomů:

Histologicky se z 95% jedná o adenokarcinom s různou intenzitou produkce hlenu.

Dle mikroskopického obrazu se dělí na následující histologické typy:

- 1) tubulární adenokarcinom
- 2) mucinózní karcinom
- 3) karcinom z prstenčitých buněk
- 4) adenoskvamózní karcinom
- 5) medulární karcinom
- 6) nediferencovaný (anaplastický) karcinom

[53, 59, 60]

2.2.5. Nádorové markery kolorektálního karcinomu

Nádorové markery jsou molekuly přítomné v nádoru nebo produkované nádorem nebo hostitelem jako odpověď na přítomnost nádoru. Tyto molekuly se u zdravého jedince buď vůbec nevyskytují anebo se vyskytují v podstatně nižší koncentraci, než je tomu v případě přítomnosti nádoru [61]. Většinou se předpokládá korelace mezi koncentrací markeru a aktivní hmotou nádoru, a proto jsou nádorové markery užitečným nástrojem v péči o nemocné s nádorovým onemocněním. Markery, dostupné pro většinu případů nádorů, jsou pomocné a hodnotné nástroje pro hodnocení prognózy pacientů, depistáž a monitorování léčby, zatímco pro screening jen výjimečně. Při měření koncentrací markerů je nutné kromě absolutních hodnot a hodnot cut-off zohledňovat také relativní trendy [62].

Nádorové markery jsou molekuly převážně proteinového charakteru, jejichž výskyt ve tkáni zhoubného nádoru (celulární nádorové markery) a v tělních tekutinách (humorální nádorové markery, cirkulující markery) souvisí s růstem nádoru v organismu. Jsou produkovány buď samotným nádorem (antigeny asociované s nádorem), nebo jinými tkáněmi jako odpověď na maligní proces v organismu (indukované nádorové markery, např. proteiny akutní fáze).

Podle biologického charakteru a původu lze rozdělit cirkulující markery na:

- Monoklonální imunoglobuliny či jejich fragmenty - Bence-Jonesova bílkovina.
- Prekurzory normálních antigenů, například látek tvořících krevní skupiny (CA 19-9, CA 50, CA 195, CA 242).
- Hormony (humánní beta choriogonadotropin (beta hCG), parathormon (PTH), kalcitonin).
- Enzymy (prostatická kyselá fosfatáza-PAP, prostatický specifický antigen-PSA, neuronspecifická enoláza -NSE).
- Onkofetální antigeny (alfa fetoprotein AFP) karcinoembryonální antigen CEA).
- Hybridomové muciny (CA 15-3, MCA, CA 549, CA 125, CA 72-4).
- Cytokeratinové (CYFRA 21-1, TPS, TPA).

Pro svoji vysokou senzitivitu u kolorektálního karcinomu (71%) je jedním z nejčastěji používaných markerů Karcinoembryonální antigen.

Karcinoembryonální antigen (CEA), neboli CEACAM 5 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5)

CEA, popsáný r. 1965 [63], patří k nejdéle stanovovaným nádorovým markerům. Je to onkofetální protein s pravděpodobnou rolí v procesu buněčné adheze. Za fyziologických podmínek je CEA produkce pozorována ve vyvíjejícím se embryu, kde je syntetizovaný v epiteliálních buňkách, a to především na jejich membránách. Ve fetálním séru je prokazatelný od 8 týdne těhotenství. V dospělém věku je syntetizován v minimálním množství epiteliálními buňkami střešní sliznice, žaludku a bronchů. Z benigních onemocnění je zvýšená koncentrace CEA v séru (a produkce příslušnou tkání) detekována především u nemocných s jaterní cirhózou, s hepatitidou, zánětlivým onemocněním pankreatu, s Crohnovou chorobou, ulcerózní kolitidou. Rovněž některá benigní onemocnění mléčné žlázy mohou syntetizovat tento antigen (fibroadenomy, fibrocystická choroba). CEA se nachází především ve tkáni nádorů karcinomů tlustého

střeva a konečníku. Z dalších nádorů GIT je CEA produkován nádory žaludku, pankreatu, jícnu a žlučových cest.

Lidská CEA genová rodina sestává z 29 genů umístěných na chromosomu 19 [64], z nichž 18 je aktivně transkribováno [65]. Molekulová hmotnost je 180-200 kDa. Na polypeptidový řetězec, který je tvořen sedmi Ig doménami zakotvenými na povrchu buňky fosfatidylinositolovou vazbou, jsou navázány sacharidové řetězce [66, 67].

Antigen CA 19-9

CA 19-9 patří k tumor-asociovaným antigenům definovaným na podkladě monoklonálních protilátek, patří také k onkofetálním antigenům.

Specifická protilátka odpovídá modifikované determinantě krevních skupin typu Lewis. Jeho výskyt je charakteristický pro adenokarcinomy pankreatu, žaludku, tlustého střeva, jater a vybraných gynekologických nádorů. Stanovuje se často v kombinaci s CEA. Molekula CA 19-9 se vyskytuje jako glykolipid ve tkáni nebo mucin v séru, molekulová hmotnost je asi 36 kDa (lipid), event. výrazně vyšší (mucin). Úloha CA 19-9 je dosud neznámá. Vzhledem k asociaci mezi nespecifickým zvýšením některých adhezních molekul a CA 19-9 v séru není vyloučena jeho možná vazba jako ligand např. na E-selektin [68]. *In vitro* byla rovněž prokázána vazba CA 19-9-epitopu na cytokeratin 8. Přítomnost takto vázaného cytokeratinu koreluje se zvýšenou invazí vitou *in vitro* i *in vivo* [69].

Imunohistochemické vyšetření prokázalo přítomnost tohoto antigenu především v maligních onemocněních středně a dobře diferencovaných karcinomů pankreatu, kde je lokalizovaný apikálně na epiteliích vystylajících žlázové vývody, i v hlenu uvnitř žlázových vývodů. Dále je produkován dalšími nádory GIT, z gynekologických nádorů především u mucinózních ovariálních tumorů. U kolorektálního karcinomu má senzitivitu 18-58%. Jeho poločas v cirkulaci je asi 5 dní.

Antigen CA 72-4 má diagnostickou senzitivitu u kolorektálního karcinomu 20-41%.

Stanovení CA 72-4 je založeno na detekci antigenu TAG 72 glykoproteinového typu determinovaného monoklonálními protilátkami. Antigen TAG 72 (tumor-asociovaný glykoprotein TAG 72) je definovaný na podkladě monoklonálních protilátek [70, 71]. Je to mucinový komplex o molekulové hmotnosti větší než 10^6 Da. Za fyziologického stavu jej především produkuje vyvíjející se plod, a to v povrchových epitelech žaludku,

jícnu a pankreatu. Stopové množství CA 72-4 bylo prokázáno rovněž u dospělých v tkáních plic, v gastrointestinálních a reprodukčních orgánech. Vysoký obsah CA 72-4 v dospělosti vykazují především maligní nádory žaludku, střeva, pankreatu, mléčné žlázy a některých nádorů ovaria (mucinózní typy). Biologický poločas dosud nebyl určen.

Tkáňový polypeptidický antigen (TPA) a tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS)

Tkáňový polypeptidický antigen (TPA) byl prokázán Bjorklundem jako antigen epiteliálních buněk karcinomů. Je to polypeptid, jehož struktura odpovídá směsi fragmentů cytokeratinů [72]. Byl prokázán ve většině karcinomů, klidová zdravá tkáň jej neobsahuje. Jeho výskyt je však spojen s rychle se množícími epiteliálními buňkami plodu. Přítomnost TPA v séru u nemocných s výraznou proliferací maligního nádoru vedla zpočátku k představě jeho přímé vazby s procesem proliferace. Dalšími experimenty bylo prokázáno, že jeho výskyt v séru je vázán na rozdíl od diferenciačních antigenů spíše buněčnou aktivitou než s objemem nádorové hmoty. Tato aktivita může reflektovat nejen proces dělení buněk, ale i apoptózu, ev. degradaci tkáně a nekrózu.

Antigen s velice podobnou charakteristikou, definovaný na podkladě další monoklonální protilátky, byl nazván TPS (tkáňový polypeptidický specifický antigen). Dalšími experimenty byly definovány typy cytokeratinů, jejichž fragmenty se uvolňují do séra.

Antigen TPA, determinovaný původní polyklonální protilátkou, je polypeptid, který odpovídá solubilním fragmentům cytokeratinů. Molekulová hmotnost těchto fragmentů je asi 40 kDa. Protilátky proti TPA reagují proti cytokeratinům 8, 18 a 19. Imunohistochemická nebo kvantitativní analýza tkáňového TPA (TPS) dosud nevedla k jednoznačným závěrům o jeho úloze, což odpovídá zřejmě složitému procesu fragmentace této cytoskeletární složky a její roli při buněčném dělení.

Fyziologicky je TPA (TPS) produkce pozorována v trofoblastu placenty. Lze jej prokázat i v intenzivně se dělících epiteliích různých orgánů vyvíjejícího se plodu. Je nalézán v malých koncentracích i ve tkáni močového měchýře, mléčné žlázy, plic a trávicího traktu zdravých dospělých. Je přítomen ve tkáni maligních nádorů. Poločas TPA je asi 7 dní.

Thymidinkinasa (TK)

Thymidinkinasa (TK), neboli plným názvem ATP:thymidin-5'-fosfotransferasa (EC 2.7.1.21), je přesně definovaný enzym, patří k enzymům syntézy DNA, které jsou charakteristické pro proliferující tkáň. V G1/S fázi buněčného cykluje zvýšena aktivita fetálního cytoplasmatického izoenzymu TK.

TK katalýza spočívá v přeměně thymidinu na thymidin-5'-fosfát v přítomnosti ATP. Thymidin-5' fosfát je pak pomocí ATP dále fosforylován až na thymidin-5'-trifosfát, který je použit pro syntézu DNA. Tato reakce doplňuje přímou cestu "de novo" syntézy deoxynukleotidů, kdy vzniká thymidin-5'-fosfát methylační reakcí za účasti methylen-tetrahydrofolátu z deoxyuridin-5'-fosfátu. TK používá jako substrát exogenní thymidin z potravy nebo endogenní thymidin uvolněný jako degradační produkt. TK patří tedy mezi enzymy záchranné (náhradní) cesty syntézy deoxynukleotidů a DNA (podobně jako hypoxanthin-guanin-fosforibosyltransferasa nebo adenin-fosforibosyltransferasa). Jde tedy o intracelulární enzym „zvláštního určení“, za fyziologických podmínek probíhá jeho syntéza především v játrech během vývoje plodu, po porodu se syntéza zpomaluje [73].

Patologicky se nachází v rychle proliferujících tkáních a z těchto tkání se dostává do cirkulace. Intenzivní produkce je pozorována především u onemocnění s generalizovanou zvýšenou proliferací a u hematologických malignit [74, 75]. Zvýšená produkce TK je typická rovněž pro některá virová, zánětlivá a revmatická onemocnění. Biologický poločas je asi dva dny.

2.3. Měření genové exprese

Biologické pochody včetně základní buněčných dějů jsou realizovány zejména faktory proteinové povahy. V buňce můžeme tyto faktory studovat na třech úrovních: Na úrovni genu (tedy genomové DNA), na úrovni genového transkriptu (RNA) a na úrovni vlastního proteinu.

2.3.1. Studium proteomu

Protože konečná funkce každé buňky, tkáně i celého organismu souvisí s přítomností souboru funkčních proteinů (reakce probíhající díky enzymům, regulace dějů, atd.), směřuje výzkum této úrovně genové exprese k průkazu funkčního proteinu. Vědní obor, který řeší tuto problematiku, se nazývá *proteomika*. Název je odvozen od slova *proteom*, což je analogie výrazu genom. Termín „proteom“ byl zaveden v roce 1994

Marcem R. Wilkinsem pro označení veškerého proteinového produktu kódovaného genomem. Mezinárodní organizace HUPO (Human Proteom Organisation) formulovala cíle proteomiky jako identifikaci všech proteinů kódovaných lidským genomem s následným stanovením a) jejich exprese v různých buňkách daného organismu, b) jejich subcelulární lokalizace v různých organelách, c) jejich posttranslačních modifikací, d) jejich vzájemných interakcí a e) vztahu mezi strukturou a funkcí (poslední oblastí se zabývá oblast strukturní genomiky) [76].

2.3.2. Studium genomu

Souběžně s proteomikou existuje obor *genomika*, který studuje genomy různých organismů, to znamená veškerou dědičnou informaci daného organismu. Genomika je obor, jehož cílem je stanovit úplnou dědičnou informaci organismů a interpretovat ji v termínech životních pochodů. První kompletní genom (DNA bakteriofága (pX174) byl analyzován v Sangerově laboratoři v Cambridge v roce 1977 [77], poté následovaly mnohé další genomy, až v roce 2001 byla ohlášena předběžná sekvence lidského genomu, realizovaná v projektu HUGO (Human Genom Organisation) [78]. Spojení genetické informace s onkologickou problematikou se zabývá projekt nazvaný „The Cancer Genom Projed“ [79]. Pouze 3% genomové DNA eukaryot nese informace pro strukturu proteinů. Ostatní DNA představuje jednak regulační sekvence, ale u většiny DNA neznáme funkční význam. Obvyklá struktura konkrétního genu je taková, že kódující DNA (tzv. exony) je rozložena v nadbytku nekódujících sekvencí (intronů), přičemž při genové expresi dochází k přepisu genu do podoby RNA v plném rozsahu a teprve potom dojde k sestřihu RNA transkriptu do podoby definitivní mRNA tím, že introny jsou odstraněny a exony spojeny. Pro rozlišení a lokalizaci genu a jeho všech součástí je zpravidla třeba nejprve najít příslušnou mRNA (v podobě cDNA kopie), určit její sekvenci a porovnat alespoň s částí skutečné aminokyselinové sekvence proteinu. Pak je možné přistoupit k hledání této sekvence v genomové DNA, kde se obvykle najde rozložena na části, tj. na exony. Pak následuje analýza regulačních sekvencí (promotéru, enhancerů, terminátorů, poly-A signálů, aj.).

Znalost genomu již dnes umožňuje studium mutací a variací (SNP), zodpovědných za nejrozličnější onemocnění.

2.3.3. Studium transkriptomu

Pro propojení studia genomu a proteomu je nezbytné získat informace o souboru všech molekul RNA, jejichž celkový výčet pro daný organismus nese název

transkriptom. Analýzou transkriptomu rozumíme analýzu souboru všech RNA vzniklých transkripcí DNA v dané tkáni a v daném čase. Transkriptom představuje aktivní část genomu, která charakterizuje chování buňky v daný moment. Právě znalost genomu umožňuje poměrně snadnou orientaci v tom, které geny jsou momentálně exprimovány. Vedle toho je důležitá i kvantitativní stránka genové exprese RNA, která představuje informaci o intenzitě genové exprese, tedy částečně informaci o množství produkovaného proteinu (na jeho množství mají dále zásadní vliv posttranslační úpravy).

Základními přístupy při studiu transkriptomu, tedy různých mRNA jsou izolace celkové RNA, izolace mRNA a reversní transkripce, tj. enzymový přepis RNA do podoby cDNA (kopírované DNA), což znamená stabilizaci této struktury, protože RNA je velmi citlivá k všudypřítomným ribonukleasám a nelze ji dlouhodobě uchovávat. cDNA lze navíc ligovat do nejrůznějších vektorů a klonovat. Rovněž tak lze cDNA amplifikovat metodou polymerasové řetězové reakce (PCR - polymerase chain reaction), což je nejpoužívanější technika pro detekci specifických sekvencí.

2.3.4. Kvantitativní analýza transkripce

Řada buněčných pochodů (řídících přežívání, růst, diferenciaci) probíhá na základě kompetice různých faktorů, která je dána nejen jejich kvalitativní přítomností ale i kvantitativní. Výsledkem jsou pak další buněčná rozhodnutí projevující se změnami genové exprese, a to opět jak po stránce kvalitativní, tak po stránce kvantitativní. Proto jak pro objasňování buněčných dějů základním výzkumem, tak pro účely praktické medicíny (při monitorování lékové resistance [80] stanovení stadia choroby (tumoru) molekulárními markery [81] při detekci virových [82] patogenů vznikla potřeba kvantifikovat hladiny RNA.

Jedna z prvních metod kvantitativního stanovení RNA se používala metoda „northern blotting“ přenesení a následné ukotvení RNA na membránu, která byla využívána též jako metoda semikvantitativní, dále byly k dispozici různé formy „RNase protection assay“ a metoda zvaná „primer extension“ [83].

Do doby zavedení PCR v reálném čase byla kompetitivní PCR, nazývaná též PCR s exogenním standardem, považována za jednu z nejlepších variant kvantitativní PCR. Pro kvantifikaci genů se provádí v kombinaci s reversní transkripcí [84]. Spočívá v sérii PCR reakcí, v nichž dva templáty soutěží o stejné primery. Jeden templát je o neznámé koncentraci (stanovovaný), druhý je standard (kompetitor), jehož koncentrace se v sérii zkumavek mění. Standard se od stanovovaného ampikonu liší

délkou, avšak ne diametrálně. V sérii ředění různých koncentrací standardu v PCR reakcích se pak hledal standard o stejné intenzitě produktu na elektroforetickém gelu, jako stanovovaný templát. Tuto koncentraci standardu nazýváme bodem ekvivalence. Za předpokladu stejné účinnosti PCR pro cDNA vzorku i standardu můžeme usuzovat na koncentraci templátu ve vzorku, která by měla být v bodě ekvivalence identická s koncentrací standardu [84].

Zřejmě nejlepší metodou kvantitativní PCR je polymerásová řetězová reakce v reálném čase (real-time PCR, Q-PCR). Koncem devadesátých let se na trhu objevil přístroj Light Cycler firmy Roche umožňující monitorování DNA syntézy v průběhu reakce. Následně s podobnými přístroji přišla řada dalších firem (Rotorgene 2000 firmy Corbett Research, ABI Prism 7700 firmy Perkin Elmer, iCycler firmy BioRad). Tyto přístroje umožňují měření množství nasyntetizované DNA po každém PCR cyklu. Díky tomu monitorování reakce lze zjistit, v kterém momentu se rozbíhá exponenciální nárůst tvořené DNA, a protože bylo prokázáno, že počet cyklů nutných k náběhu exponenciální fáze je funkcí počtu DNA templátů na počátku celého děje, lze počáteční koncentraci snadno vypočítat. Vývoj těchto revolučních metod byl spíše firemní nežli akademický, takže je obtížné citovat původní autory, nicméně tato problematika je shrnuta v přehledných publikacích [85, 86].

Tyto přístroje umožňují různé přístupy v měření amplifikované DNA, avšak všechny jsou založené na fluorescenčních metodách. Základní a nejjednodušší technika používá fluorescenční barvivo SYBR-green [87], které má nízkou fluorescenci, pokud je volně v roztoku, avšak vykazuje vysokou fluorescenci po interkalaci do dvouvláknové DNA. Na konci každého polymeračního kroku PCR reakce (72°C), tak lze měřit celkové množství DNA ve vzorku. Nevýhodou je označení i nescifických produktů PCR, která lze však odlišit následnou denaturační analýzou. Tento problém řeší použití „TaqMan“ sond, které jsou specifičtější, ale nákladnější [88]. Vedle standardní dvojice primerů se použije další oligodeoxynukleotid („TaqMan“ sonda), která nese jednak fluorescenční značku a zároveň skupinu pohlcující fluorescenci (zhášec „quencher“). Tato sonda po hybridizaci na templát stojí v cestě probíhající syntéze DNA a je proto polymerasou hydrolyzována (polymerasa musí mít 5'→3' exonukleasovou aktivitu). Po degradaci sondy se obě funkční skupiny od sebe vzdálí, což se projeví vzestupem fluorescence. Další podobnou metodou jsou FRET (Fluorescent energy transfer) sondy. Jsou tvořeny dvěma oligonukleotidy, které jsou od sebe vzdáleny 2-3 nukleotidy.

Jedním s fluorescenční značkou, která emituje určitou vlnovou délku a druhým s fluorescenční značkou, který tuto emitovanou vlnovou délku transformuje na jinou, detekovanou přístrojem. Čím více je ve vzorku přítomno specifických temlátů, tím více sond je s nimi hybridizováno a tím je silnější signál detekován přístrojem.

Existuje ještě řada dalších technik, které pracují na podobných principech fluorescence a jejího zhasení („molecular beacons“, „Scorpions sondy“ aj.). Tyto metody jsou využívány ve výzkumu, v medicíně humánní i veterinární (hlavně detekce patogenů), v zemědělství a potravinářství (detekce patogenů a genově manipulovaných organismů a jejich kvantifikace).

Metodou určenou ke kvantifikaci genové exprese velkého množství genů je metoda DNA - čipů (DNA-microarrays). Izolovaná RNA se reversně transkribuje na cDNA, zároveň se cDNA označí fluorescenční značkou. Značená cDNA se pak hybridizuje s DNA-čipem, což je membrána nebo sklo se zakotvenými specifickými oligodeoxynukleotidy, a to v počtu až mnoha tisíc na jednom čipu. Následuje přístrojové vyhodnocení množství fluorescence v jednotlivých sektorech, což odpovídá expresi příslušných genů. Širšímu použití zatím brání vysoká cena vyhodnocovacího zařízení, i cena čipů jako takových. Metoda je převratná množstvím analyzovaných genů, zatím však nepřinesla jednoznačné výsledky. V současnosti se v onkologickém výzkumu spíše používá pro „hrubé“ určené exprese a selekci potenciálně významných genů, které se pak kvantifikují metodami real-time PCR.

2.3.5. Principy polymerasové řetězové reakce (PCR) a dalších metod genového inženýrství

PCR je velice citlivá metoda, která dokáže amplifikovat a prokázat příslušnou DNA sekvenci i z velmi malého množství původních molekul (teoreticky jen z několik původních DNA molekul). Sledování exprese genů na úrovni mRNA se nejčastěji provádí metodami založenými právě na *polymerázové řetězové reakci (PCR)*. Princip spočívá ve vizualizaci signálu specifických oligonukleotidů, jejichž sekvence specificky odpovídá sekvenci sledovaného genu. Tímto způsobem lze sledovat, zdali je sledovaný gen aktivní či ne, nebo v případě kvantitativní PCR, jaká je jeho aktivita vůči jinému genu (relativně) nebo jaký počet kopií genu se nachází ve vzorku (absolutně). Metodami založenými na PCR se také sledují změny v kvalitě DNA, tzn. jedno či více bodové mutace, delece, inserce.

PCR je metoda *in vitro* amplifikace specifických úseků molekul DNA. Princip vychází z pochodů vlastní molekule DNA a probíhající při její replikaci, uzpůsobených podmínkám *in vitro*. Dochází k amplifikaci úseku molekuly DNA ohraničené dvěma primery, která probíhá ve třech krocích: denaturace DNA (dochází k rozestupu vláken dvoušroubovicové molekuly DNA), hybridizace primerů (primery, syntetické oligonukleotidy, se připojují ke komplementární sekvenci jednoho z řetězců templátové DNA) syntéza nových vláken (termostabilní DNA polymeráza prodlužuje primery a syntetizuje tak dle templátu nové vlákno). Tyto kroky se cyklicky opakují 20-40x. Výsledkem PCR je vytvoření dostatečného množství kopií sledované sekvence DNA pro analýzu nebo další zpracování. Analýza produktů PCR se nejčastěji provádí elektroforeticky v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Porovnáním sledovaných fragmentů DNA se standardou lze určit délku fragmentů, a tím ověřit jeho správnost.

Základní PCR (výše popsanou) lze indentifikovat také výskyt krátkých delecí a inzercí. *Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)*: fragment PCR, u kterého hledáme sledovanou mutaci nebo polymorfismus, tvoří základ pro štěpení restrikční endonukleázou (enzymem štěpicím dvouvláknovou DNA ve specifickém místě). Změna sekvence v místě štěpení restrikční endonukleázou zabraňuje enzymu DNA rozštěpit. Analýzou produktů štěpení určíme přítomnost mutace.

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) umožňuje hledání malých změn v sekvenci DNA (např. bodových mutací). PCR fragment sledovaného genu je denaturován. Pokud jednovláknová DNA sledovaného genu obsahuje mutaci, zaujme jinou konformaci (prostorové uspořádání) než jednovláknová DNA referenčního fragmentu. Tato odlišná konformace se projeví odlišnou pohyblivostí při elektroforéze v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu.

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) je další metoda umožňující hledání malých změn v sekvenci DNA. PCR fragment sledovaného genu je denaturován a reasociován s referenčním DNA fragmentem. Pokud sledovaný gen obsahuje mutaci, heteroduplexy (fragменты vzniklé reasociací sledovaného genu a referenční DNA) obsahují nespárovaný úsek (mutace), který se detekuje elektroforeticky v polyakrylamidovém gelu s gradientem denaturační látky. Ověření specifity produktu PCR, restrikčního fragmentu nebo určení přítomnosti konkrétní sekvence DNA umožňuje *Southern blotting* s následnou *hybridizací se značenými sondami*. Fragменты DNA jsou nejprve elektroforeticky rozděleny v agarózovém gelu a přeneseny na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu. Takto imobilizované fragменты DNA se hybridizují značenými sondami o známé sekvenci. Pokud je na membráně přítomna

sekvence komplementární k sekvenci DNA sondy značené např. radioaktivně, váže se sonda na tuto sekvenci. Autoradiografickou detekcí získáme záznam v místě navázání sondy.

Sekvenování umožňuje určení primární struktury (pořadí deoxynukleotidů) molekuly DNA. Nejčastěji se provádí *Sangerovou enzymatickou (dideoxynukleotidovou) metodou*. Sekvenují se fragmenty do 500 párů bazí, delší fragmenty se sekvenují postupně po kratších úsecích.

Základem metody je PCR reakce probíhající ve 4 oddělených směsích. Každá obsahuje navíc jeden typ modifikovaného deoxynukleotidu, který ukončí syntézu nového vlákna v místě jednoho typu deoxynukleotidu. Po elektroforetické analýze v polyakrylamidovém gelu a autoradiografii získáváme obraz čtyř pruhů, z nichž každý tvoří fragmenty zakončené jedním ze čtyř modifikovaných deoxynukleotidů. Odečtením fragmentů lišících se o jeden deoxynukleotid nám typ modifikovaného deoxynukleotidu říká primární strukturu sekvenovaného fragmentu. Modernější metody používají modifikované deoxynukleotidy značené odlišnými fluorescenčními barvami. Výsledná sekvence DNA fragmentu je odečtena v jedné dráze gelu na automatickém sekvenačním přístroji a pomocí počítače je následně zpracována.

Reverzní transkripce spojená s PCR (RT-PCR) je technika umožňující stanovit buněčnou expresi konkrétního genu. Molekula mRNA (produkt genu) se přepíše reverzní transkriptázou na molekulu cDNA (komplementární DNA), která se amplifikuje PCR a analyzuje výše zmiňovanými technikami. Informaci o míře exprese specifické mRNA přináší kvantitativní RT-PCR, jejímž účelem je určit nebo přibližně stanovit množství výchozího templátu ve vzorku, to znamená množství specifické mRNA.

Metoda využívající automatizace a moderních technologií je *metoda microarrays* nazývaná též *DNA čipy*. DNA čipy umožňují genotypizaci vzorků DNA nebo sledování genové exprese. Jedná se o destičky s nylonovým nebo skleněným povrchem, na kterých jsou v definovaných sektorech strojově imobilizovány sekvence DNA. Těchto sektorů mohou být na jedné destičce tisíce. Vzorky značené DNA hybridizují s imobilizovanými sekvencemi DNA a v případě komplementarity poskytují pozitivní signál.

Většině aplikací PCR předchází izolace DNA, případně RNA (RT-PCR). Základní principy izolace DNA a RNA jsou stejné. Spočívají v dezintegraci buněk homogenizací v hypertonickém roztoku a tenzidu. Degradace bílkovin je provedena přidáním proteolytického enzymu. Denaturované bílkoviny se od extrahovaných nukleových

kyselin oddělí fenol-chloroformovou extrakcí. Oddělení vodné a organické fáze se provede centrifugací. Z vodné fáze se nukleové kyseliny vysráží ethanolem s příměsí octanu sodného. Vysrážené nukleové kyseliny se zcentrifugují, osuší a rozpustí v roztoku Tris-EDTA nebo v destilované vodě. RNA je nutné chránit před účinkem ribonukleáz, které ji degradují a izolovat a skladovat při nízké teplotě. Nejnovější metody rychlé izolace nukleových kyselin jsou založeny na adsorbci DNA nebo RNA na silikátové vrstvě umístěné v kolonkách [53].

2.3.6. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie umožňuje analýzu buněčné suspence podle počtu, velikosti, granularity a antigeních buněčných znaků, detekovaných pomocí specifických monoklonálních nebo polyklonálních protilátek. Konkrétní buněčný znak je označen specifickou fluorescenčně značenou protilátkou, která po excitaci elektromagnetickým zářením laseru fluoreskuje, což je zaznamenáno cytometrem jako přítomnost sledovaného znaku. Průtokový cytometr se skládá z optické soustavy, soustavy čerpadel a analyzátoru výsledků (počítače). Buněčná suspence je ze zkumavky stlačeným vzduchem vtlačována do skleněné trysky, kterou prochází elektromagnetické záření laseru o příslušné vlnové délce. Analýza buněk probíhá při vysoké rychlosti (kolem tisíce buněk za sekundu). Pro značení povrchových antigenů se používají jak přímo značené primární protilátky, tak neznačené protilátky, které jsou detekovány fluorescenčně značenými sekundárními protilátkami [89].

2.3.7. Imunoanalytické metody

ELISA, RIA a IRMA patří k metodám, jejichž podstatou je vzájemná reakce specifické vazebné látky (binder) s látkou, které koncentraci určíme (ligand). Podle typu vazebné látky se rozlišují tři hlavní skupiny metod využívající vazbu ligandu:

- a) Metody receptorové analýzy, ve kterých jsou specifickou vazebnou látkou tkáňové hormony. Například estrogenové a progesteronové receptory v tkáni karcinomu mléčné žlázy.
- b) Metody kompetitivní vazby na sérový protein.
- c) Imunoanalytické metody, ve kterých jsou vazebnou látkou specifické protilátky.

Ve většině metod využívajících vazby ligandu, neprobíhá jednoduchá reakce vazebné látky s ligandem, ale kompetitivní reakce mezi neznačeným ligandem (jehož

koncentraci stanovujeme) a indikátorem označeným ligandem (o známé koncentraci) na obsazení omezeného počtu vazebných míst na vazebné látce (např. protilátka). Tyto metody se proto nazývají *kompetitivními metodami využívající vazbu ligandu*. Pokud při vlastním určení musí být všechna vazebná místa obsazena ligandem, shrnují se také pod společný název *saturační metody*. Použití ligandu značeného indikátorem potom umožňuje určit množství stanovovaného ligandu. Dříve se nejčastěji pro značení ligandu používají rádionuklidové indikátory a potom mluvíme o radioimunoanalýze /RIA/. Pokud se na označení ligandu použije enzym, hovoříme o enzymoimunoanalýze /EIA/. Při fluoroimunoanalýze /FIA/, se ligand označuje intenzivně fluoreskujícími látkami /např. fluoresceinem/, při luminiscenční imunoanalýze /LIA/ luminiscenčními látkami /např. deriváty luminolu/. Důležitými imunologickými metodami jsou ty, ve kterých se indikátorem neznačí ligand, ale protilátka. Při označení protilátky radionuklidem se hovoří imunoradiometrické analýze /IRMA/. V současnosti jednou z nejužívanějších metod v imunoenzymometrické analýze je ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Měřeným signálem po ukončení interakce ligand a protilátek je enzymová aktivita. Na stěnách zkušební skleničky je imobilizován antigen, na který se váží specifické protilátky přítomné v testovaném vzorku tělní tekutiny. Navázání specifických protilátek na antigen je vizualizováno protilátkami proti lidským imunoglobulinům značenými enzymem. Po promytí je do zkušební skleničky přidán roztok chromogenního substrátu nebo substrátu a chromogenu a výsledná enzymová reakce vyhodnocena fotometricky [90].

2.3.8. Imunohistochemické metody

Pomocí imunohistochemických metod se zjišťuje přítomnost hledaného antigenu na histologickém řezu. Princip spočívá v nanesení specifické protilátky na histologický řez, ta se naváže na hledaný antigen, pokud je přítomen a vizualizuje. Vizualizace může být založena na fluorescenční detekci. Specifická protilátka je v tomto případě konjugována s vhodným fluorochromem. V ultrafialovém světle fluorescenčního mikroskopu lak fluorochrom září a ukazuje místo, kde je protilátka, tudíž i polohu hledaného antigenu. Dalším způsobem vizualizace přítomnosti protilátky je její konjugace s vhodným enzymem. Po přidání substrátu katalyzuje enzym barevnou reakci. Nejčastěji používaným enzymem pro konjugaci s protilátkou je křenová peroxidáza, méně často alkalická fosfatáza. Výsledkem reakce je barevný produkt lokalizovaný v místě hledaného antigenu. Pro odlišení specifické positivity od nespecifické jsou používány standardy [91].

3. Cíl disertační práce

1. Vypracovat metody stanovení genové exprese genů matrixových metaloproteináz MMP-2, MMP-7 a tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteináz TIMP-1 a TIMP-2 pomocí kvantitativní RT-PCR (RT real-time PCR).
2. Stanovit expresi genů MMP-2, MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 metodou kvantitativní RT-PCR:
 - u nádorových linií kolorektálního karcinomu (HT29, SW480 a SW620)
 - ve tkáňových vzorcích sliznice kolon a recta zdravé tkáně
 - ve vzorcích sliznice kolon a recta s benigním nádorovým postižením
 - ve vzorcích sliznice s maligním nádorovým postižením.
3. Stanovit expresi genů TS TP a DPD metodou kvantitativní RT-PCR:
 - ve tkáňových vzorcích sliznice kolon a recta zdravé tkáně
 - ve vzorcích sliznice kolon a recta s benigním nádorovým postižením
 - ve vzorcích sliznice s maligním nádorovým postižením.
4. Zjištěné hodnoty exprese genů korelovat s klinickým stavem a vývojem onemocnění a biologickými vlastnostmi nádorových linií.
5. Stanovit mutaci K-ras genu kodonu 12:
 - ve tkáňových vzorcích sliznice kolon a recta zdravé tkáně
 - ve vzorcích sliznice kolon a recta s benigním nádorovým postižením
 - ve vzorcích sliznice s maligním nádorovým postižením.
6. Četnost mutací K-ras genu kodonu 12 porovnat s literárními údaji.

4. Metodika

4.1. Soubor nemocných s kolorektálním karcinomem

Studie zahrnuje 38 pacientů s primárně detekovaným kolorektálním karcinomem (věk 33-89 let, průměr 70.1 let) v různých stádiích onemocnění. Rozdělení stádií onemocnění dle UICC klasifikace (International Union Against Cancer) vyplývá z tabulky 6.

Tabulka 6: Rozdělení stádií onemocnění dle UICC klasifikace v našem souboru pacientů

stádium onemocnění	počet pacientů
I	2 (5%)
II	14 (37%)
III	11 (29%)
IV	11 (29%)

Dále jsme do studie zařadili 11 pacientů s benigním onemocněním tlustého střeva (věk 19-70 let, průměr 45). Histologicky se jednalo o akutní formu Chronova onemocnění a Ulcerózní kolitidu.

4.2. Vzorčky pro stanovení exprese vybraných genů

4.2.1. Nádorové linie

Jako *in vitro* model jsme zvolili dně nádorové linie primárního kolorektálního karcinomu HT29, SW480 a jednu linii, získanou ze sekundárního nádoru, metastáz kolorektálního karcinomu, SW620.

HT29 lidská nádorová linie, izolovaná z primárního nádoru (adenokarcinom grade 2), 44 leté ženy Caucasian původu, morfologie epiteliální, kód v katalogu buněčných linií je ATCC HTB 38.

SW480 lidská nádorová linie, původem z adenokarcinomu (grade 4, Duke class B) 50-ti letého muže Caucasian původu, morfologie epiteliální, adherentní, kód v katalogu buněčných linií je ATCC CCL 228.

SW620 lidská nádorová linie, izolovaná z lymfatických uzlin (adenokarcinom) 51 letého muže Caucasian původu, morfologie epiteliální, hyperdiploidního karyotypu, kód v katalogu buněčných linií je ATCC CCL 227.

Nádorové linie byly kultivovány v médiu RPMI 1640 + 10% FBS při 37°C v 10% CO₂ atmosféře. Transportovány byly v tom též médiu a po transportu ihned zpracovány.

Nádorové linie jsme získali od MUDr. Anny Fišerové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AVČR v Praze.

4.2.2. Tkáňové vzorky

Nádorová tkáň byla získána od 38 pacientů ze soubor nemocných s kolorektálním karcinomem (Skupina TUM). Od 19 z těchto pacientů s kolorektálním karcinomem jsme získali normální tkáň sliznice tlustého střeva z okrajů střevních resektátů (byli zařazeni pouze pacienti, u nichž nedošlo k lokální recidivě ani ke generalizaci tumoru; skupina NORM). Tkáňové vzorky od pacientů s benigním onemocněním tlustého střeva tvoří skupinu BENIGN (n = 11).

Mezi skupinami NORM a BENIGN nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v žádném ze sledovaných parametrů, tj. v míře exprese zvolených genů, proto obě podskupiny byly sloučeny a v dalších statistických šetřeních byly použity jako jediná kontrolní skupina KONTROL.

Všechny vzorky byly histologicky ověřeny.

Zpracovaných vzorků bylo více, do studie však mohly být zařazeny jen vzorky od osob, kde se podařilo zjistit a sledovat další vývoj onemocnění. Vyřazeny byly také vzorky (a tudíž i pacienti), u nichž se nezdařila kvantifikace standardního genu (glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasy).

Vzorky tkáně v množství 100 - 300 mg odebrané v průběhu operace byly okamžitě zmrazeny a uchovány při - 70°C až do zpracování.

Tkáň byla získána od pacientů operovaných na Chirurgické klinice FN v Plzni v letech 1998 - 2000.

4.3. Stanovení exprese genů

Expresi genu byla zjištěna stanovením množství mRNA daného genu ve tkáni. Prvním krokem byla izolace celkové RNA, následovala reverzní transkripce (RT), která převedla veškerou mRNA do stabilnější podoby cDNA. Závěrečným krokem byla PCR v reálním čase (real-time PCR), která umožní zjistit kvantifikovat množství cDNA.

4.3.1. Isolace celkové RNA

Z 5×10^6 buněk nádorových linií resp. 100 mg tkáně jsme izolovali celkovou RNA pomocí soupravy „RNAgent Total RNA Isolation System“ (Promega, USA)

Použili jsme následující postup:

- ze zmraženého vzorku se skalpelem odkrojí 100 mg tkáně
- tkáň resp. buňky se homogenizuje v denaturačním roztoku
- přidá se 0,1 objemu 2M octanu sodného o pH 4
- přidá se stejný objemu směsi fenol-chloroform pH 4, intenzivně se míchá (Vortex) 10s, poté se ponechá na ledu 10 min.
- centrifugace 20 min. při 10 tis. g, 4°C
- odebere se horní, tj. vodná fáze a přidá stejný díl isopropanolu, -20°C, 1 hod. nebo přes noc
- centrifugace 30 min. při maximálních otáčkách (18 tis. g), poté se odstraní supernatant a peleta promyje v 70% etanolu
- peleta se rozpustí v redestipované H₂O a znovu precipituje isopropanolem, centrifuguje při maximální rychlosti a promyje v 70% etanolu
- peleta se suší 15 min. při teplotě místnosti a rozpustí ve 100 µl H₂O
- množství a kvalita RNA se stanoví spektrofotometricky (A_{260} , A_{230} , A_{280} , A_{320} , poměr A_{260}/A_{280})
- RNA se uloží do -70°C (RT by měla být provedena co nejdříve)

4.3.2. Reverzní transkripce (RT)

3 µg izolované RNA jsme použili pro reversní transkripci o celkovém objemu 20 µl. Vzorek RNA byl doplněn redestilovanou vodou, dle výpočtu do objemu 11 µl. Dále jsme přidali 1 µl oligo dT₂₀ (0,5 mg/ml) a 1 µl dNTP (10mM). Vzorek jsme vložili do termálního cyklátoru (MJ Research, USA) s následujícím programem: inkubace 5 min při 65°C. Po zchlazení na ledové tříšti jsme přidali 4 µl 5x „first standard buffer“ (Superscript II, Life Technologies, Invitrogen, USA) a 2 µl dithiothreitolu (0,1 M), dále inkubace 2 min. při 42°C a přidali jsme 1 µl (200U) reversní transkriptasy (Superscript II, Life Technologies, Invitrogen). Inkubace pokračovala při 42°C po dobu 50 min., poté následovala denaturace enzymu při 70 °C po dobu 15 min.

Vzorky reverzních transkryptů jsme uchovávali při - 20°C.

Správné provedení reverzní transkripce bylo ověřeno stanovením glycerinaldehyd-3-fosfát-dehydrogenasy (GAPDH), která musela být přítomna.

4.3.3. PCR v reálním čase (real-time PCR)

Kvantifikaci exprese genů lze provádět absolutně (stanovení počtu kopií), to znamená s použitím standard o známé koncentraci pro každý gen. Dále je možné

kvatifikaci provádět relativně, poměr vůči jinému genu, kdy se porovnávají hodnoty Ct nebo je možno tyto přístupy kombinovat (rozvedeno dále). Zvolili jsme kombinaci obou těchto přístupů. Jako referenční gen jsme použili gen ze skupiny „house-keeping“ genů, tj. genů, které jsou exprimovány konstitutivně.

4.3.3.1. Primery pro stanovení jednotlivých genů

Primery pro PCR jsme navrhli na základě nukleotidových sekvencí volně dostupných v genomové databance National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Při navrhování primerů pro PCR reakce jsme postupovali podle respektovaných zásad (parametry primerů: délka 18-26 bp, poměr G-C, A-T 40%-60%, mezi posledními dvěma nukleotidy alespoň jedena puriná báze, délka 100 -300bp). Dále byly primery voleny tak, aby amplikon překračoval alespoň jedno rozhraní dvou exonů s dostatečně dlouhým intronem, který je přítomen v DNA. Tím je zajištěno, že případná DNA kontaminace, při izolaci celkové RNA, nemůže přispívat k falešné produkci PCR amplikonu. Použili jsme jednak primery publikované v literatuře, jednak primery dle vlastního návrhu. Návrh primerů byl prováděn s pomocí počítačových programů Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Tento program vygeneroval více dvojic primerů, které řadil v pořadí dle splnění námi zadaných parametrů (uvedeno výše). Při výběru jsme dodržovali zásadu, aby neměly různé geny stejně dlouhý amplikon.

4.3.3.2. House-keeping gen

Zvolili jsme glykolytický enzym glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasy (GAPDH)-jeden z nejčastěji používaných genů [92]. Použili jsme primery navržené firmou Corbett Research (Austrálie) splňující naše požadavky [93]. Jejich poloha v sekvenci mRNA je znázorněna v obrázku 3. Primery jsou podbarveny, hranice exonů jsou označeny velkými tučnými písmeny. V případě GAPDH se amplifikace děje přes 2 exonová rozhraní. Ve schématu je označen iniciační kodon ATG a terminační kodon TAA. Podtržen je také polyadenylační signál AATAAA. Délka amplifikačního produktu je 226 bp, v případě kontaminace ze strany DNA by produkt měl délku 884 bp.

Obrázek 4: GAPDH primery - nukleotidová sekvence z NCBI , Accession M33197

DEFINITION Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA,

complete cds.
 ACCESSION M33197
 1 gttcgacagt cagccgcatac ttcttttgcg tcgccagccg agccacatcg ctccagacacc
 61 atgggggaagg tgaaggtcgg agtcaacgga tttggctgta ttgggcgcct ggtcaccagg
 121 gctgctttta actctggtaa agtggatatt gttgccatca atgaccctt cattgacctc
 181 aactacatgg tttacatggt ccaatatgat tccacccatg gcaaatcca tggcaccgtc
 241 aaggctgaga acgggaagct tgtcatcaat ggaaatcca tcaccatctt ccaggagcga
 301 gatccctcca aatcaagtg gggcgatgct ggcgctgagt acgtcgtgga gtccactggc
 361 gtcttcacca ccatggagaa ggctggggct catttgcagg ggggagccaa aagggtcatc
 421 atctctgccc cctctgctga tgccccatg ttcgtcatgg gtgtgaacca tgagaagtat
 481 gacaacagcc tcaagatcat cagcaatgcc tctcgcacca ccaactgctt agcaccctcg
 541 gccaaagtca tccatgacaa ctttggatc gtggaaggac tcatgaccac agtccatgcc
 601 atcactgcca cccagaagac tgtggatggc ccctccggga aactgtggcg tgatggccgc
 661 ggggctctcc agaacatcat ccctgcctct actggcgctg ccaaggctgt gggcaaggtc
 721 atccctgagc tgaacgggaa gctcactggc atggccttcc gtgtccccac tgccaacgtg
 781 tcagtgggag acctgacctg ccgtctagaa aaacctgcca aatatgatga catcaagaag
 841 gtggtaagc aggcgtcggg gggccccctc aaggccatcc tgggctacac tgagcaccag
 901 gtggtctcct ctgacttcaa cagcgacacc cactcctcca cctttgacgc tggggctggc
 961 attgcctca acgaccactt tgtcaagctc atttcctggg atgacaacga atttggctac
 1021 agcaacaggg tggtgacct catggcccac atggcctcca aggagtaaga ccctggacc
 1081 accagcccca gcaagagcac aagaggaaga gagagaccct cactgctggg gagtccctgc
 1141 cacactcagt cccccaccac actgaatctc ccctcctcac agttgcatg tagaccctt
 1201 gaagagggga ggggcctagg gagccgcacc ttgtcatgta ccatcaataa agtaccctgt
 1261 gctcaacc

4.3.3.3. Primery matrixových metaloproteináz

Dalším genem, jehož hladinu exprese jsme zjišťovali je Matrixová metaloproteináza 7 (MMP-7). Primery jsou dle vlastního návrhu obrázku 5. Jsou umístěny v blízkosti polyadenylačního signálu tak, že obsahují dva exointronové přechody. Délka amplifikovaného produktu je 180 bp. Ve schématu je označen iniciační kodon ATG, terminační kodon TAA, polyadenylační signál AATAAA, spojení exon-exon a primery.

Obrázek 5: MMP-7 primery - nukleotidová sekvence z NCBI, Accession NM_002423

DEFINITION Homo sapiens matrix metaloproteinase 7 (matrilysin, uterine)
 (MMP7), mRNA.
 ACCESSION NM_002423
 1 accaatcaa ccataggtcc aagaacaatt gtctctggac ggcagctatg cgactcaccg
 61 tgctgtgtgc tgtgtgectg ctgcctggca gctggccct gccgctgect caggaggcgg
 121 gaggcatgag tgagctacag tgggaacagg ctccaggacta tctcaagaga ttttatctct
 181 atgactcaga acaaaaaat gccaacagt tagaagccaa actcaaggag atgcaaaaat
 241 tctttggcct acctataact ggaatgttaa actcccgcgt catagaaata atgcagaagc
 301 ccagatgtgg agtgccagat gttgcagaat actcactatt tccaaatagc ccaaaatgga
 361 cttccaaagt ggtcacctac aggatcgtat catatactcg agacttaccg catattacag
 421 tggatcgatt agtgtcaaag gctttaaaca tgtggggcaa agagatcccc ctgcatttca
 481 ggaaagtgt atggggaact gctgacatca tgattggctt tgcgcgagga gctcatgggg
 541 actcctacc atttgatggg ccaggaaaca cgctggctca tgcctttgcg cctgggacag
 601 gtctcggagg agatgctcac ttcgatgagg atgaacgctg gacggatggg agcagtctag
 661 ggattaactt cctgtatgct gcaactcatg aacttggcca ttctttgggt atgggacatt
 721 cctctgatcc taatgcagt atgtatccaa cctatggaaa tggagatccc caaaatttta
 781 aactttccca ggatgatatt aaaggcattc agaaactata ggaaagaga agtaattcaa
 841 gaaagaaata gaaacttcag gcagaacatc cattcattca ttcattggat tgtatatcat
 901 tgttgcaaa tcagaattga taagcactgt tctccactc catttagcaa ttatgtcacc
 961 cttttttatt gcagttggt tttgaatgtc tttcactcct tttattggtt aaactcctt

1021 atggtgtgac tgtgtcttat tccatctatg agctttgtca gtgcgcgtag atgtcaattaa
 1081 atgttacata cacaaataaa taaaatgttt attccatggt aaattta

Další gen z řady matrixových metaloproteináz, jehož hladinu exprese jsme zjišťovali, je Matrixová metaloproteináza 2 (MMP-2). Primery jsou dle vlastního návrhu obrázku 6. Jsou v distální části genu. Obsahují jeden přechod exon – intron – exon. Délka amplifikovaného produktu je 160 bp. Ve schématu je označen iniciační kodon ATG, terminační kodon TAA, polyadenylační signál AATAAA, spojení exon-exon a primery.

Obrázek 6: MMP-2 primery - nukleotidová sekvence z NCBI Accession NM_004530

DEFINITION Homo sapiens matrix metaloproteinase 2 (gelatinase A, 72kD gelatinase, 72kD type IV collagenase) (MMP2), mRNA.

ACCESSION NM_004530

1 tgtttccgct gcatccagac ttccctcaggc ggtggctgga ggctgcgcat ctggggcctt
 61 aaacatacaa agggattgcc aggacctgcg gcggcggcgg cggcggcggg ggctggggcg
 121 cgggggccgg accatgagcc gctgagccgg gcaaacccca ggccaccgag ccagcggacc
 181 ctggagcgc agccctgcbc cgcggaccag gctccaacca ggcggcgagg cggccacacg
 241 caccgagcca gcgacccccg ggcgacgcgc ggggccaggg agcgctacga tggaggcgct
 301 aatggccccg ggcgcgctca cgggtccctt gagggcgctc tgtctcctgg gctgctgct
 361 gagccacgcc gccgcccgcg cgtcgcccat catcaagttc cccggcgatg tgcoccccaa
 421 aacggacaaa gagttggcag tgcaatacct gaacaccttc tatggctgcc ccaaggagag
 481 ctgcaacctg tttgtgctga aggacacact aaagaagatg cagaagttct ttggactgcc
 541 ccagacaggt gatcttgacc agaataccat cgagaccatg cgggaagccac gctgcggcaa
 601 cccagatgtg gccaaactaca acttcttccc tcgcaagccc aagtgggaca agaaccagat
 661 cacatacagg atcattggct acacacctga tctggacca gagacagtgg atgatgcctt
 721 tgctcgtgcc ttccaagtct ggagcagatg gacccactg cggttttctc gaatccatga
 781 tggagaggca gacatcatga tcaactttgg ccgctgggag catggcgatg gataccctt
 841 tgacggtaag gacggactcc tggctcatgc cttcgcccca ggcactggtg ttgggggaga
 901 ctcccatttt gatgacgatg agctatggac cttggggagaa ggccaagtgg tccgtgtgaa
 961 gtatggcaac gccgatgggg agtactgcaa gttccccttc ttgttcaatg gcaaggagta
 1021 caacagctgc actgatactg gccgcagcga tggcttctc ttggtgctcca ccacctacaa
 1081 ctttgagaag gatggcaagt acggcttctg tccccatgaa gccctgttca ccatggggcg
 1141 caacgctgaa ggacagccct gcaagtttcc attccgcttc cagggcacat cctatgacag
 1201 ctgcaccact gagggccgca cggatggcta ccgctggtgc ggcaccactg aggactacga
 1261 ccgcgacaag aagtatggct tctgcccctga gaccgcatg tccactggtg gtgggaactc
 1321 agaaggtgcc ccctgtgtct tccccttcac tttcctgggc aacaaatatg agagctgcac
 1381 cagcgcggc cgcagtgacg gaaagatgtg gtgtgcgacc acagccaact acgatgacga
 1441 ccgcaagtgg ggcttctgcc ctgaccaagg gtacagcctg ttctcctggtg cagcccacga
 1501 gtttggccac gccatggggc tggagcactc ccaagaccct ggggccctga tggcaccat
 1561 ttacacctac accaagaact tccgtctgtc ccaggatgac atcaagggca ttcaggagct
 1621 ctatggggcc tctcctgaca ttgaccttgg caccggcccc acccccacac tgggcctgtg
 1681 cactcctgag atctgcaaac aggacattgt atttgatggc atcgctcaga tccgtggtga
 1741 gatcttcttc ttcaaggacc ggttcatttg gcggactgtg acgccacgtg acaagccat
 1801 ggggccctg ctggtggcca cattctggcc tgagctcccg gaaaagattg atgcggtata
 1861 cgaggcccca caggaggaga aggctgtgtt ctttgcaggg aatgaatact ggatctactc
 1921 agccagcacc ctggagcgag ggtaccccaa gccactgacc agcctgggac tgccccctga
 1981 tgtccagcga gtggatgccg cctttaactg gagcaaaaac aagaagacat acatctttgc
 2041 tggagacaaa ttctggagat acaatgaggt gaagaagaaa atggatcctg gctttcccaa
 2101 gctcategca gatgcctgga atgccatccc cgataacctg gatgccgtcg tggacctgca
 2161 gggggcgg ggt cacagctact tcttcaaggg tgcctattac ctgaagctgg agaaccaaa
 2221 tctgaagagc gtgaagtttg gaagcatcaa atccgactgg ctaggctgct gagctggccc
 2281 tggctcccac aggcccttcc tctccactgc cttcgataca cggggcctgg agaactagag
 2341 aaggaccgg aggggcctgg cagccgtgcc ttcagctcta cagctaatca gcattctcac
 2401 tctacctgg taatttaaga ttccagagag tggctcctcc cggtgcccaa gaatagatgc

```

2461 tgactgtact cctcccaggc gcccttccc cctccaatcc caccaaccct cagagccacc
2521 cctaaagaga tcctttgata ttttcaacgc agccctgctt tgggctgccc tgggtgctgcc
2581 acacttcagg ctctttctct ttcacaacct tctgtggctc acagaaccct tggagccaat
2641 ggagactgtc tcaagagggc actggtggcc cgacagcctg gcacagggca gtgggacagg
2701 gcatggccag gtggccactc cagaccctcg gcttttctact gctggctgce ttagaacctt
2761 tcttacatta gcagtttgct ttgtatgcac tttgtttttt tctttgggctc ttgttttttt
2821 tttccactta gaaattgcat ttcctgacag aaggactcag gttgtctgaa gtcactgcac
2881 agtgcacctc agcccacata gtgatggttc ccctgttcac tctacttagc atgtccctac
2941 cgagtctctt ctccactgga tggaggaaaa ccaagccgtg gcttcccgtc cagccctccc
3001 tggccctccc ttcaaccatt ccccatggga aatgtcaaca agtatgaata aagacaccta
3061 ctgagtggc

```

4.3.3.4. Primery tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteináz

Prvním genem z řady tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteináz jehož hladinu exprese jsme zjišťovali je Tkáňový inhibitor matrixových metaloproteináz 1 (TIMP-1). Primery jsou dle vlastního návrhu obrázku 7. Jsou umístěny opět v blízkosti polyadenylačního signálu. Obsahují jeden přechod exon – intron – exon. Délka amplifikovaného produktu je 130 bp. Ve schématu je označen iniciační kodon ATG, terminační kodon TAA, polyadenylační signál AATAAA, spojení exon-exon a primery.

Obrázek 7: TIMP-1 primery - nukleotidová sekvence z NCBI Accession NM_003254

```

DEFINITION Homo sapiens tissue inhibitor of metaloproteinase 1
(erythroid
potentiating activity, collagenase inhibitor) (TIMP1),
mRNA.
ACCESSION NM_003254
1 aggggcctta gcgtgccgca tcgccgagat ccagcgccca gagagacacc agagaaccca
61 ccatgagcccc ctttgagccc ctggcttctg gcatcctggt gttgctgtgg ctgatagccc
121 ccagcagggc ctgcacctgt gtcccacccc acccacagac ggccttctgc aattccgacc
181 tcgtcatcag ggccaagtgc gtggggacac cagaagtcaa ccagaccacc ttataaccagc
241 gttatgagat caagatgacc aagatgtata aagggttcca agccttaggg gatgcccgtg
301 acatccggtt cgtctacacc cccgccatgg agagtgtctg cggatacttc cacaggctcc
361 acaaccgcag cgaggagttt ctcatgtctg gaaaactgca ggatggactc ttgcacatca
421 ctacctgcag tttcgtggct ccttggaaaca gcctgagctt agctcagcgc cggggcttca
481 ccaagaccta cactgttggc tgtgaggaat gcacagtgtt tccctgttta tccatcccct
541 gcaaaactgca gactggcact cattgcttgt ggacggacca gtcctccaa ggctctgaaa
601 agggcttcca gtcctgtcac cttgcctgcc tgccctggga gccagggctg tgcacctggc
661 agtccctgcg gtcccagata gcctgaatcc tgcccggagt ggaactgaag cctgcacagt
721 gtccacctg ttcccactcc catctttctt cgggacaatg aataaaagag ttaccaccca
781 gc

```

Druhým genem z řady inhibitorů matrixových metaloproteináz, jehož hladinu exprese jsme zjišťovali, je Tkáňový inhibitor matrixových metaloproteináz 2 (TIMP-2). Primery jsou opět dle vlastního návrhu obrázku 8. Nacházejí se v blízkosti polyadenylačního signálu. Obsahují jeden přechod exon – intron – exon. Délka amplifikovaného produktu je 177 bp. Ve schématu je označen iniciační kodon ATG, terminační kodon TAA, polyadenylační signál AATAAA, spojení exon-exon a primery.

Obrázek 8: TIMP-2 primery - nukleotidová sekvence z NCBI Accession NM_003255

DEFINITION Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2), mRNA.

ACCESSION NM_003255

```

1 cgagcaaac acatccgtag aaggcagcgc ggccgcccag agccgcagcg ccgctcgcgc
61 gccgcccccc accccgcccgc cccgcccggc gaattgcgcc ccgcccctt cccctcgcgc
121 ccccgagaca aagaggagag aaagtttgcg cggccgagcg gggcaggtga ggaggggtgag
181 ccgcgcggga ggggcccgcg tcggccccgg ctcagccccc gccgcgcgcc ccagcccgcc
241 gccgcgagca gcgcccggac cccccagcgg cggccccgcg ccgcccagcc ccccggcccg
301 ccatgggccc gcgcccggc accctgcccg tggcgctcgg cctcctgctg ctggcgagcg
361 tgcttcgccc ggccgacgcc tgcagctgct ccccgggtgca cccgcaacag gcgttttgca
421 atgcagatgt agtgatcagg gccaaagcgg tcagtgagaa ggaagtggac tctggaacg
481 acatttatgg caaccctatc aagaggatcc agtatgagat caagcagata aagatgttca
541 aagggcctga gaaggatata gagtttatct acacggcccc ctcctcggca gtgtgtgggg
601 tctcgtgga cgttgaggga aagaaggaat atctcattgc aggaaaggcc gggggggacg
661 gcaagatgca catcaccctc tgtgacttca tcgtgccctg ggacaccctg agcaccacc
721 agaagaagag cctgaaccac aggtaccaga tgggctgcga gtgcaagatc acgcgctgcc
781 ccatgatccc gtgctacatc tcctccccgg acgagtgccct ctggatggac tgggtcacag
841 agaagaacat caacgggcac caggccaagt tcttcgcctg catcaagaga agtgacggct
901 cctgtgcgtg gtaccgccc gcggcgcgcc ccaagcagga gtttctcgac atcgaggacc
961 cataagcagg cctccaacgc ccctgtggcc aactgcaaaa aaagcctcca agggtttoga
1021 ctggtccagc tctgacatcc cttcctggaa acagcatgaa taaaacactc atccc

```

4.3.3.5. Přehled použitých primerů [94]

(oligonukleotydy byly syntetizovány firmami Generi-Biotech, CZ, IBV Rakousko):

GAPDH: 226 bp

Forward primer: 5'-gaa ggt gaa ggt cgg agt-3'

Reverse primer: 5'-gaa gat ggt gat ggg att tc-3'

MMP-2: 160 bp

Forward primer: 5'-ctttgctggagacaaa ttctg-3'

Reverse primer: 5'-ggc acc ctt gaa gaa gta gc-3'

MMP-7: 180 bp

Forward primer: 5'-gta tgg gac att cct ctg atc c -3'

Reverse primer: 5'-cca atg aat gaa tga atg gat -3'

TIMP-1: 130 bp

Forward primer: 5'-aga cct aca ctg ttg gct gtg ag-3'

Reverse primer: 5'-gac tgg aag ccc ttt tca gag-3'

TIMP-2: 177 bp

Forward primer: 5'-atg cac atc acc ctc tgt ga-3'

Reverse primer: 5'-ctc tgt gac cca gtc cat cc-3'

4.3.3.6. Příprava standardů

Jak již bylo řečeno, kvantifikaci exprese genů lze provádět absolutně, to znamená s použitím standard, pro každý gen o známé koncentraci nebo relativně, vůči jinému

genu, kdy se porovnávají hodnoty Ct nebo je možno tyto přístupy kombinovat. Zvolili jsme kombinaci obou těchto přístupů.

Příprava standard spočívá v inzerci fragmentu genu ohraničeného našimi primery (amplionu) do vektoru (plazmidu), který nám umožní, po jeho namnožení (klonování) v bakteriích, získat jakékoli množství amplikonu o námi určeném počtu kopií. Takto připravené standardy jsme použili pro kvantitativní PCR (real-time PCR).

Prvním krokem přípravy standard bylo provedení základní PCR s použitím primerů genu, pro který standardy vytváříme. Jako zdroj mRNA jsme použili tkáň nebo buněčnou linii, u které jsme předpokládali expresi příslušného genu. Po základní PCR jsme provedli elektroforézu v agarózovém gelu, koncentraci zvolili s ohledem na délku amplikonu (zpravidla 2,0%). Specifické pruhy DNA (pruhy odpovídající délky) z agarózového gelu jsme vyřízli skalpelem. Další postup je byl následující:

- vyříznutý gel se přenesse do eppendorfky a přidá se 200 μ l 1M NaCl-Tris- EDTA
- inkubuje se 1hod. při -20°C
- inkubuje se 30 min. při 37°C
- špičkou automatické pipety se gel rozdrťí a přenesse do „spin“ kolonek (Millipore, USA)
- centrifuguje se při 6 tis. ot/5 min.
- propláchne se 200 μ l 1M NaCl-Tris-EDTA a opět centrifugeje při 6 tis. ot/5 min.
- sráží se DNA: přidáme 1/10 3M CH₃COOH pH=5,2, vortexuje se
- přidá se 1mL absolutního ethanolu, vortexuje se
- precipituje se 1 hod při -20°C, centrifugujeme při 14 tis. ot/30 min.
- přidá se 1ml 70% ethanolu, vortexuje se, centrifuguje se 14 tis.ot/5min. 1x opakuje
- suší se 10 min. při teplotě místnosti a rozpustí v 20 μ l TE

Izolovaný amplikon DNA jsme inžertovali do pGEM-T plasmidu (Promega) pomocí kohezních konců, vytvořených Taq DNA polymerázou. Ligace T4DNA lipázou probíhala při 4°C přes noc. Takto upraveným vektorem jsme transformovali bakteriální buňky (Escherichia coli JM 109). Transformace bakterií Escherichia coli JM 109 probíhala následujícím způsobem:

- kompetentní bakteriální buňky Escherichia coli JM 109 se nachají

rozmrznout na ledu (10-15 min.)

- 50 μ l těchto buněk se přenese do předchlazené eppendorfky (na ledu)
- přidá se 2 μ l ligační směsi, obsahuje vektor s naším inzertem
- provede se teplotní šok: 20 min. na ledu, 50 s 42°C (vodní lázeň), 2 min. na ledu
- přidá se 1ml SOC media
- inkubuje se 2 hod. při 37°C, za intenzivního třepání
- 0,5 ml SOC média s transformovanými bakteriemi se přenese na agarové Petriho mističky (obsahují X-gal a IPTG pro modrobílou selekci pozitivních klonů.

U pozitivních klonů (bílé kolonie) jsme ověřili, zda obsahují inzert (námi vložený amplikon). Provedli jsme PCR s primery specifickými pro plasmid (T7 a SP6). Klon bakterií, který poskytoval správnou délku amplikonu (délka inzertu + 120 bp plasmidu) jsme namnožili v 200ml LB média (6 hod. při 37°C, při intenzivním třepání), plasmid purifikovali pomocí soupravy High pure plastid Isolation kit (Promega, USA) a spektrofotometricky stanovili jeho koncentraci. Dále byla správnost inzertu ověřena sekvenací na přístroji ALFexpress (Amersham Pharmacia Biotech). Po ověření inzertu sekvencí jsme standardy na základě spektrofotometricky určené koncentrace naředili v rozsahu 10^3 - 10^8 DNA kopií na 1 μ l. Takto vytvořené plasmidové standardy jsme uchovávali při -20°C.

4.3.3.7. Sekvence klonovaných standardů

Sekvenaci klonovaných standardů jsme provedli dideoxinukleotidovou metodou pomocí PCR sekvenační soupravy „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham Pharmacia Biotech). Použili jsme primerů T7 a SP6 značených Cy5. Sekvenační analýza pak probíhala na polyakrylamidovém gelu v sekvenátoru ALFexpress (Amersham Pharmacia Biotech). Takto určenou sekvenci inzertů jsme porovnali s sekvencí v databázi NCBI.

4.3.3.8. Provedení polymerázové řetězové reakce v reálném čase

PCR v reálném čase jsme prováděli na přístroji Rotor-Gene 2000 (Corbett Research). Na tomto přístroji jsme prováděli jednak vlastní kvantifikace, ale i všechny PCR reakce

nutné pro přípravu standard. Důvodem byl problém přenosu metodik mezi klasickým termocyklátorem na principu Peltierovského chlazení (přenos teplot zajišťuje kov) a naším real-time PCR přístrojem Rotor-Gene 2000, u kterého přenos teplot zajišťuje vzduch.

Objem PCR reakce pro real-time PCR jsme používali 20 μl (19 μl reakční směsi a 1 μl cDNA vzorku). 100 μl PCR reakční směs jsme připravili následujícím způsobem: 10 μl 10 x pufr, 9 μl MgCl_2 (50 mM), 2 μl dNTP (10mM), 3 μl každého primem (20 pmol/ μl), 5 u 1 2,5x SYBRgreen, 1 μl (5 U/ μl) Thermo-Start DNA polymerace (AB Gene) a 67 μl redestilované vody.

Zásadním krokem pro každou PCR reakci bylo nastavení teplot a délek jednotlivých kroků reakcí (princip PCR je popsán výše). Úvodní inkubace 95°C po dobu 15 min. byla ve všech případech stejná, při této teplotě se zaktivovala „hot start“ DNA polymeráza, jejíž inhibice byla provedena chemickou modifikací. Teploty dalších kroků se lišily podle délky a složení primerů a podle délky amplifikovaného úseku. Dále byla nutná optimalizace všech kroků s nastavením různých teplot. Jako optimální teploty a časy jsme použili ty, při kterých bylo dosahováno nejvyšší citlivosti reakcí (byly detekovány nejnižší koncentrace standard a nedošlo k pozitivitám negativních kontrol) tabulka 7.

Tabulka 7: Optimální teploty a časy real-time PCR pro stanovení jednotlivých genů

	Denaturace		annealing		polymerace		melt
	Teplota	Čas	Teplota	Čas	Teplota	Čas	
GAPDH	95°C	30 sec.	55°C	30 sec.	72°C	20 sec.	54-92°C
MMP-2	95°C	30 sec.	69°C	30 sec.	72°C	30 sec.	54-92°C
MMP-7	95°C	30 sec.	55°C	30 sec.	72°C	20 sec.	54-92°C
TIMP-1	95°C	30 sec.	60°C	30 sec.	72°C	20 sec.	54-92°C
TIMP-2	95°C	30 sec.	60°C	30 sec.	72°C	20 sec.	54-92°C

Protože při PCR reakci nevznikají vždy jen specifické produkty, bylo třeba specifitu produktu ověřit. Přístroje real-time PCR umožňují provést denaturační analýzu. Ta využívá skutečnosti, že teplota tání (T_m) odpovídá délce a složení úseku DNA. Po proběhnutí PCR byla v každé reakci ověřena specifitu produktu denaturační analýzou v mnoha případech byla navíc ověřena elektroforézou na agarózovém gelu. Používali jsme 2,0% gel, TAE pufr a jako indikátor pohybu DNA fragmentů bromfenolovou

modř. DNA jsme vizualizovali pomocí ethidium-bromidu, který se interkaluje do dvouvláknové struktury DNA a svítí v UV světle, hodnocení probíhalo na UV transluminátoru. Na závěr jsme gel vyfotografovali.

Kvantitativní PCR jsme prováděli na prvním detekčním kanálu přístroje Rotor-Gene 2000 Dual-Channel. Pro detekci PCR produktů jsme zvolili Syber green, interkalační flouorochrom. Zvolili jsme rotor na 36 0,2 ml PCR zkumavek. To umožnilo do každé reakce umístit 29 - 30 analyzovaných vzorů, zbylých 5-6 míst bylo třeba pro standardy a jedno pro negativní kontrolu. Stanovení kvantitativní PCR jsme prováděli v duplikátech pokud se výsledky nebylo možno nejednoznačně interpretovat, stanovení jsme opakovali. Konečný výsledek je průměrem naměřených hodnot. Specificitu všech stanovení jsme testovali denaturační analýzou, která byla stálou součástí PCR programu (melt). Případně navíc na elektroforetickém gelu.

Kvantifikace byla provedena pouze u vzorků, u kterých byla potvrzena specifická reakce, přítomnost námi sledovaného genu. Tyto vzorky vykázaly správnou teplotu T_m identickou s T_m standardů.

Grafy na následujících stránkách znázorňují grafické záznamy reakcí PCR v reálném čase, a to jak standardů, tak stanovovaných vzorků.

4.3.3.10. Reprodukovatelnost stanovení

Předpokladem reprodukovatelnosti je standardní provádění všech protokolů, kontrola přesnosti automatických pipet a přechovávání chemikálií za standardních podmínek.

Protože o PCR je známo, že je ovlivnitelná různými vnějšími faktory (např. předchozí činnost v laboratoři, množství pylu ve vzduchu), dalším krokem k reprodukovatelnosti je použití standard. Pro zabránění degradace DNA standard o nízkých koncentracích, 10^3 , 10^4 kopií, jsme stanovení provedená s odstupem času (např. týden), připravili z nově naředěných standard, ze zmraženého zásobního standardu 10^9 kopií.

Přesnost změření standardů v každém novém pokusu vyjadřuje číslo R, které je automaticky vypočteno při kvantifikaci programem přístroje pro real-time PCR. V ideálním případě je rovno jedné (standarty přesně odpovídají deklarované hodnotě, nebo když jsou standarty jen dva). Ve stanoveních standardů jsme dosahovali hodnot $R > 0,99$ a použili jsme i stanovení hodnotu R mezi 0,99 a 0,98.

4.3.3.11. Stanovení exprese genů thymidylát syntázy (TS), thymidylát fosfatázy (TP) a dihydropyrimidin dehydrogenázy (DPD)

Stanovení exprese genů TS, TP a DPD bylo provedeno pomocí kitů LightCycler TS mRNA Quantification Kit^{Plus} LightCycler TP mRNA Quantification Kit^{Plus} a LightCycler DPD mRNA Quantification Kit^{Plus} (Roche) na přístroji LightCycler (Roche). Kvantifikace byla provedena relativně, „house keeping“ gen byl v kitech použit gen glukóza-6-fosfát-dehydrogenázy (GAPDH). Stanovení exprese genů zahrnovalo dva kroky, RT a real-time PCR. Reverzní transkripce byla provedena pomocí specifických oligonukleotidů pro jednotlivé geny (GAPDH, TS, TP a DPD). Sekvence oligonukleotidů nebyla publikována. Reverzní transkripce probíhala v následujícím teplotním chématu: 25°C 10min., 42°C 10min., 94°C 5min. v celkovém objemu 10 µl. Pro real-time PCR bylo použito 4µl reverzního transkriptu. Sekvence primeru pro jednotlivé geny nebyla publikována. Velikost ampliconu pro gen G6PDH byla 123bp, pro TS 111 bp, TP 120 bp a DPD 134 bp. Teplotní profil PCR byl následující: 95°C 10 s, 62°C 10 s, 72°C 10 s. Tento teplotní profil byl opakován 40x. Množství vznikajícího produktu bylo monitorováno pomocí sekvenčně specifických florescent resonance energy transfer (FRET) sond (sekvence nepublikována). Pro PCR byla použita rekombinantní Taq DNA polymeráza. Reakce probíhala ve 20 µl. Expese jednotlivých genů byla stanovena jako poměr exprese TS/GAPDH, TP/GAPDH a

DPD/GAPDH. Podrobný manuál je v dokumentaci ke kitům a v příloze. Přístroj LightCycler funguje na stejném principu jako přístroj Rotorgene.

4.4. Detekce mutace genu K-ras kodonu 12

Detekce K-ras mutace kodonu 12 ve vzorcích sliznice kolon a recta s maligním nádorovým postižením, sliznice s benigním nádorovým a zdravé tkáně byla provedena metodou PCR s následným štěpením restriktivním enzymem v místě mutace (PCR RFLP).

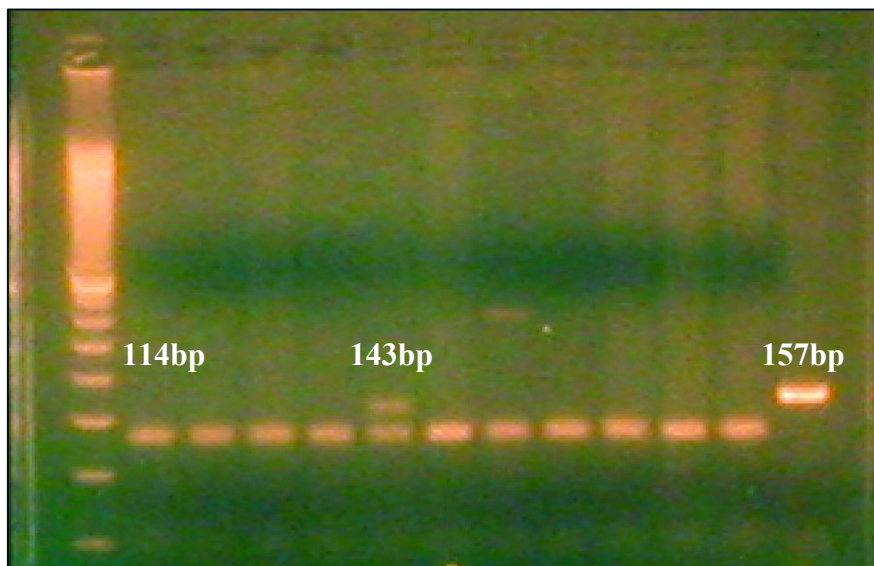
Postup metodiky byl následující:

- skalpelem se odřízne 100 µg tkáně, přenesse se do eppendorfky a přidá 1 ml roztoků pro lyzi erytrocytů, protřepá se
- centrifugace 3 min./3000 rpm
- vylije se supernatant a k peletu se přileje 1 ml destilované H₂O , protřepe
- centrifugace 3min./3000 rpm
- vylije se supernatant
- k sedimentu se přidá 250 µl dH₂O, 100 µl pufru pro proteinázu K, 60 µl 10 % SDS, 20 µl proteinázy K (20 mg/1 ml), důkladně se promýchá, dobře se uzavře proti odparu
- inkubace při 37 °C přes noc
- zkumavky se ochladí na pokojovou teplotu
- ke vzorku se přidá 150 µl 5M NaCl a důkladně se protřepe, přidá se 150 µl chloroformu NaCl a důkladně protřepe, přidá se 150 µl chloroformu a důkladně protřepe
- centrifugace 15 min./12000 rpm/RT.
- supernatant se opatrně přelije do eppendorfky se 700 µl 96% etanolu a převrácením zkumavky se vysráží DNA
- centrifugace 10 min./12000 rpm/RT.
- slije se supernatant a přidá 1 ml 70% etanolu
- centrifugace 5 min./12000 rpm/RT.
- suší se 15 min. v exikátoru, musí být odpařen veškerý etanol
- rozpustí se v 500 µl d H₂O, před měřením koncentrace se rozpustí vzorek zahřátím 5 min/56°C nebo se ponechá při pokojové teplotě přes noc

Mutaci jsme detekovali metodou RFLP (polymorfismus restričních fragmentů)

Nejdříve jsme provedli PCR pomocí primerů, obklopujících 12. kodon, jehož polymorfismus jsme zjišťovali. Následně jsme fragment získaný PCR štěpili enzymem BstNI a provedli elektroforézu. V případě zdravé alely se fragment získaný PCR (157 bp) štěpil na 3 fragmenty (14bp, 29bp a 114bp), t.j. v místě 12. kodónu a v místě konstantně štěpeném (ověřuje správnou funkci enzymu). Pokud 12. kodón obsahoval mutaci, restriktáza jej neštěpila a štěpila pouze místo konstantně štěpané. Získali jsme dva fragmenty PCR produktu 143bp a 14bp. Záznam elektroforézy s fragmenty DNA vizualizovanými Ethidium bromidem je na obrázku 9. Metodika je převzata z publikace [95].

Obrázek 9: Detekce K-ras mutace kodonu 12



4.5. Hodnocení klinického stavu

Pro korelaci exprese s klinickým stavem pacientů bylo využito těchto údajů:

TNM klasifikace

TNM klasifikace publikovaná evropskou organizací UICC se shoduje s klasifikací AJCC (American Joint Committee on Cancer). Principem této klasifikace je popis velikosti nádoru T (nádor) postižení uzlin N (noduli) velikosti metastáz (M).

Lokalizace nádoru (anatomické dělení)

Pro posouzení exprese genů v různých částech trávicího traktu jsme použili rozdělení: kolon (C18), rektosigmoideum (C19), rektum (C20)

Remise

Remise byla charakterizována v souladu s definicí WHO [96]. Remise odpovídá v literatuře užívané charakteristice „no evidence of disease" (NED).

Progrese

Progrese byla charakterizována v souladu s definicí WHO [96]. Progrese odpovídá v záznamech užívané charakteristice „recurrence of disease" (RD), vznik nového nádoru nebo zvětšení jednoho či více ložisek nejméně o 25%.

Bezpříznakové přežití (disease-free survival DFI)

Bezpříznakové přežití bylo charakterizováno v souladu s definicí WHO [96]. Počítá od dosažení celkové remise až do vzniku recidivy.

Celková doba přežití (overall survival – OS)

Celková doba přežití bylo charakterizováno v souladu s definicí WHO [96]. Celková doba přežití je obvykle vypočítána od zahájení léčby resp. od data stanovení diagnózy do smrti pacienta.

Klinické stavy byly vyhodnoceny na základě ambulantního záznamu o zdravotním stavu pacienta uvedeného onkologem nebo chirurgem a na základě výsledků pravidelného stagingu pacientů s kolorektálním karcinomem.

Údaje o klasifikaci nádoru a indikované terapii byly získány z dokumentace na Chirurgické klinice FN Plzeň (přednosta prof. MUDr. L. Třeská DrSc.). Ambulantní karty Onkologického a radioterapeutického oddělení FN Plzeň (přednosta MUDr. J. Fínek, Ph.D.). Informace o stavu pacientů byly získány také z řady onkologických oddělení v České republice a údaje o přežití ze Západočeského onkologického registru (vedoucí MUDr. M. Roušarová).

Údaje o gradingu nádoru byly získány z dokumentace na příslušném oddělení, nebo přímo z Ústavu patologické anatomie LF a FN Plzeň (přednosta prof. MUDr. Michal Michal).

4.6. Statistická analýza

Statistická analýza vstupního souboru byla provedena s užitím software S.A.S. (Statistical Analysis Software) verze 8.02 a programu STATISTICA verze 5.1. (grafické výstupy). Byla provedena deskriptivní statistika vstupního souboru. Dále testy relativní četnosti. Pro porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách

byly použity neparametrické testy, Kruskal-Wallisův test a Wilcoxonův test, používané pro skupiny s negaussovské rozložením zkoumaných znaků. Pro zjištění závislostí zkoumaných znaků v jednotlivých skupinách, vzhledem k distribuci těchto proměnných, byl použit Pearmanův koeficient korelace.

Pro zjištění vlivu jednotlivých proměnných na délku celkového přežití (OS), respektive délku bezpříznakového období (DFI) byla použita Kaplan-Meierova metoda odhadu distribuční funkce přežití a dále pak byly počítány tzv. log-rank test a Wilcoxon test. U spojitých proměnných byl vztah mezi celkovým přežitím (respektive DFI) a danou proměnnou zkoumán pomocí testů asociace (Wilcoxon test, log-rank test). Stáří vzorků a dostupností dat byl zkoumaný časový interval omezen na 5 resp. 7 let.

5. Výsledky

5.1. Exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620

5.1.1. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620

V tabulce 11 jsou hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 u jednotlivých linií. V tabulce 12 jsou hodnoty exprese stejných genů, hodnoty jsou uvedeny absolutně, tzn. počet kopií na 1 buňku. Zatímco mRNA MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 jsme detekovali u všech nádorových linií, mRNA MMP-2 jsme detekovali pouze u linií SW620 a SW480.

Tabulka 11: hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 u nádorových linií

nádorová linie	MMP-7/GAPDH	TIMP-1/GAPDH	MMP-2/GAPDH	TIMP-2/GAPDH	MMP-2/TIMP2
HT29	46,43532169	0,925589914	0	0,001361401	0
SW620	0,150213583	9,195138872	3,251E-07	0,002428174	0,000133887
SW480	0,043743799	8,671500834	4,20545E-06	0,008135097	0,000516952

Tabulka 12: hladiny absolutní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 u nádorových linií (počet kopií cDNA vztažený na 1 buňku)

nádorová linie	MMP-7	TIMP-1	MMP-2	TIMP-2	MMP-2/TIMP-2
HT29	125,1405823	2,4944128	0	0,0036689	0
SW620	0,0924106	5,6568007	0,0000002	0,0014938	0,000133887
SW480	0,105348291	20,88359545	0,0000016	0,003095067	0,000516952

5.2. Exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu

5.2.1. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na chorobném postižení kolorektální tkáně

V tabulce 13 jsou hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi normální tkání (skupina NORM) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM). Hladina exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 je signifikantně zvýšená u nádorové maligní tkáně (skupina TUM) ve srovnání s normální tkání (skupina NORM) ($p < 0.0020$, $p < 0.0467$, $p < 0.0007$, $p < 0.0003$).

Tabulka 13: Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi nádorovou maligní tkání a normální tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkání (n=19)	nádorová tkáň (n=38)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,00035	0.0020
TIMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,0028	0.0467
MMP-7/GAPDH	0 - 0	0 - 3,2560	0.0007
TIMP-1/GAPDH	0-0.2394	0.0839-26.0146	0.0003

Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi tkání benigního onemocnění (skupina BENIGN) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM) jsou v tabulce 14. Zjistili jsme, že hladina exprese je signifikantně zvýšená pouze u mRNA MMP-2 nádorové maligní tkáně (skupina TUM) ve srovnání s benigní tkání ($p < 0.0464$). Rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi nádorovou a benigní tkání nebyl zjištěn ($p < 0.4042$, $p < 0.1139$, $p < 0.0780$).

Tabulka 14: Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi nádorovou maligní tkání a benigní tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	benigní onemocnění (n=11)	nádorová tkáň (n=38)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,00035	0.0464
TIMP-2/GAPDH	0 - 0.0015	0 - 0,0028	0.4042
MMP-7/GAPDH	0 - 1.10987	0 - 3,2560	0.1139
TIMP-1/GAPDH	0 - 20.3014	0.0839 - 26.0146	0.0780

V tabulce 15 jsou hodnoty exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 a jejich porovnání mezi normální tkání (skupina NORM) a benigní tkání (skupina BENIGN). Protože jsme nenašli rozdíly v úrovni exprese genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi skupinami NORM a BENIGN ($p < 0.2231$, $p < 0.4615$, $p < 0.2691$, $p < 0.2932$) spojili jsme vzorky těchto tkání do jedné skupiny, která umožňuje sledovat rozdíly mezi maligní tkání a tkání bez maligního postižení, tabulka 16.

Tabulka 15: Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi normální tkání a benigní tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkání (n=19)	benigní onemocnění (n=11)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0	0.2231
TIMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0.0015	0.4615
MMP-7/GAPDH	0 - 0	0 - 1.10987	0.2691
TIMP-1/GAPDH	0-0.2394	0 - 20.3014	0.2932

Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi normální tkání s benigní tkání (skupina NORM + skupina BENIGN) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM) jsou v tabulce 4. Zjistili jsme, že hladina exprese mRNA MMP-2, MMP-7 a TIMP-1 je signifikantně zvýšená u nádorové maligní tkáně (skupina TUM) ve srovnání s normální a benigní tkání ($p < 0.0005$, $p < 0.0004$, $p < 0.0007$). Rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2 mezi nádorovou maligní a nemaligní tkání byl hraniční ($p < 0.0549$).

Tabulka 16: Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi jednotlivými nádory a kontrolní skupinou (Wilcoxonův test).

mRNA	zdravá tkáň + benigní onemocnění (n=30)	nádorová maligní tkáň (n=38)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,00035	0,0005
TIMP-2/GAPDH	0 - 0,0001	0 - 0,0028	0,0549
MMP-7/GAPDH	0 - 0	0 - 3,2560	0,0007
TIMP-1/GAPDH	0 - 0,6665	0.0839 - 26.0146	0,0004

Expres jednotlivých genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 nebyla ve skupinách TUM, BENIGN a NORM) přítomna u všech vzorků, a proto jsme zjišťovali, zda přítomnost mRNA jednotlivých genů (relativní četnosti stanoveného parametru) není pro některou skupinu statisticky významně častější než pro jinou. Výsledky přítomnosti mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7, TIMP-1 u jednotlivých skupin jsou shrnuty v tabulce 17.

Messenger RNA MMP-2 byla přítomna u 42% (16 z 38) vzorků nádorové maligní tkáně a nebyla přítomna u 58% (22 z 38) vzorků nádorové maligní tkáně. U nemaligní tkáně byla mRNA MMP-2 detekována ve 3% (1 z 30) a v 97% (29 z 30) byl její výskyt negativní.

Tabulka 17: Četnosti stanoveného parametru mRNA u vzorků nádorové kolorektální tkáně a nenádorové kolorektální tkáně (normální tkáň + benigní onemocnění)

skupina		detegována mRNA	nedetegována mRNA
	N	MMP-2 N (%)	MMP-2 N (%)
zdravá tkáň + benigní onemocnění	30	1 (3%)	29 (97%)
nádorová tkáň	38	16 (42%)	22 (58%)
	N	TIMP-2 N (%)	TIMP-2 N (%)
zdravá tkáň + benigní onemocnění	30	8 (27%)	22 (73%)
nádorová tkáň	38	21 (55%)	17 (45%)
	N	MMP-7 N (%)	MMP-7 N (%)
zdravá tkáň + benigní onemocnění	30	5 (17%)	25 (83%)
nádorová tkáň	38	25 (66%)	13 (34%)
	N	TIMP-1 N (%)	TIMP-1 N (%)
zdravá tkáň + benigní onemocnění	30	14 (47%)	16 (53%)
nádorová tkáň	38	35 (92%)	3 (8%)

Přítomnost mRNA MMP-2 byla nalezena signifikantně častěji ($p < 0.003$) u nádorové maligní tkáně než u nemaligní tkáně (skupina NORM+ skupina BENIGN). Také při porovnání přítomnosti mRNA MMP-2 u nádorové maligní tkáně a zdravé tkáně (group NORM, $p < 0.001$) a přítomnosti mRNA MMP-2 u nádorové maligní tkáně a benigní tkáně (group BENIGN, $p < 0.04$) byl nalezen signifikantní rozdíl (viz. tabulka č.18).

Tabulka 18: Hodnoty statistické významnosti (p-value) přítomnosti mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 u vzorků nádorové kolorektální tkáně a nenádorové kolorektální tkáně (zdravá tkáň + benigní onemocnění)

test relativní četnosti	p -value			
	MMP-2	TIMP-2	MMP-7	TIMP-1
nádorová tkáň X nenádorová tkáň	$p < 0,003$	$p < 0,05$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
nádorová tkáň X normální tkáň	$p < 0.001$	$p < 0.04$	$p < 0,0002$	$p < 0,0001$
nádorová tkáň X benigní tkáň	$p < 0.04$	$p < 0.4$	$p < 0.0276$	$p < 0.0047$

Zastoupení jednotlivých stádií u mRNA MMP-2 pozitivních vzorků kolorektálního karcinomu bylo následující: stage I 0%, stage II 40% (6 z 15), stage III 40% (6 z 15), stage IV 20% (3 z 15).

V tabulce 17 jsou dále uvedeny relativní četnosti stanoveného parametru mRNA TIMP-2 u vzorků nádorové maligní tkáně a nemaligní tkáně (group NORM + group BENIGN). Messenger RNA TIMP-2 byla přítomna u 55% (21 z 38) vzorků nádorové maligní tkáně a nebyla přítomna u 45% (17 z 38) vzorků maligní tkáně. U nemaligní tkáně byla mRNA TIMP-2 detekována ve 27% (8 z 30) a v 73% (22 z 30) byl její výskyt negativní.

Pokud jsme vyhodnotili přítomnost mRNA TIMP-2 u nádorové tkáně ve srovnání s kontrolní skupinou (group NORM+group BENIGN) byla signifikance hraničně významná ($p < 0.05$). Při porovnání přítomnosti mRNA TIMP-2 u nádorové tkáně a zdravé tkáně (skupina NORM) jsme našli statisticky významný rozdíl ($p < 0.04$), u nádorové tkáně a benigní tkáně (group BENIGN) nebyl nalezen signifikantní rozdíl ($p < 0.4$) (viz. tabulka 18).

Zastoupení jednotlivých stádií u mRNA TIMP-2 pozitivních vzorků kolorektálního karcinomu bylo následující: stage I 0%, stage II 38% (8 z 21), stage III 38% (8 z 21), stage IV 24% (5 z 21).

Messenger RNA MMP-7 byla přítomna v 66% (25 z 38) u nádorových vzorků a nebyla detekována u 34% (13 z 38). U kontrolní tkáně byla mRNA MMP-7 detekována v 17% vzorku (5 z 30), a u 83% (25 z 30) nalezena nebyla, tabulka 17. Přítomnost mRNA MMP-7 byla signifikantně častější ($p < 0.0001$) v nádorové tkáni, než v kontrolní tkáni. (skupina NORM + skupina BENIGN). Pokud jsme porovnali přítomnost MMP-7 u nádorové tkáně (skupina TUM) a normální tkáně (skupina NORM) zjistili jsme signifikantně častější přítomnost ($p < 0.0002$) v nádorové tkáni. Stejně tak byla signifikantně častější přítomnost v nádorové tkáni (skupina TUM) v porovnání s benigní tkání (skupina BENIGN) ($p < 0.0276$), tabulka 18.

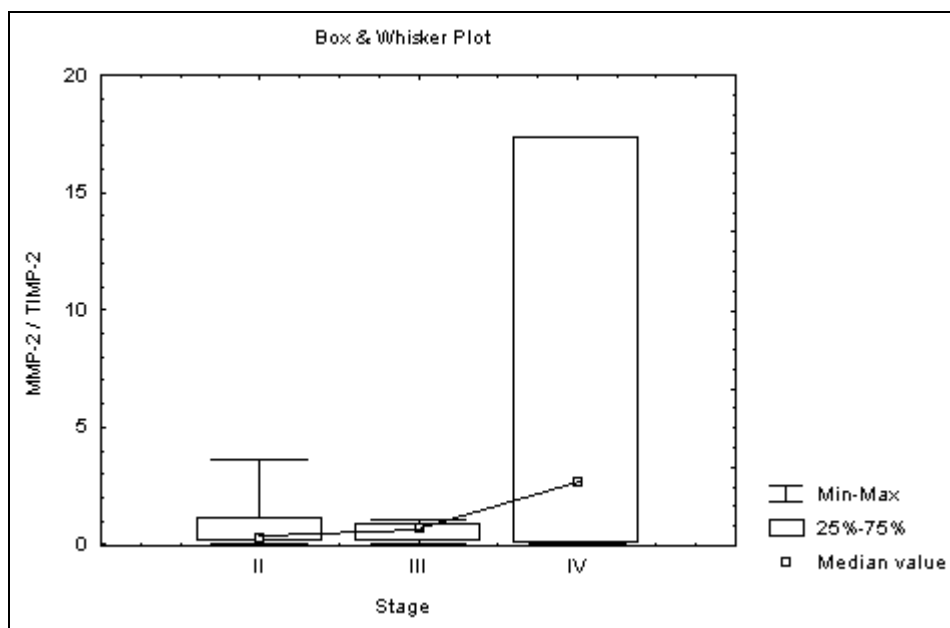
Zastoupení jednotlivých stádií u mRNA MMP-7 pozitivních vzorků kolorektálního karcinomu bylo následující: stage I 4% (1 z 25), stage II 40% (10 z 25), stage III 28% (7 z 25), stage IV 28% (7 z 25).

Messenger RNA TIMP-1 byla detekována v 92% (35 z 38) u nádorových vzorků a nebyla nalezena u 8% (3 z 38) vzorků. U kontrolní tkáně byla stanovena mRNA TIMP-1 u 47% (14 z 30) vzorků, a u 53% (16 z 30) nalezena nebyla, tabulka 17. Přítomnost mRNA TIMP-1 byla signifikantně vyšší ($p < 0.0001$) u nádorové tkáně v porovnání s kontrolní (skupina NORM + skupina BENIGN). Také přítomnost TIMP-1 mRNA v nádorové tkáni byla signifikantně častější ($p < 0.0001$) než v normální tkáni (skupina NORM). Stejně tak byla signifikantně častější přítomnost v nádorové tkáni (skupina TUM) v porovnání s benigní tkání (skupina BENIGN) ($p < 0.0047$), tabulka 18.

Zastoupení jednotlivých stádií u mRNA TIMP-1 pozitivních vzorků kolorektálního karcinomu bylo následující: stage I 3% (1 z 35), stage II 37% (13 z 35), stage III 31% (11 z 35), stage IV 29% (10 z 35).

Vzhledem k funkční závislosti MMP-2 a TIMP-2, stanovili jsme poměr mRNA MMP-2/TIMP-2 a korelovali jej se stadiem nádorového onemocnění. Jak je vidět na obrázku 10, vyšší stadium nádorového onemocnění koreluje s vyšším mediánem hodnot poměru MMP-2/TIMP-2 (stage II: 0.29 (median), stage III: 0.69, stage IV: 2.71) ale neregistrovali jsme statistickou signifikanci ($p < 0.58$).

Obrázek10: Poměr mRNA MMP-2/TIMP-2 u stádií nádorového onemocnění



5.2.2. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na stádiu onemocnění

Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi stádii onemocnění I a II oproti stádiím III a IV jsou v tabulce 19. Nejistili jsme žádné signifikantní rozdíly v hladinách exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi stádii I, II versus III, IV ($p < 0.8044$, $p < 0.8278$, $p < 0.7167$, $p < 0.4083$).

Tabulka 19: Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi stádii I, II a stádii III, IV (Wilcoxonův test).

mRNA	stádium I + II		stádium III + IV		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	15	0 - 0.0003	23	0 - 0.0004	0.8044
TIMP-2/GAPDH	15	0 - 0.0033	23	0 - 0,0028	0.8278
MMP-7/GAPDH	15	0 - 2,8318	23	0 - 1,6036	0.7167
TIMP-1/GAPDH	15	1,4426 - 17,5642	23	0,0522 - 5,3530	0.4083

V tabulce 20 jsou hodnoty hladin exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 a statistické významnosti vzorků kolorektálního karcinomu pacientů diagnózou karcinomu kolonu (dg. C18) v.s. pacienti s diagnózou karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C19 a C20). V hladinách exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 jsme rozdíl mezi vzorky pacientů diagnózy C18 v.s. C19 a C20 nezaznamenali ($p < 0.2949$, $p < 0.2473$, $p < 0.7689$, $p < 0.3745$).

Tabulka 20: Hodnoty hladin exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 u vzorku kolorektálního karcinomu pacientů diagnózou karcinomu kolonu, karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C18, C19, C20) (Wilcoxonův test).

mRNA	diagnóza C18		diagnóza C19 + C20		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
MMP-2	17	0 - 0.0015	20	0 - 0.0002	0.2949
TIMP-2	17	0 - 0.0005	20	0 - 0.0101	0.2473
MMP-7	17	0 - 6.1422	20	0 - 2.9156	0.7689
TIMP-1	17	0.1712 - 0.2644	20	0.0681 - 10.3096	0.3745

5.2.3. Vztah exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 k vývoji nádorového onemocnění

Hladina exprese mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 ve vztahu k výskytu vzdálených metastáz (bez ohledu na lokalizaci) během 5-ti letého sledování pacientů s kolorektálním karcinomem, v průběhu dispenzární péče, je uvedena v tabulce 21.

Tabulka 21: Hladina exprese mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 ve vztahu k výskytu vzdálených metastáz (bez ohledu na lokalizaci) během 5 letého sledování pacientů s kolorektálním karcinomem (Wilcoxonův test).

mRNA	meta přítomny		meta nepřítomny		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
MMP-2	16	0 - 0.0008	22	0 - 0.0003	0.8317
TIMP-2	16	0 - 0.0066	22	0 - 0.0028	0.8415
MMP-7	16	0 - 4.6990	22	0 - 2.8319	0.9165
TIMP-1	16	0.0681 - 6.0113	22	1.2527 - 26.2166	0.5099

Přítomnosti mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 ve vztahu k výskytu vzdálených metastáz (bez ohledu na lokalizaci) během 5 letého sledování pacientů s kolorektálním karcinomem, v průběhu dispenzární péče, je uvedena v tabulce 22. Jako přítomnost daného genu byla hodnocena exprese > 0 . Hladina exprese genu rovna 0 byla hodnocena jako nepřítomnost daného genu.

Tabulka 22: Přítomnosti mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 ve vztahu k výskytu vzdálených metastáz (bez ohledu na lokalizaci) během 5 letého sledování pacientů s kolorektálním karcinomem (test relativní četnosti).

		MMP-2	TIMP-2	MMP-7	TIMP-1
meta ano	mRNA přítomna	5	8	9	14
	mRNA nepřítomna	10	7	6	1
meta ne	mRNA přítomna	11	13	16	21
	mRNA nepřítomna	12	10	7	2
p - value		0,366	0,8098	0,5286	0,8275

5.2.4. Korelace mezi hladinami exprese mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1

V tabulce 23 jsou uvedeny hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a statistické významnosti mezi hladinami exprese MMP-2 v.s. MMP-7, MMP-2 v.s. TIMP-2, MMP-7 v.s. TIMP-1, TIMP-2 v.s. TIMP-1, MMP-2 v.s. TIMP-1, MMP-7 v.s. TIMP-2. Vzájemná negativní korelace ($r=-0.85$) mezi mRNA MMP-7 a mRNA TIMP-2 byla výrazně signifikantní ($p<0.0001$). Další vzájemné korelace byly statisticky nevýznamné.

Tabulka 23: Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a statistické významnosti mezi hladinami exprese.

nádorová tkáň	Spearmanův korelační koeficient	p - value
MMP-2 X MMP-7	-0.17802	0.5426
MMP-2 X TIMP-2	0.30989	0.2809
MMP-7 X TIMP-1	-0.26154	0.3664
TIMP-2 X TIMP-1	0.16923	0.5630
MMP-2 X TIMP-1	0.28791	0.3182
MMP-7 X TIMP-2	-0.84615	0.0001

5.2.5. Závislost délky bezpříznakového období (DFI) na expresi genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1

Hodnotili jsme závislost délky bezpříznakového období (DFI) na přítomnosti, či nepřítomnosti exprese daného genu. Jako přítomnost exprese daného genu jsme hodnotili exprese jejichž hodnota počtu kopií byla $>$ než 0. Nepřítomnou expresi daného genu jsme hodnotili jako expresi, jejichž hodnota počtu kopií byla $=$ 0. Sledovali jsme 2, 3 a 5-ti leté bezpříznakové období. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 24. Při statistickém hodnocení vlivu přítomnosti exprese genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 nebyl prokázán vliv přítomnosti žádného genu na délku bezpříznakového období, tabulka 24.

Tabulka 24: Závislost délky bezpříznakového období (DFI interval) na přítomnosti, či nepřítomnosti exprese daného genu.

mRNA	DFI interval (roky)	p-Wilcoxon test	p-Log-rank test
MMP-2	2	0.5019	0.6953
	3	0.5019	0.6953
	5	0.5196	0.6268
MMP-7	2	0.9455	0.9632
	3	0.9455	0.9632
	5	0.9197	0.9676
TIMP-1	2	0.6051	0.5168
	3	0.6051	0.5168
	5	0.6525	0.6232
TIMP-2	2	0.5025	0.8763
	3	0.5025	0.8763
	5	0.6580	0.6997

5.2.6. Závislost délky celkového přežití na expresi genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1

Hodnotili jsme závislost délky celkového přežití (OS) na přítomnosti, či nepřítomnosti exprese daného genu. Jako přítomnost exprese daného genu jsme hodnotili exprese jejichž hodnota počtu kopií byla $>$ než 0. Nepřítomnou expresi daného genu jsme hodnotili jako expresi, jejichž hodnota počtu kopií byla $=$ 0. Sledovali jsme 2, 3 a 5-ti leté bezpříznakové období. Při statistickém hodnocení vlivu přítomnosti exprese genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 nebyl prokázán vliv přítomnosti žádného genu na délku celkového přežití, tabulka 25.

Tabulka 25: Závislost délky celkového přežití (OS) na přítomnosti, či nepřítomnosti exprese daného genu.

mRNA	OS interval (roky)	p-Wilcoxon test	p-Log-rank test
MMP-2	2	0.6603	0.8443
	3	0.6475	0.8089
	5	0.6706	0.9804
MMP-7	2	0.7410	0.6642
	3	0.9553	0.9564
	5	0.8703	0.8814
TIMP-1	2	0.7278	0.8552
	3	0.6482	0.7412
	5	0.9527	0.6813
TIMP-2	2	0.6930	0.6548
	3	0.9568	0.9859
	5	0.9303	0.9815

5.3. Exprese mRNA TS, TP a DPD u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu

5.3.1. Hodnoty exprese genů TS, TP a DPD v závislosti na typu kolorektální tkáně

V tabulka 26 jsou hladiny exprese mRNA TS, TP a DPD a jejich rozdíly mezi normální tkání (skupina NORM) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM). Nezaznamenali jsme rozdíl v hladinách exprese mRNA TS, TP a DPD mezi nádorovou maligní tkání (skupina TUM) a normální tkání (skupina NORM), ($p < 0.0978$, $p < 0.4046$, $p < 0.5403$).

Tabulka 26: Hladiny specifických mRNA kopií TS, TP a DPD. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi nádorovou maligní tkání a normální tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkáň		nádorová tkáň		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	12	2.2600 - 41.1150	33	9.0000 - 62.6000	0.0978
TP	9	0.2700 - 24.2900	30	1.2900 - 19.5900	0.4046
DPD	1	4.1800 - 4.1800	16	3.0450 - 39.4350	0.5403

Hladiny exprese mRNA TS, TP a DPD a jejich rozdíly mezi tkání benigního onemocnění (skupina BENIGN) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM) jsou v tabulce 27. Nezaznamenali jsme rozdíl v hladinách exprese mRNA TS, TP a DPD mezi tkání benigního onemocnění (skupina BENIGN) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM) ($p < 0.7174$, $p < 0.2028$, $p < 0.0935$).

Tabulka 27: Relativní hladiny specifických mRNA kopií TS, TP a DPD. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi benigní tkání a maligní nádorovou tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	tkáň benigního onemocnění		nádorová tkáň		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	8	9.8200 - 151.8750	33	9.0000 - 62.6000	0.7174
TP	6	3.3200 - 65.4300	30	1.2900 - 19.5900	0.2028
DPD	3	12.7600 - 6390.00	16	3.0450 - 39.4350	0.0935

V tabulce 28 jsou hodnoty exprese mRNA TS, TP a DPD a jejich porovnání mezi normální tkání (skupina NORM) a benigní tkání (skupina BENIGN). Protože jsme nenašli rozdíly v úrovni exprese genů TS, TP a DPD mezi skupinami NORM a BENIGN ($p < 0.2170$, $p < 0.0990$, $p < 0.1797$) spojili jsme tyto tkáně do jedné skupiny, která umožňuje sledovat rozdíly mezi maligní tkání a tkání bez maligního postižení.

Tabulka 28: Relativní hladiny specifických mRNA kopií TS, TP, DPD a CEA. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi normální tkání a benigní tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkáň		tkáň benigního onemocnění		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	12	2.2600 - 41.1150	8	9.8200 - 151.8750	0.2170
TP	9	0.2700 - 24.2900	6	3.3200 - 65.4300	0.0990
DPD	1	4.1800 - 4.1800	3	12.7600 - 6390.00	0.1797

Hladiny relativní exprese mRNA TS, TP a DPD a jejich rozdíly mezi nemaligní tkání (skupina NORM + skupina BENIGN) nádorovou maligní tkání (skupina TUM) jsou v tabulce 29. Nenašli jsme rozdíly v úrovni exprese genů TS, TP a DPD mezi skupinami skupina NORM + skupina BENIGN a skupinou TUM ($p < 0.3262$, $p < 0.9042$, $p < 0.2568$).

Tabulka 29: Relativní hladiny specifických mRNA kopií TS, TP a DPD. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi nemaligní nádorovou tkání a maligní tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	zdravá tkáň + benigní onemocnění		nádorová tkáň		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	20	9.0000 - 62.60000	33	9.0000 - 62.6000	0.3262
TP	15	1.2900 - 19.5900	30	1.2900 - 19.5900	0.9042
DPD	4	3.0450 - 39.4350	16	3.0450 - 39.4350	0.2568

5.3.2. Hodnoty exprese genů TS, TP a DPD v závislosti na stádiu onemocnění

V tabulce 30 jsou hodnoty hladin exprese mRNA TS, TP, DPD a CEA u vzorků kolorektálního karcinomu pacientů stádií I, II v.s. III, IV a statistické významnosti. Nezaznamenali jsme rozdíl v hladina exprese mRNA TS, TP, DPD a CEA mezi vzorky pacientů stádií I, II a III, IV, ($p < 0.7066$, $p < 0.9307$, $p < 0.3335$).

Tabulka 30: Hladiny exprese mRNA TS, TP, DPD a CEA u vzorku kolorektálního karcinomu pacientů stádií I, II a III, IV (Wilcoxonův test).

mRNA	stádium I + II		stádium III + IV		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	14	11,31 - 133,000	18	7.1600 - 62.6000	0.7066
TP	13	1,74 - 19,59	16	0.9150 - 20.3250	0.9307
DPD	9	4,7 - 59,40000	6	1.63 - 18.9000	0.3335

Hodnoty hladin exprese mRNA TS, TP a DPD u vzorku kolorektálního karcinomu pacientů stádií I, II, III v.s. IV jsou v tabulce 31. Také jsme nezaznamenali rozdíl v hladina exprese mRNA TS, TP a DPD mezi vzorky pacientů stádií I, II a III, IV, ($p < 0.7396$, $p < 0.8656$, $p < 0.4405$).

Tabulka 31: Hladiny exprese mRNA TS, TP a DPD u vzorků kolorektálního karcinomu pacientů stádií I, II, III v.s. IV (Wilcoxonův test).

mRNA	stádium I + II + III		stádium IV		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	23	6.3600 - 133.0000	9	9.9800 - 48.8100	0.7396
TP	21	1.3100 - 19.5900	8	0.9150 - 19.2450	0.8656
DPD	12	3.3750 - 39.1500	3	0.0400 - 19.4700	0.4405

V tabulce 32 jsou hodnoty hladin exprese mRNA TS, TP a DPD a statistické významnosti vzorků kolorektálního karcinomu pacientů diagnózou karcinomu kolonu (dg. C18) v.s. pacienti s diagnózou karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C19 a C20). Zaznamenali jsme hraničně signifikantní rozdíl ($p < 0.0525$) v expresi mRNA TS. V hladinách exprese mRNA TP a DPD jsme rozdíl mezi vzorky pacientů C18 v.s. C19 a C20 nezaznamenali ($p < 1.0000$, $p < 0.6916$), tabulka 32.

Tabulka 32: Hodnoty hladin exprese mRNA TS, TP a DPD u vzorku kolorektálního karcinomu pacientů diagnózou karcinomu kolonu, karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C18, C19, C20) (Wilcoxonův test).

mRNA	diagnóza C18		diagnóza C19 + C20		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	16	22.8250 - 131.8000	16	5.4600 - 42.2700	0.0525
TP	15	1.3100 - 16.7000	14	0.5400 - 23.9500	1.0000
DPD	8	4.3700 - 36.1000	7	1.6600 - 19.4700	0.6916

5.3.3. Závislost délky bezpříznakového období (DFI) na expresi genů TS, TP a DPD

Hodnotili jsme závislost hladiny exprese genů TS, TP a DPD na bezpříznakového období (DFI). Sledovali jsme 7 leté období. Při statistickém hodnocení vlivu exprese genů TS, TP a DPD nebyla prokázána statisticky signifikantní korelace mezi expresí těchto genu a bezpříznakovým obdobím, tabulka 33.

Tabulka 33: Závislost délky bezpříznakového období na hladině exprese daného genu.

mRNA	DFI (roky)	p-Wilcoxon test	p-Log-rank test
TS	7	0,5284	0,5610
TP	7	0,2192	0,1308
DPD	7	0,8510	0,9599

5.3.4. Závislost délky celkového přežití na expresi genů TS, TP a DPD

Hodnotili jsme závislost hladiny exprese genů TS, TP a DPD na celkovém přežití (OS). Sledovali jsme 7 leté období. Při statistickém hodnocení vlivu exprese genů TS, TP a DPD nebyla prokázána statisticky signifikantní korelace mezi expresí těchto genu celkovým přežitím, tabulka 34.

Tabulka 34: Závislost délky celkového přežití (OS) na hladině exprese daného genu.

mRNA	OS interval (roky)	p-Wilcoxon test	p-Log-rank test
TS	7	0,9065	0,5785
TP	7	0,1010	0,0803
DPD	7	0,4087	0,3251

5.3.5. Vzájemná závislost exprese DPD, TS a TP

V tabulce 35 jsou uvedeny hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a statistické významnosti mezi hladinami exprese TS v.s. DPD, TP v.s. DPD a TP v.s. TS. Tyto korelace jsme hodnotili u maligní nádorové tkáně. Vzájemná hraničně

signifikantní, u maligní tkáně, byla korelace mezi expresí mRNA TS a mRNA DPD ($p < 0.057$). Další vzájemné korelace byly statisticky nevýznamné.

Tabulka 35: Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a statistické významnosti mezi hladinami exprese TS, TP a DPD u maligní tkáně kolonu a rekta.

nádorová tkáň	Spearmanův korelační koeficient	p - value
TS X DPD	0.5000	0.0577
TP X DPD	-0.1447	0.6709
TP X TS	0.0561	0.7723

5.4. Výsledky stanovení K-ras mutace kodonu 12 u nádorové benigní, maligní a normální kolorektální tkáně kolonu a rekta

V tabulce 36 jsou výsledky stanovení přítomnosti K-ras mutace kodonu 12 u nádorové benigní, maligní a normální kolorektální tkáně kolonu a rekta. Mutaci kodonu 12 jsme detekovali v 21% (8/38) vzorků kolorektálního karcinomu a to v heterozygotním stavu, v 9% (1/11) skupiny benigních onemocnění (jednalo se o vzorek tkáně Crohnovy choroby), také v heterozygotním stavu. Mutace nebyla detekována v normální tkáni.

Tabulka 36: Výsledky stanovení přítomnosti K-ras mutace kodonu 12 u nádorové benigní, maligní a normální kolorektální tkáně kolonu a rekta

	homozygot GGT (zdravá alela)	heterozygot
nádorová tkáň	30	8
zdravá tkáň	19	0
tkáň benigního onemocnění	10	1

V tabulce 37 je ukázáno rozdělení zastoupení mutace kodonu 12 K-ras onkogenu podle stádia onemocnění. U vzorků I. stádia mutace nalezena nebyla, u vzorků II. Stádia byla nalezena u 5 vzorku, u vzorku kolorektálního karcinomu II. stádia byla nalezena u 3 vzorku. A u vzorků IV. stádia nalezena nebyla.

Tabulka 37: Rozdělení zastoupení mutace kodonu 12 K-ras onkogenu podle stádia onemocnění

stage	nádorová tkáň (n=38) heterozygoti pro K-ras kodon 12
I	0 (n=2)
II	5 (n=14)
III	3 (n=11)
IV	0 (n=11)

6. Diskuse

6.1. Sledování exprese genů metodou kvantitativní RT PCR

Incidence a mortalita na kolorektální karcinom je v České republice jedna z nejvyšších na světě. Jeden z důvodů, proč více než 50% kolorektálních karcinomů je diagnostikováno v pokročilém stádiu (stage III a IV) je jejich pozdní diagnostika [97]. Tato situace odpovídá zastoupení pacientů v našich skupinách. III. a IV. stádium je zastoupeno 58% tkáňových vzorků od pacientů s kolorektálním karcinomem (22 z 38 pacientů).

Kromě prevence, snaha o snížení incidence a mortality na kolorektální karcinom, předpokládá ulubší pochopením etiopatogenoze tohoto onemocnění. Na jeho podkladě vývoj diagnostických vyšetření, která by včasnou diagnózou a zpřesněním prognózy, tento stav pomohla zvrátit. Jedním z takových vyšetření by mohlo být určení exprese genů, jejichž produkty se podílejí na nádorovém růstu a genů účastnících se metabolismu pyrimidinů. Takovými geny jsou také matrixové metaloproteinázy (MMPs) a jejich inhibitory (TIMPs) [98] a dále se jedná o geny účastnící se katabolismu fluorovaných pyrimidinů TS, TP a DPD [45].

Stanovení MMP-2, MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 jako proteinů v séru a tkáni nebo jako mRNA ve tkáni a lymfatických uzlinách a jejich korelace se stádiem choroby, byla publikována v řadě prací, výsledky však nejsou jednoznačné [99, 100, 101, 102, 103, 104]. My jsme použili pro stanovení exprese genů a její porovnání u nádorové a normální tkáně kolonu a rekta a korelaci s klinickým stavem onemocnění, detekci specifické mRNA. Tu jsme stanovovali nejcitlivější metodou - kvantitativní RT PCR.

6.2. Exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620

Pro stanovení exprese u nádorových linií HT29, SW480 a SW620 jsme se rozhodli ze dvou důvodů. Na základě literárních údajů jsme expresi matrixových metaloproteináz a jejich inhibitorů buňkami nádorových liniích kolorektálního karcinomu předpokládali [105]. RNA izolovanou z těchto linií jsme proto použili jako zdroj mRNA genů MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2. Tím jsme získali amplikony těchto genů, které jsme použili pro vytvoření standard genů MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2. Standardy jsou nutné pro kvantitativní stanovení exprese (kvantitativní PCR).

Dále jsme chtěli zjistit, které z těchto genů a v jakém množství jsou u jednotlivých linií exprimovány. Stejně jako Hewitt et al. jsme detekovali expresi TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií SW480 a SW620 [106]. Hewitt et al. detekoval zvýšenou hladinu TIMP-1 a sníženou hladinu TIMP-2 u linie SW620 oproti linii SW480, stanovení však provedl z kultivačního média. Takovéto rozdíly exprese jsme nezaznamenali (úroveň několika řádů). Autoři také uvádějí, že tyto výsledky nekorelují se stanovením, které provedli z buněčných lysátů. To ukazuje, že nelze zaměňovat a zcela srovnávat exprese metaloproteináz a jejich inhibitorů na úrovni nitrobuněčných hladin a hladin produkovaných extracelulárně. Dále jsme detekovali vysokou hladinu exprese MMP-7 u linie HT-29. Exprese je o 2-3 řády vyšší než u linií SW480 a SW620.

Vzhledem k tomu, že linie HT-29 je nádorovou linií grade 2, SW480 a SW620 grade 4, lze usuzovat, že exprese MMP-7 se uplatňuje v časnějších stádiích kancerogeneze. Tento závěr uvádí ve své práci také Kawabata et al. [107], který také detekoval vysoké hladiny MMP-7 u linie HT-29 oproti jiným liniím.

Kawabata et al detekovali u linie HT-29 nízkou hladinu exprese MMP-2, my jsme ji však nezaznamenali. Expresi mRNA MMP-2 jsme však detekovali u linií SW480 a SW620. Byla však na té nejnižší možné úrovni (0,0000016; 0,0000002). Mc Donnell et al. ji u linií SW480 a SW620 nezaznamenali [105]. Pro detekci použili metody Western blot a zymografy, detekovali tudíž protein.

Stanovení exprese mRNA u linií HT-29, SW480 a SW620 jsme vyhodnotili jak relativně (stanovovaný gen/GAPDH), tak absolutně (počet kopií cDNA/ 1 buňka). Máme tak možnost porovnat, jestli se tato hodnocení liší. Poměry mezi expresí mRNA jednotlivých genů a mezi jednotlivými nádorovými liniemi zůstávají přibližně zachovány. Můžeme říci, že stanovení exprese absolutně a relativně je u nádorových linií ekvivalentní.

6.3. Exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu

6.3.1. Porovnání exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 v kolorektální tkáni

Zjistili jsme, že hladiny exprese specifické mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 jsou signifikantně vyšší v kolorektální nádorové maligní tkáni než v normální kolorektální tkáni. Pozorování zvýšené exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 je v souladu s výsledky Murashige et al. a Collins et al., kteří popsali zvýšenou expresi mRNA MMP-2 u kolorektální nádorové tkáně a korelaci s Dukes' Stages [39,108]. Baker et al. a Murashige et al. popsali, že hladina mRNA TIMP-1, MMP-2 a MMP-9

byla statisticky signifikantně vyšší u primární nádorové kolorektální tkáně, než u její přilehlé normální tkáně [38,39]. Naproti tomu Tutton et al. nezjistili statisticky signifikantní změny v expresi mRNA MMP-2 mezi normální tkání a nádorovou v jakémkoliv stádiu onemocnění, tento výsledek je však ojedinělý [40]. Zaznamenali jsme statisticky signifikantní zvýšení hladiny exprese mRNA MMP-7 u kolorektální maligní tkáně oproti normální tkáni, podobně Brabletz et al. zaznamenali, že MMP-7 je overexprimována u 80% lidských kolorektálních nádorů [109]. Roeb et al. také detekovali zvýšenou expresi mRNA MMP-7 v kolorektální nádorové tkáni [103].

Baker et al. pozorovali zvýšení hladiny exprese mRNA TIMP-2 u normální kolorektální tkáně oproti nádorové [38]. My jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2 mezi kolorektální nádorovou maligní a nemaligní tkání. Ale při porovnání kolorektální nádorové maligní tkáně a normální kolorektální tkáně, jsme naopak zjistili zvýšenou expresi TIMP-2 u nádorové tkáně. Také Moran et al. zaznamenal signifikantně nižší hladinu mRNA TIMP-2 u nádorových vzorků [100].

Pomocí vhodných protilátek by mohlo být možné aktivitu matrixových metaloproteináz inhibovat, což by mohlo mít na nádorovou tkáň a její okolí léčebný efekt. Klinicky se již některé preparáty testují (Bay 12-9566 /fa Bayer/, BB94 /fa British Biotechnologi/).

6.3.2. Korelace exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 s klinickým stavem onemocnění

Dále jsme porovnávali hladinu exprese mRNA nebo přítomnost mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 and TIMP-1 s klinickým stavem nádorového onemocnění.

Zjistili jsme, že vyššímu stádiu onemocnění odpovídá vyšší hodnota mediánu poměru MMP-2/TIMP-2 (median stádium II: 0.29, stádium III: 0.69, stádium IV: 2.71). Collins et al. popsali, že poměr MMP-2/TIMP-2 byl vyšší u nádorové kolorektální tkáně než u normální tkáně [108]. Ornstein pozoroval, že poměr TIMP-2/MMP-2 byl dvakrát menší a poměr TIMP-2/MT1-MMP byl 1.5-krát menší u nádorové tkáně ve srovnání s normální mukózou. Na základě těchto výsledků se domníváme, že rovnováha mezi aktivací a inhibicí MMP-2 je u nádorů tlustého střeva zvýšená směrem k aktivaci MMP-2 [110, 111].

Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi stádii I, II versus III, IV. Také jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi

pacienty s lokalizací nádoru v tlustém střevě a mezi lokalizací nádoru v rektosigmoidálním spojení a rektu. Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 a jejím vztahu k výskytu distálních metastáz (nehladě na lokalizaci) během 5 letého follow-up pacientů s chirurgicky resekevaným kolorektálním karcinomem.

Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní vliv v přítomnosti exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 na délku bezpříznakového období (DFI). Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní vliv v přítomnosti exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 na délku celkového přežití (OS). Podobné statistické hodnocení exprese publikovali Heslin et al., kteří nezaznamenali korelaci mezi velikostí nádorového postižení nebo AJCC stádiem u karcinomů a expresí mRNA MMP-2, MMP-7 a MMP-9, kterou stanovili qRT-PCR [112]. Také jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíl mezi expresí mRNA MMP-7 v rectu a tlustém střevě. Tyto výsledky se shodují s výsledky Tutton et al., kteří nezaznamenali signifikantní změny v expresi mRNA MMP-2 mezi normální tkání a kolorektální v jakémkoli stádiu onemocnění [40]. Tyto výsledky jsou však v protikladu s výsledky jiných laboratoří. Sis et al. publikoval, že exprese MMP-2 koreluje s postižením lymfatických uzlin a stádiem onemocnění, ale nenašel statisticky signifikantní vztah mezi expresí MMP-2 a celkovým přežitím [113]. Jung et al. publikovali, že upregulace TIMP-2 pozitivně koreluje s invazivitou do přilehlých lymfatických uzlin a zvýšená exprese TIMP-2 koreluje s postižením lymfatických uzlin v submukoze [114]. Použil však imunohistochemickou metodu detekce. Použitím imunohistochemického stanovení, Joo et al. zjistil, že silná reaktivita TIMP-1 ve stromálních buňkách koreluje s vyšším stádiem a přítomností metastáz v lymfatických uzlinách [115]. Moran et al. našel statisticky signifikantní asociaci mezi nízkou hladinou TIMP-1 a špatnou prognózou pacientů [116].

Domníváme se, že skutečnost, že jsme nezaznamenali statisticky významné korelace exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 mRNA se stádiem onemocnění CRC může souviset s celkovým přístupem ke kvantifikaci exprese genů. Z té vyplývá, že exprese proteáz se stanovuje z jednotkového množství tkáně (100mg) a pro růst a invazivitu celého tumoru může být důležité celkové množství exprimovaných proteáz, které je dáno celkovou velikostí nádoru.

Dále je třeba vzít také v úvahu, že hlavní funkcí MMPs je sice přeměna ECM, ale jednotlivé MMPs mají různé, často protichůdné, funkce během angiogeneze. V současnosti se ukazuje, že MMP-2 a MMP-7 jsou schopny štěpit plazminogen, který

ovlivňuje angiostatin. Ten specificky inhibuje proliferaci endotelových buněk. TIMPs jsou ve tkáních hlavními endogeními regulátory aktivity MMPs, ale TIMPs zastávají i další biologické funkce. TIMP-1 a TIMP-2 mají mitogení aktivitu na řadu buněčných typů, zároveň overexprese těchto inhibitorů tlumí růst nádorových buněk. Tyto biologické aktivity jsou nezávislé na inhibiční aktivitě metaloproteináz. Z uvedeného vyplývá, že exprese těchto genů a jejich vztah ke klinicko-patologickým projevům je komplikovanější, než jsme mysleli a je nutno provést další výzkum.

Výsledky ukazují, že stanovení mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7, TIMP-1 pro určení prognózy kolorektálního karcinomu je sporné. Abnormální exprese těchto genů však může poskytnout užitečný cíl pro novou chemoprevenci a adjuvantní protinádorovou terapii.

6.4. Exprese TS, TP a DPD u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu

Zaznamenali jsme hraničně signifikantní korelaci mezi expresí TS a DPD v nádorové tkáni. Pro terapeutický účinek fluoropyrimidinů se zdá být klíčová vzájemná korelace obou markerů. Při vysoké expresi TS a zároveň vysoké expresi DPD v nádorové tkáni je pravděpodobná neúčinnost léčby fluoropyrimidiny, protože je tento metabolit nejenom rychle syntetizován, ale také rychle odbouráván. Naopak nízká exprese obou markerů predikuje senzitivitu k léčbě fluoropyrimidiny [117]. V námi sledovaném souboru jsme nezaznamenali rozdíl mezi expresí těchto markerů v kontrolní a nádorové tkáni, proto lze předpokládat citlivost k fluoropyrimidinům u většiny námi sledovaných pacientů. Tuto skutečnost ověříme v dalším experimentu.

V našem souboru oba výše uvedené markery nekorelovaly s expresí TP. Rozdíl v expresi TP mezi kontrolní a nádorovou tkání nebyl zaznamenán, stejně jako Zimovjanova et al., kteří nenašli signifikantní rozdíl v expresi TS, TP a DPD mezi nádorovou kolorektální tkání a přílehlou mukózou [45]. Dle jiných autorů však zvýšená exprese TP v nádorových buňkách je z terapeutického hlediska velmi důležitá. Predikuje totiž specifický účinek kapecitabinu, jehož meziprodukty se selektivně metabolizují přímo v nádorových buňkách. Proto expresi TP v nádorové tkáni považují za prediktivní faktor specifického účinku kapecitabinu v nádorové tkáni [118, 119].

Prokázání hraničně signifikantně zvýšené exprese TS u nádorů kolon ve srovnání s tumory rektosigmoidea a rekta může predikovat lepší účinek fluoropyrimidiny a raltitrexedu v této nádorové lokalizaci. Je známo, že vysoké hodnoty TS jsou

negativním prediktivním faktorem rezistence nejen pro tyto léky. Toto zjištění je v souladu s klinickou praxí, kde je raltitrexed v monoterapii používán především u pokročilého karcinomu rekta [120].

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že stanovení TS a DPD by mohlo mít prediktivní význam pro odhad možné odpovědi na cílenou protinádorovou léčbu u kolorektálního karcinomu.

Dále jsme se v námi zkoumaném souboru zabývali možným prognostickým významem stanovení TS, TP a DPD ve vztahu k celkovému přežití pacientů (OS; 5 let) a bezpříznakovým obdobím (DFI; 5 let). V námi sledovaném souboru jsme vztah mezi expresí TS, TP, DPD a celkovým přežitím pacientů a bezpříznakovým obdobím nepotvrdili. V literatuře je popisována zvýšená exprese TS a DPD také jako nezávislý negativní prognostický faktor celkového přežití, bez závislosti na terapii [121]. Dále bylo publikováno několik prací, které potvrzují nejen expresi TP jako nezávislého prognostického faktoru u kolorektálního karcinomu, ale také pozitivní korelaci tohoto markeru se stadiem choroby, gradingem a mírou lymfatické a venózní invaze nádoru [122,123]. Význam zvýšené exprese TP pro prognózu hepatocelulárního karcinomu, karcinomu prsu a dalších nádorů je v odborné literatuře také uváděn [124,125,126].

6.5. Stanovení K-ras mutace kodonu 12 u nádorové benigní, maligní a normální kolorektální tkáně kolonu a rekta

Mutace K-ras onkogenu se v procesu v karcinogeneze kolorektálního karcinomu objevují již v časných stádi, mezi časným adenomem a intermediálním adenomem. Bylo zjištěno, že mutace K-ras onkogenu jsou nejčastěji lokalizovány v kodonu 12, 13 a kodonu 69. Protože se mutace K-ras onkogenu objevují již v časných stádiích onkogeneze, jsou spolu s dalšími mutacemi (např. některé mutace APC genu, markery MSI) vhodné pro časnou diagnostiku tohoto onemocnění, např. ze stolice. Protože se naše laboratoř chtěla zaměřit také tímto směrem, rozhodli jsme se metodiku stanovení mutace kodonu 12, K-ras onkogenu, na vzorcích, u nichž jsme stanovovali exprese genů. Zároveň jsme chtěli ověřit jejich výskyt v tomto souboru vzorků benigní, maligní a normální kolorektální tkáně kolon a rekta. Literární údaje uvádějí, že incidence všech mutací K-ras onkogenu v nádorové tkáni kolonu a rekta je od 33-50% [24,127]. My jsme mutaci kodonu 12 detekovali v 21% (8/38) vzorků kolorektálního karcinomu a to v heterozygotním stavu, v 9% (1/11) skupiny benigních onemocnění (jednalo se o vzorek tkáně Crohnovy choroby), také v heterozygotním stavu. Mutace jsme nedetekovali v normální tkáni.

7. Závěry

Autor disertační práce:

1, Navrhl primery a optimalizoval podmínky provedení kvantitativní PCR pro stanovení exprese genů MMP-7, TIMP-1, MMP-2 a TIMP-2.

2, Zaznamenal přítomnost expresi genů GAPDH, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT-29, SW480 a SW620. Zaznamenal vysokou hladinu exprese MMP-7 u linie HT-29. Exprese je o 2-3 řády vyšší než u linií SW480 a SW620. Expresi mRNA MMP-2 u linie HT-29 nezaznamenal. Expresi mRNA MMP-2 detekoval u linií SW480 a SW620.

3, Zjistil, že stanovení exprese absolutně a relativně je u nádorových linií ekvivalentní.

4, Prokázal signifikantně vyšší expresi mRNA MMP-7, TIMP-1, MMP-2 a TIMP-2 v nádorové tkáni oproti normální tkáni. Lze využít při terapii.

10, Nezaznamenal korelaci přítomnosti exprese genů MMP-7, TIMP-1, MMP-2 a TIMP-2 s celkovým přežitím a DFI.

6, Zjistil, že vyšší stadium nádorového onemocnění odpovídá vyššímu mediánu hodnot poměru MMP-2/TIMP-2.

7, Nezaznamenal rozdíl mezi expresí genů TS, TP a DPD v kontrolní a nádorové tkáni.

8, Zaznamenal hraničně signifikantní zvýšení exprese TS u nádorů kolon ve srovnání s tumory rektosigmoidea a rekta. Toto zjištění lze využít při volbě terapie.

9, Zaznamenal hraničně signifikantní korelaci mezi expresí TS a DPD. Toto zjištění lze využít při volbě terapie.

10, Nezaznamenal korelaci hladiny exprese mRNA TS, TP a DPD s celkovým přežitím a DFI.

8. Citovaná literatura

1. Rejthar A, Vojtěšek B.: *Obecná patologie nádorového růstu*. Praha, Grada 2002.
2. Gartler SM.: Patterns of cellular proliferation in normal and tumor cell populations. *Am J Pathol.* 1977 Mar;86(3):685-92.
3. Jablonska M, a kol.: *Kolorektální karcinom, časná diagnóza a prevence*. Praha, Grada, 2000.
4. Knudson AG Jr.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Apr;68(4):820-3
5. Kaelin WG: Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 1999;21:950-958.
6. Fearon ER, Hamilton S, Vogelstein B: Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987;238:193-197.
7. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton S, et al.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-532.
8. Baker S, Fearon ER, Nigro J, et al.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-221.
9. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al.: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989;342:705-608.
10. Takahashi T, Nau MM, Chibu I, et al.: p53, a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989;246:491-494.
11. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-1238.
12. Srivastava S, Zou Z, Pirolo K, et al.: Germ-line transmission of a mutated p53 gene in cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 1990;348:747-749.
13. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al.: Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 1994;54:1298-1304.
14. Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88: 323-331.
15. Kastan M, Zhan Q, El-Deiry WS, et al.: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992;71:587-598.
16. Scully R, S.F. Anderson SF, and D.M. Chao DM, et al.: BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5605-5610.
17. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Edis A, German P, et al.: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987;328:614-616.
18. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, et al.: Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993;262:1731-1734.
19. Rubinfeld B, Albert I, Profiri E, et al.: Binding of GSK-3 with APC/catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 1996;272:1023-1026.
20. Jarvinen HJ, Peltomaki P: The complex genotype-phenotype relationship in familial adenomatous polyposis. *Eur J Gastroenterology & Hepatology* 2004; 16:5-8.
21. Human Genome Mutation Database: <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>
22. Lee SB, Huang K, Palmer R, et al.: The Wilms' tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* 1999;98:663-673.

23. Slebos RJC, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al.: K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990;323:561-565.
24. Forrester K, C. Almoguera C, and K. Han K, et al.: Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987;327:298-303.
25. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al.: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant K-ras genes. *Cell* 1988;53: 549-554.
26. Rosypal S, Doškář J: Úvod do molekulární biologie, třetí díl. vlastním nákladem, Brno, 1997.
27. Baker EA, Leaper DJ. Profiles of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in intraperitoneal drainage fluid: relationship to wound healing. *Wound Repair Regen.* 2003 Jul-Aug;11(4):268-74.
28. Kugler A.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res.* 1999 Mar-Apr;19(2C):1589-92.
29. Fingleton BM, Heppner Goss KJ, Crawford HC, Matrisian LM.: Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis. *APMIS* 1999; 107: 102-110
30. Stamenkovic I.: Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 415-433.
31. Curran S, Murray GI.: Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer.* 2000 Aug;36(13 Spec No):1621-30.
32. Leeman MF, McKay JA, Murray GI.: Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Oct;55(10):758-62.
33. Rooney PH, Murray GI, Stevenson DA, Haites NE, Cassidy J, McLeod HL.: Comparative genomic hybridization and chromosomal instability in solid tumours. *Br J Cancer.* 1999 May;80(5-6):862-73.
34. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T.: beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol.* 1999 Oct;155(4):1033-8.
35. Leeman MF, Curran S, Murray GI.: New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol.* 2003 Dec;201(4):528-34.
36. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafdie S.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980; 284: 67-8.
37. Sawicki G, Matsuzaki A, Janowska-Wieczorek A.: Expression of the active form of MMP-2 on the surface of leukemic cells accounts for their in vitro invasion. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998;124(5):245-52.
38. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ.: Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg.* 2000 Sep;87(9): 1215-21.
39. Murashige M, Miyahara M, Shiraishi N, Saito T, Kohno K, Kobayashi M.: Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. *Jpn J Clin Oncol.* 1996 Oct;26(5):303-9.
40. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, et al.: Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2003 Nov 20;107(4):541-50.

41. Nagase H, Woessner JF Jr.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999. Jul 30;274(31):21491-4.
42. Goldberg, G.I., Marmer, G. A. Grant, A. Z. Eisen, S. Wilhelm, and C. S. He.: Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989 86: 8207-8211.
43. Kawamata H, Kawai K, Kameyama S, Johnson MD, Stetler-Stevenson WG, Oyasu R.: Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma. *Int J Cancer.* 1995 Nov 27;63(5):680-7.
44. Sobrero A, Guglielmi A, Grossi F, Puglisi F, Aschele C.: Mechanism of action of fluoropyrimidines: relevance to the new developments in colorectal cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 2000, 27 (5 suppl. 10), 72 – 77.
45. Zimovjanova M, Sykora V, Novotny J, Gatek J, Petruzalka L, Holubec L, Pecan L.: Comparative analysis of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in colorectal cancer and surrounding normal tissue. *Neoplasma.* 2005;52(3):208-10.
46. De Vita VT., Vincent T., Hellman S., Rosenberg A: *Cancer of the Colon.* In: *Cancer: Principles & Practice of Oncology.* Lippincott - Raven Publishers 1997, pp. 1144-1182.
47. Klener P. *Chemoterapie.* In: *Klinická onkologie.* Galén, Praha 2002, pp.145-207.
48. van Kuilenburg A.B.P., Haasjes J., Richel D.J. et al.: Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: Identification of new mutations in DPD gene. *Clin Cancer Res* 2000, 6, 4705-4712.
49. Fernandez-Salguero P., Gonzales F.J., Kimura S. et al.: Correlation between catalytic activity and protein content for the polymorphically expressed dihydropyrimidine dehydrogenase in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 1995, 50, 1015-1020.
50. Lu Z., Zhang R., Carpenter J.T. et al.: Decreased dihydropyrimidine dehydrogenase activity in a population of patients with breast cancer: implication for 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 1998, 4, 325-329.
51. Milano G., Etienne M.C., Barberi-Heyob M. et al.: dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency and fluorouracil (5FU)-related toxicity, *Proc. ASCO* 1998, Abst. 858.
52. Milano GT., McLeod H.L.: Can dihydropyrimidine dehydrogenase impact 5-fluorouracil based treatment? *Eur J Cancer* 2000, 36, 37-42.
53. Holubec L, et al.: *Kolorektální karcinom, současné možnosti diagnostiky a léčby.* Praha, Grada, 2004.
54. Novotvary 2002. Praha, ČRÚZIS ČR, 2005
55. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT.: The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum.* 1991 May;34(5):424-5.
56. Kinzler KW, Vogelstein B.: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):159-70.
57. Boland CR, Sato J, Saito K, Carethers JM, Marra G, Laghi L, Chauhan DP.: Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: a review of the current models. *Cancer Detect Prev.* 1998;22(5):377-82.
58. Vogelstein C, Laurue L, Thiery J.P.: Current data on the role of APC protein in the origin of colorectal cancer. *Bull. Cancer,* 84, 1997, s. 1053-60
59. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors.: *Principles and practice of oncology.*

- Philadelphia: Lippincott 2001
60. Klener P, et al.: Vnitřní lékařství. Praha, Galen 1999.
 61. Adam Z, et al.: Obecná onkologie a podpůrná léčba, Praha, 2003.
 62. 5th International Conference on Human Tumor Markers, Stockholm, Sweden, 1988.
 63. Gold P, Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *JExp Med* 1965;122:467-481.
 64. Nishi M, Inazawa J, Inoue K, et al.: Regional chromosomal assignment of carcinoembryonic antigen gene (CEA) to chromosome 19 at band q13.2. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;54:77-81.
 65. Thompson J, Zimmermann W, Osthus-Bugat P, et al.: Long-range chromosomal mapping of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family cluster. *Genomics* 1992;12: 761-772.
 66. Nekulová M, Šimíčková M, Jabor A, Zámečník M, editoři: Encyklopedie laboratorní medicíny 3., SEKK, Praha, 2003.
 67. Hammarstrom S: The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Sem Cancer Biol* 1999;9:67-81.
 68. Fabris C, Faletti E, Pirisi M, Soardo G, Toniuto P, Vituli D, Bertolotti N, Gonano F, Bartoli E: Nonspecific increase of serum carbohydrate antigen CA 19-9 in patients with liver disease associated with increased circulating levels of adhesion molecules, *din Chim Acta* 1995;243:25-33.
 69. Fujita J, Dobashi N, Ohtsuji Y, Ueda Z, Bandoh S, Yamadori I, Takahara J: Detection of large molecular weight cytokeratin 8 as a carrier protein of CA 19-9 in non-small-cell-lung cancer. *BrJ Cancer* 1999; 81:769-773.
 70. Katari RS, Femsten PD, Schlom J: Characterization of the shed form of the human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) from serous effusions of patients with different types of carcinomas. *Cancer Res* 1990;50:4885-4890.
 71. Guadani F, Roselli M, Ferroni P, Spila A, Cavaliere F, Casaldi V, Wapner G, Abbolito MR, Greiner JW, et al.: CA 72-4 serum marker - a new tool in the management of carcinoma patients. *Cancer Invest* 1995; 13:227-238.
 72. Bjorklund B: Tissue polypeptide antigen (TPA): Biology, biochemistry, improved assay methodology, clinical significance in cancer and other conditions, and future outlook. *Antibiot ChemotherWS*;22:16-31.
 73. Černá M.: Expres vybraných genů u kolorektálního karcinomu a jaterních metastáz. Disertační práce 2004. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta Plzeň, 2.interní klinika.
 74. Spyrtos F, Romain S, Rostaing-Puissant B, Daver A, Collona M, DeMartin PM, Bougnox P, Bolla M: Standardization and quality control in the evaluation of proliferation parameters in T1T2, NON1, MO breast cancer: multicentric retrospective study. DNA synthesis enzyme activities. *Bull Cancer (Paris)* 1999;86:678-684.
 75. Broet P, Romain S, Daver A, Ricolleau G, Quillien V, Rallet A, Asselain B, Martin PM, Spyrtos F.: Thymidine kinase as a proliferative marker: clinical relevance in 1,692 primary breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2001;19:2778-87.
 76. Proteomic Forum 2001, International Meeting on Proteome Analysis, Technische Universität München, SRN, 16. - 19. září 2001.
 77. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M.: Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977;265:687-695.

78. Lander ES, et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
79. National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
80. Ramachandran C, Melnick SL: Multidrug resistance in human tumors — molecular diagnosis and clinical significance. *Molecular Diagnosis* 1999;4:81-94.
81. Bustin SA, Dorudi S: Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays. *Molecular Medicine Today* 1998;4:389-396.
82. Holodniy M: Clinical application of reverse transcription -polymerase chain reaction for HIV infection. *Clin Lab Medicine* 1994;14:335-349.
83. *Current Protocols in Molecular Biology*. 1994, 1995 etc.; John Wiley&Sons, Inc.
84. Haškovec S.: *Reverzní a kvantitativní PCR, ÚHK, Praha, 2002.*
85. Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M: Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:255-269.
86. Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-193.
87. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT: Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998;24:954-962.
88. Morris T, Robertson B, Gallagher M: Rapid reverse transcription - PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J Clin Microbiol* 1996;34:2933-2936.
89. Stites D.P. et al.: *Základy imunologie*, Victoria publishing, Praha, 1991.
90. Kausitz, J.: *Radioimunoanalýza v onkologii*. LF UK Plzeň, 1995.
91. Adam Z. et al.: *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, Grada, Praha 2003.
92. Bustin SA.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000 Oct;25(2):169-93.
93. Corbett research: *Protocol for DNA Amplification Detection in Real-Time PCR Using Sybr-green I Intercalating Dye*; 2001.
94. Pesta M, Holubec L Jr, Topolcan O, Cerna M, Rupert K, Holubec LS, Treska V, Kormunda S, Elgrova L, Finek J, Cerny R.: Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res*. 2005 Sep-Oct;25(5):3387-91.
95. Jiang W, Kahn SM, Guillem JG, Lu SH, Weinstein IB. Rapid detection of ras oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal, and gastric cancer. *Oncogene*. 1989 Jul;4(7):923-8.
96. Klener P: Mechanismus účinku látek s protinádorovou účinností. V *Onkologie praktického lékaře*. Praha, Galen 1996;65-105.
97. Holubec L. sen., Pecan L., Holubec L. jr.: Epidemiology of Colorectal Carcinoma. In *Colorectal Carcinoma: Current Possibilities of Diagnosis and Treatment*. Praha: Grada Publishing, 2004, 15-18.
98. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 415-433.

99. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 17;1705(2):69-89.
100. Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, De Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M.: Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2005 Jan;13(1):115-20.
101. Roeb E, Matern S.: Matrix metalloproteinases and colorectal cancer. *Med Klin (Munich)*. 2003 Dec 15;98(12):763-70.
102. Waas ET, Lomme RM, DeGroot J, Wobbles T, Hendriks T.: Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2002 Jun 17;86(12):1876-83.
103. Roeb E, Arndt M, Jansen B, Schumpelick V, Matern S.: Simultaneous determination of matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis*. 2004 Nov;19(6):518-24. Epub 2004 Apr 22.
104. Zucker S, Vacirca J.: Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004 Jan-Jun;23(1-2):101-17.
105. Mc Donnell S, Chaudhry V, Mansilla-Soto J, Zeng ZS, Shu WP, Guillem JG.: Metastatic and non-metastatic colorectal cancer (CRC) cells induce host metalloproteinase production in vivo. *Clin Exp Metastasis*. 1999 Jun;17(4):341-9.
106. Hewitt RE, Brown KE, Corcoran M, Stetler-Stevenson WG.: Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) in a more tumorigenic colon cancer cell line. *J Pathol*. 2000 Dec;192(4):455-9.
107. Kawabata K, Murakami A, Ohigashi H.: Nobiletin, a citrus flavonoid, down-regulates matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) expression in HT-29 human colorectal cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005 Feb;69(2):307-14.
108. Collins HM, Morris TM, Watson SA.: Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer*. 2001 Jun 15;84(12):1664-70.
109. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T.: beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol*. 1999 Oct;155(4):1033-8.
110. Ornstein DL, Cohn KH.: Balance between activation and inhibition of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is altered in colorectal tumors compared to normal colonic epithelium. *Dig Dis Sci*. 2002 Aug;47(8):1821-30.
111. Chan CC, Menges M, Orchowski HD, Orendain N, Pistorius G, et al.: A. Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16:133-140.
112. Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Urist MM.: Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg*. 2001 Jun;233(6):786-92.
113. Sis B, Sagol O, Kupelioglu A, Sokmen S, Terzi C, Fuzun M, Ozer E, Bishop P.: Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, cathepsin D, and tenascin-C expression in colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2004;200(5):379-87.
114. Jung SA, Yang SK, Kim JS, Shim KN, Im SA, Myung SJ, Jung HY, Yu CS, Kim JC, Hong WS, Kim JH, Min YI.: The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and angiogenesis in relation to the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal

- carcinoma Korean J Gastroenterol. 2005 Jun;45(6):401-8.
115. Dig Dis Sci. 2000 Jan;45(1):114-21. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer. Joo YE, Seo KS, Kim HS, Rew JS, Park CS, Kim SJ.
116. Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, De Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M.: Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2005 Jan;13(1):115-20.
117. Grem L., Danenberg KB., Behan K.: Thymidine Kinase, Thymidylate Synthase, and Didydropyrimidine Dehydrogenase Profile of Cell Lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen. *Clinical Cancer Research.* 2001; 7: 999-1009.
118. Eliason JF, Megyeri A.: Potential for predicting toxicity and response of fluoropyrimidines in patients. *Curr Drug Targets.* 2004 May;5(4):383-8.
119. Nishida M. Pharmacological and clinical properties of Xeloda (Capecitabine), a new oral active derivative of fluoropyrimidine. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2003 Dec;122(6):549-53.
120. Farrugia DC, Ford HE, Cunningham D, Danenberg KD, Danenberg PV, Brabender J, McVicar AD, Aherne GW, Hardcastle A, McCarthy K, Jackman AL.: Thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer predicts for response to raltitrexed. *Clin Cancer Res.* 2003 Feb;9(2):792-801.
121. Tebbutt NC, Cattell E, Midgley R, Cunningham D, Kerr D.: Systemic treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002 May;38(7):1000-15.
122. Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Yamada Y, Murata F, Aikou T. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Aug 21;88(16):1110-7.
123. Tokunaga Y, Hosogi H, Hoppou T, Nakagami M, Tokuka A, Ohsumi K.: Prognostic value of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in advanced colorectal cancer after surgery: evaluation with a new monoclonal antibody. *Surgery.* 2002 May;131(5):541-7.
124. Ezaki T, Ikegami T, Maeda T, Yamada T, Ishida T, Hashizume M, Maehara Y.: Prognostic value of thymidine phosphorylase activity in liver tissue adjacent to hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2005 Jun;10(3):171-6.
125. Tominaga T, Toi M, Ohashi Y, Abe O; on behalf of the 5'-BC Study Group. Prognostic and predictive value of thymidine phosphorylase activity in early-stage breast cancer patients. *Clin Breast Cancer.* 2002 Apr;3(1):55-64.
126. Shimada H, Takeda A, Shiratori T, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Kobayashi S, Suzuki T, Ochiai T.: Prognostic significance of serum thymidine phosphorylase concentration in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2002 Apr 1;94(7):1947-54.
127. Ohnishi T, Tomita N, Monden T, Ohue M, Yana I, Takami K, Yamamoto H, Yagyu T, Kikkawa N, Shimano T, Monden M. A detailed analysis of the role of K-ras gene mutation in the progression of colorectal adenoma. *Br J Cancer.* 1997;75(3):341-7.

9. Publikace autora

Publikace:

Pešta M., Holubec L., Černá M., Topolčan O., Fínek J., Holubec L. sen., Treska V., Svobodová Š., Svačina S., Matoušek M., Černý R. Expresse matrixových metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2, MMP-7) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz 1 a 2 (TIMP-1, TIMP-2) u kolorektálního karcinomu měřená kvantitativní RT-PCR XXVIII. Edukační sborník článků, Brněnské onkologické dny, str. 76-78, 2004 ISBN 80-86793-01-X

Černá M., Holubec L., Pešta M., Topolčan O., Černý R. Expresse GAPDH, CEA, CK20 a VEGF v kolorektálního karcinomu, jaterních metastázách a plicním karcinomu měřená kvantitativní RT-PCR XXVIII. Edukační sborník článků, Brněnské onkologické dny, str. 73-76, 2004 ISBN 80-86793-01-X

Chottová Dvořáková M., Pešta M., Švíglerová J., Slavíková J., Kummer W. Experimentální diabetes mellitus a změny signálních systémů neuropeptidů v srdci laboratorního potkana. Plzeňský lék. Sborník 2005 ISBN

Pesta M., Holubec L Jr, Topolcan O, Cerna M, Rupert K, Holubec LS, Treska V, Kormunda S, Elgrova L, Finek J, Cerny R. Quantitative estimation of matrix metaloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metaloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. Anticancer Res. 2005 Sep-Oct;25(5):3387-91. IF

Holubec L Jr, Topolcan O, Finek J, Holdenrieder S, Stieber P, Pesta M., Pikner R, Holubec Sen L, Sutnar A, Liska V, Svobodova S, Visokai V, Kormunda S. Markers of cellular adhesion in diagnosis and therapy control of colorectal carcinoma. Anticancer Res. 2005 May-Jun;25(3A):1597-601. IF

Monika Cerna, Lubos Holubec JR, Martin Pesta, Stanislav Kormunda, Ondrej Topolčan and Radim Cerny Quantitative Estimation of CEA and CK20 Expression in Tumour Tissue of Colorectal Cancor and its Liver Metastases with Reverse Transcription and Real-time PCR Anticancer Res. 2006 Vol. 26 (1). IF

Pesta M.^a, Topolcan O.^{a,b}, Holubec L.jr.^b, Rupert K.^c, Cerna M.^a, Holubec L.sen., Treska V.^c, Fínek J.^d, and Cerny R.^e. Clinicopathological assessment quantitative estimation of MMP-2, MMP-7, TIMP-1 and TIMP-2 in Colorectal Carcinoma Tissue Samples Anticancer Research IF, přijato 2006

Spoluautor kapitoly v knize:

Luboš Holubec, sen., a kolektiv: Kolorektální karcinom, Laboratorní diagnostika kolorektálního karcinomu (L. Holubec, O. Topolčan, M. Pešta) Grada 2004 Praha, str. 65- 75, ISBN 80-247-0636-9

Publikovaná abstrakta konferencí a sjezdů:

Martin Pešta¹, Luboš Holubec Jr.², Ondřej Topolčan², and Radim Černý³ EXPRESSION OF MATRIX METALOPROTEINASES (MMPs) AND THEIR TISSUE INHIBITORS (TIMP) IN COLORECTAL CARCINOMA Central Radioisotopic Laboratory¹, 2nd Clinic of Medicine² and Department of Biochemistry³ Charles University, Faculty of Medicine in Pilsen , Czech Republic

Biomarkers and environment, Vol. 5, No. 3,4 2002, Abstracts CECHTUMA 2003, 103

Pešta M., Holubec L. Jr., Topolčan O., Fišerová A., Černý R. Stanovení matrixových metaloproteináz 2 a 9 (MMP 2, MMP 9) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz 2 (TIMP 2) ve tkáňových vzorcích kolorektálního karcinomu a v buňkách buněčné linie TH 29 metodou Real –Time RT PCR
Poster: Sjezd Společnosti lékařské genetiky 2003

M. Pešta, L. Holubec Jr., O. Topolčan, M. Cerna and R. Cerny
MATRIX METALOPROTEINASES 2 (MMP 2) ASSESSMENT WITH COLORECTAL CARCINOMA PATIENTS Medical Faculty of Charles University, Plzen, and Faculty Hospital in Plzen, Czech Republic TumorBiology, Vol. 24, 1, 57, 2003

Abstracts The XXXIst Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM 2003

M. Pešta, L. Holubec jr., O. Topolčan J. Fínek, K. Rupert, M. Černá and R. Černý
CODON 12 K-RAS MUTATIONS IN TISSUE SAMPLES FROM PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER Charles University and Faculty Hospital, Pilsen, Czech Republic, CECHTUMA 2004, Praha

Pešta M., Holubec L. jr., Topolčan O., Fínek J., Rupert K., Černá M., Černý R.
EXPRESSION OF mRNA OF MMP-2 AND MMP-7 AND THEIR TISSUE INHIBITORS
TIMP-1 AND TIMP-2 IN COLORECTAL CARCINOMA PATIENTS
Charles University and Faculty Hospital, Pilsen, Czech Republic, CECHTUMA 2004, Praha

PEŠTA, M.; HOLUBEC, L. jr.; TOPOLČAN, O.; RUPERT, K.; ČERNÁ, M.; LUBOŠ HOLUBEC, L. SEN.; TREŠKA, V.; FÍNEK, J.; ČERNÝ, R. Kvantitativní stanovení matrix metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2 a MMP-7) a jejich inhibitorů (TIMP-1 a TIMP-2) u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc 2005

Martin Pešta, Ondřej Topolčan, Lubos Holubec jr., Karel Rupert, Monika Cerna, Lubos Holubec sen., Vladislav Treska, Jindrich Finek and Radim Cerny
Quantitative Estimation of Matrix Metaloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and Tissue Inhibitors of Matrix Metaloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in Colorectal Carcinoma Tissue Samples Hamburg Symposium on Tumor Markers, 2005

Přednášky:

Martin Pešta, Luboš Holubec Jr., Ondřej Topolčan, Monika Černá, Radim Černý
Nádorové metaloproteinázy: exprese tkáňových MMPs u kolorektálního karcinomu
Charles University, Faculty of Medicine in Pilsen , Czech Republic
Workshop: Proteázy a antiproteázy II. , Plzeň 19.-26. September 2003

Pešta M., Holubec L., Topolčan O., Svobodova S., Finek J., Ludviková M., Holubec l.sen., Treska V., Svacina S., Cerna M. and Cerny R. Matrix Metaloproteinase 2 (MMP-2) and Tissue Inhibitor of Matrix Metaloproteinase 2 (TIMP-2) Assessment in

Colorectal Carcinoma Patients using Real Time PCR. Charles University - Medical Faculty and Faculty Hospital Pilsen, Czech Republic
1st Medical Faculty, Charles University Prague
Cancer Biology for the Clinician, Luxembourg, 14-15 November 2003

M. Pešta Expresse matrixových metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2, MMP-7) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz 1 a 2 (TIMP-1, TIMP-2) u kolorektálního karcinomu měřená kvantitativní RT-PCR
(2. ročník kombinované formy DSP)
Školitelé: Prof. MUDr O. Topolčan CSc., Doc. MUDr R. Černý CSc.
II.interní klinika a CRL LF UK v Plzni 2004 SVK

Pešta, M. - Topolčan, O.- Holubec, L. Jr.,- Rupert, K.- Třeská, V.: Význam stanovení cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi, XXVI. Imunoanalytické dny, Poděbrady, 3.-5. 4. 2005

Spoluautor přednášek:

O. Mayer Jr, J. Filipovský, M. Pešta, M. Tichá, J. Kučerová: The association between arterial stiffness and of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in population sample 2nd Department of Internal Medicine, Charles University Pilsen, Czech Republic 2004

Chottová Dvořáková, M., Pešta M., Švíglerová, J., Slavíková, J., Kummer, W. Experimentální diabetes mellitus a změny signálních systémů neuropeptidů v srdci laboratorního potkana. Sborník abstrakt „Slavnostní vědecké konference Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni“, 16. (2005)

NOVOTNÝ, J.; TESAŘOVÁ, P.; PEŠTA, M.; HOLUBEC, L. Četnost Leydenské mutace, protrombinové mutace a mutace v MTHFR genu v populaci 470 pacientek s karcinomem prsu. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc 2005

NOVOTNÝ, J.; SÝKORA, V.; STRNAD, R.; PEŠTA, M.; TOMANCOVA, V.; ZIMOVJANOVA, M. Vliv 48 hodinové kontinuální infuze 5-fluorouracilu na expresi dihydropyrimidin-dehydrogenázy and thymidinofosforylázy. (10', 3' diskuze) Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc 2005

10. Přílohy

.....Soupravy použité pro stanovení exprese genů TS, TP a DPD.

Souhlasím s půjčováním své disertace.

V Plzni 26.7.2006

Mgr. Martin Pešta