

# KLINICKÁ ONKOLOGIE

## RECAMO2020:

...prostřednictvím výzkumu rakoviny k aplikované molekulární onkologii...

## RECAMO2020:

...through Cancer Research towards Applied Molecular Oncology...

Michalová E., Hrstka R. et al





## Editorial

Nádorová onemocnění se stále vyznačují vysokou úmrtností. K většině úmrtí dochází v důsledku pozdní diagnózy a nedostupnosti specifické léčby. U velkého počtu pacientů je nicméně nádorové onemocnění stále diagnostikováno až v pokročilém stadiu, protože v klinické praxi je k dispozici zatím pouze několik dostatečně citlivých a specifických biomarkerů. Možným řešením tohoto problému je identifikace biomarkerů využitelných pro časnou diagnózu onemocnění a pro výběr optimální léčebné strategie. Hlavním problémem je příliš zdlouhavý proces převádění poznatků základního výzkumu na účinné léky a diagnostické postupy v praxi.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie (RECAMO) bylo založeno Masarykovým onkologickým ústavem, dlouhodobým členem OECI (Organisation of European Cancer Institutes). Masarykův onkologický ústav je institucí zaujímající již po pět desetiletí přední místo v komplexní léčbě rakoviny a ve výzkumu tohoto onemocnění. V současné době představuje největší komplexní onkologické centrum v České republice. RECAMO od svého vzniku na konci roku 2010 vytvořilo multidisciplinární skupinu výzkumných pracovníků a lékařských specialistů za účelem klinické aplikace informací získaných studiem definovaných oblastí nádorového výzkumu. V roce 2015 projekt RECAMO přešel v nový navazující projekt RECAMO2020 (č. projektu LO1413) podpořený Národním programem udržitelnosti I (NPU I) o celkové finanční podpoře ve výši 114,47 mil. Kč, s čerpáním poskytnuté podpory ze státního rozpočtu do 31. 12. 2019.

Hlavním cílem projektu RECAMO2020 je další rozvoj udržitelného, inovativního a vysoce kvalitního původního výzkumu v oblasti molekulární onkologie, jehož výsledky budou aplikovány v oblasti nově se rozvíjející personalizované onkologické léčby. Projekt je zaměřen na moderní onkologický výzkum prováděný s využitím nově vybudované výzkumné infrastruktury RECAMO ([www.recamo.cz](http://www.recamo.cz)). Cílem projektu je získat vysoce kvalitní výsledky v rámci medicínského výzkumu a zpřístupnit je pro praktické využití v oblasti komplexní onkologické péče.

V souhrnu je projekt RECAMO2020 navržen tak, aby podpořil a) transparentní onkologický výzkum zaměřený na kvalitu s potenciálem praktické aplikace, b) součinnost výzkumných infrastruktur, jako jsou banky biologického materiálu BBMRI a akademická klinická hodnocení CZECRIN s výzkumnými aktivitami zaměřenými na řešení konkrétních problémů a c) mezinárodní konkurenceschopnost centra RECAMO, které již nyní přitahuje zájem značného množství domácích i zahraničních vědeckých pracovníků nejvyšší úrovně.

*doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D.*  
výkonný ředitel RECAMO

*RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc.*  
vědecký ředitel RECAMO



# Obsah | Contents

<b>Editorial</b>	<b>4S3</b>
<b>Nádorové buňky jako dynamický systém – molekulární a fenotypové změny v průběhu vzniku, progresu a šíření nádoru</b>	<b>4S6</b>
Cancer Cells as Dynamic System – Molecular and Phenotypic Changes During Tumor Formation, Progression and Dissemination Sommerová L., Ondroušková E., Hrstka R.	
<b>Vícestupňový proces vzniku vzdálených metastáz u karcinomů</b>	<b>4S12</b>
Multistep Process of Establishing Carcinoma Metastases Ondroušková E., Sommerová L., Hrstka R.	
<b>Mechanismy regulace proteinové homeostázy ve vývoji nádorových onemocnění</b>	<b>4S18</b>
Mechanisms of Protein Homeostasis Regulation in Cancer Development Trčka F., Müller P., Vojtěšek B.	
<b>Chaperony endoplazmatického retikula na povrchu nádorové buňky a v extracelulárním prostředí</b>	<b>4S25</b>
Endoplasmic Reticulum Chaperones at the Tumor Cell Surface and in the Extracellular Space Brychtová V., Vojtěšek B.	
<b>Proteiny Rab, vnitrobuněčný transport a nádorová onemocnění</b>	<b>4S31</b>
Rab Proteins, Intracellular Transport and Cancer Černochová R., Nekulová M., Holčáková J.	
<b>Vplyv inhibície HSP90 na viabilitu a bunkový cyklus v závislosti od stavu p53</b>	<b>4S40</b>
Impact of HSP90 Inhibition on Viability and Cell Cycle in Relation to p53 Status Pastorek M., Müller P., Vojtěšek B.	
<b>Molekulární podstata kancerogeneze epiteliálních ovariálních karcinomů</b>	<b>4S46</b>
Molecular Mechanisms of Carcinogenesis of Epithelial Ovarian Cancers Müllerová Z., Müller T., Křivánková K., Vojtěšek B., Müller P.	
<b>Tvorba hmotnostne spektrometrických spektrálních knižnic nádorových buněčných linií</b>	<b>4S54</b>
Building Mass Spectrometry Spectral Libraries of Human Cancer Cell Lines Faktor J., Bouchal P.	
<b>Využití metody vodík/deuteriové výměny v biofarmaceutickém průmyslu</b>	<b>4S59</b>
Utilization of Hydrogen/Deuterium Exchange in Biopharmaceutical Industry Coufalová D., Vojtěšek B., Hernychová L.	
<b>Nové metody studia metylace DNA – MS-HRM analýza a elektrochemie</b>	<b>4S64</b>
Novel Approaches in DNA Methylation Studies – MS-HRM Analysis and Electrochemistry Bartošík M., Ondroušková E.	

- Úloha PD-1/PD-L1 signalizace v protinádorové imunitní odpovědi** 4572  
The Role of PD-1/PD-L1 Signaling Pathway in Antitumor Immune Response  
Zatloukalová P, Pječová M, Babčanová S, Hupp T. R., Vojtěšek B.
- Nemalobuněčný karcinom plic – od imunobiologie k imunoterapii** 4578  
Non-Small Cell Lung Cancer – from Immunobiology to Immunotherapy  
Bílek O., Bohovicová L., Demlová R., Poprach A., Lakomý R., Zdražilová-Dubská L.
- Nové technologie používané pro *in vivo* diagnostiku nádorů** 4588  
New Technologies for *In Vivo* Cancer Diagnostics  
Hernychová L., Coufalová D., Michalová E., Nenutil R., Vojtěšek B.
- Pokroky ve vývoji PET radiofarmak pro pacienty v České republice** 4595  
Current Progresses in Developing PET Radiopharmaceuticals for Patients in the Czech Republic  
Adam J., Demlová R., Řehák Z.

Partner supplementa



# Nádorové buňky jako dynamický systém – molekulární a fenotypové změny v průběhu vzniku, progresu a šíření nádoru

## Cancer Cells as Dynamic System – Molecular and Phenotypic Changes During Tumor Formation, Progression and Dissemination

Sommerová L., Ondroušková E., Hrstka R.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

Dobře načasovaná, přesná a dokonale koordinovaná reakce buňky na vnitřní i vnější podněty představuje základní předpoklad pro úspěšnou adaptaci savčích buněk na všechny změny, které se dějí za fyziologických podmínek v průběhu buněčného vývoje. Zneužit těchto schopností umí právě nádorové buňky, které jsou tak schopné se přizpůsobit stresovým podmínkám, které představují důležitý předpoklad pro vznik a vývoj nádoru. Změnou klíčových mechanismů se nádorovým buňkám podaří vyhnout buněčné smrti, a tak je umožněn vývoj a šíření nádoru. Změny na genetické úrovni se manifestují celou řadou fenotypových projevů, díky kterým jsou nádorové buňky schopny uniknout obranným mechanismům organismu, získat rezistenci k léčbě, invadovat, zakládat dormantní ložiska či vytvářet sekundární nádory. Mezi jednu ze základních vlastností studovaných v posledních letech patří změna energetického metabolismu, kdy si nádorová buňka cíleně reguluje přeprogramování hlavních metabolických drah k vlastnímu prospěchu a uspokojení zvýšených nároků nejen na energii, ale také na stavební materiály, které jsou nutné pro zajištění zvýšené buněčné proliferace. Přizpůsobení se okolním podmínkám je nutné i na morfoloické úrovni, kdy změna tvaru buněk pomocí reorganizace cytoskeletálních vláken umožní nádorovým buňkám zvýšit jejich agresivitu a invazivní vlastnosti. Pochopení těchto změn spolu s porozuměním přepínání genetického programu v nádorových buňkách umožňujícího jejich přechod mezi různými diferenciačními stadii od nádorových kmenových buněk až po plně diferencované buňky by tak mohl vést k odhalení „slabých míst“ nádorových buněk a přispět tak k efektivě léčby nádorových onemocnění. Schopnost nádorových buněk měnit pravidla vlastního organismu tak představuje obrovskou výzvu pro onkologický výzkum.

### Klíčová slova

přeprogramování buněk – plasticita nádorových buněk – nádorový metabolismus – heterogenita nádoru – remodelace cytoskeletu – metastázy – onkogeneze

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



**Mgr. Lucia Sommerová**

Regionální centrum aplikované

molekulární onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: lucia.sommerova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 7. 2016

Přijato/Accepted: 11. 8. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2016456>

## Summary

Dynamic, punctual and perfectly coordinated cellular response to internal and external stimuli is a crucial prerequisite for adaptation of mammalian cells to all changes that occur during cellular development under physiological conditions. Hijacking this ability is characteristic for tumor cells that are capable to adapt to unfavorable conditions which contribute to the formation and development of cancer during the process of tumor formation and progression. By changing key mechanisms, malignant cells can avoid cell death and thus allow development and spread of the tumor. The changes at the genetic level are manifested by various phenotypic characteristics, through which tumor cells are able to escape defense mechanisms, to acquire resistance to treatment, to invade and to create secondary tumors. In recent years, one of the most studied properties include changes in energy metabolism, when tumor cells specifically control reprogramming of the main metabolic pathways for their own benefit and to satisfy their increased needs not only for energy, but also for building materials required for increased proliferation. To adapt to extracellular conditions, it is necessary that cells undergo morphological changes, where modifications in the cell shape through reorganization of cytoskeletal filaments allow tumor cells to increase their invasiveness and other aggressive features. Clarifying these changes together with understanding of the switch in the genetic program within cancer cells, which allows them to overcome different stages of differentiation from cancer stem cells to fully differentiated cells, would be an important prerequisite for identification of the cancer cell "weaknesses" and may lead to improved cancer treatment. The ability of tumor cells to alter the rules of their own organism thus represents an important challenge for oncological research.

## Key words

cellular reprogramming – cancer cell plasticity – cancer metabolism – tumor heterogeneity – cytoskeleton remodeling – metastasis – oncogenesis

## Úvod

Transformace normálních buněk na buňky nádorové sestává z mnoha kroků společně vedoucích ke změně buněčné struktury a funkce. V roce 2000 bylo popsáno šest základních vlastností nádorových buněk: 1. nezávislost na tvorbě růstových faktorů, 2. neomezený replikační potenciál, 3. zvýšená proliferace, 4. rezistence k buněčné smrti, 5. schopnost indukovat angiogenezi, 6. zvýšená invazivita a tvorba metastáz [1]. Nedávno k nim přibýlo několik dalších, jako je změna energetického metabolismu, únik před imunitním systémem, nádorem vyvolaný zánět či genomová nestabilita. Projevem těchto vlastností tak nádorové buňky získávají svůj agresivní až devastující fenotyp. Další významnou vlastností nádorových buněk je schopnost rychle se přizpůsobit změnám okolního prostředí [2]. Příkladem je proces epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), v rámci kterého dochází ke změně epiteliálního typu buněk na mezenchymální, čímž se nejen zvyšuje migrační potenciál, ale i buněčná plasticita nádorových buněk [3]. V nádorových buňkách též dochází k metabolickým změnám směrem k energeticky méně výhodné anaerobní glykolýze [4]. Popsané vlastnosti jsou spojené se změnami v expresi onkogenů a nádorových supresorových genů.

## Změny v buněčném metabolismu

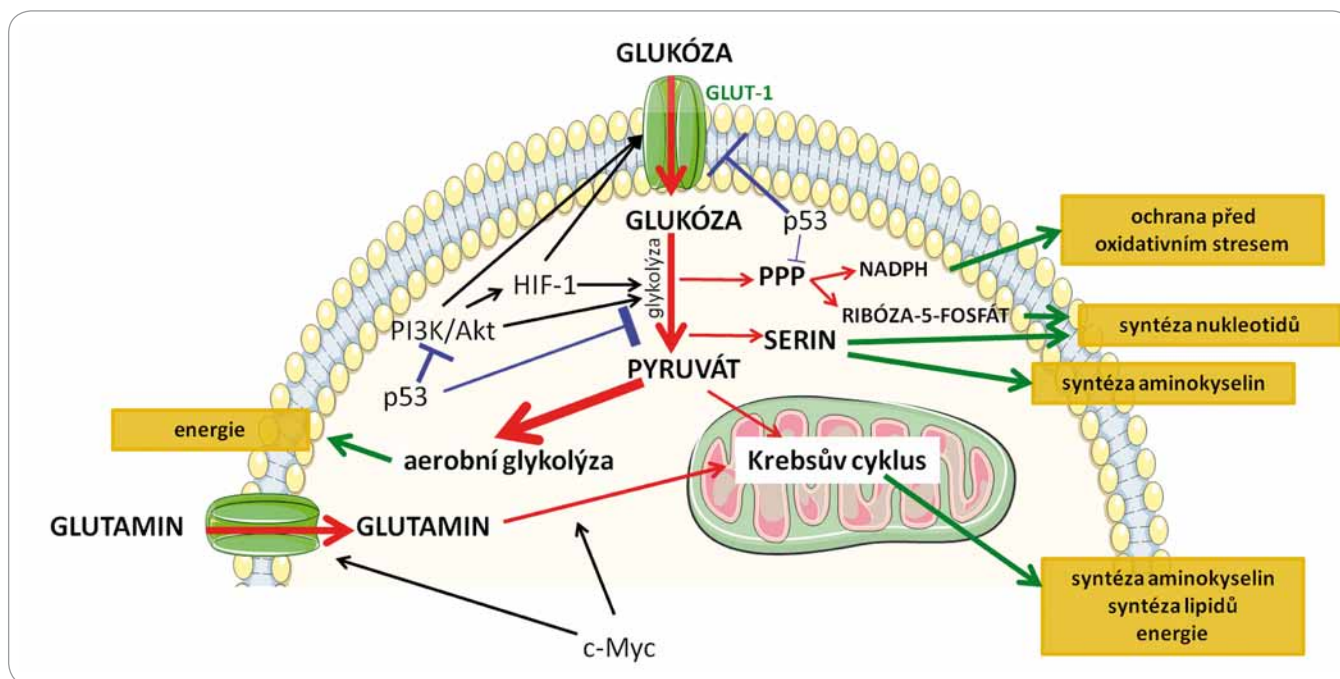
Nádorové buňky jsou charakterizované schopností nekontrolovaného bu-

něčného dělení, k čemuž je zapotřebí dostatečné množství živin a energie. Vybalancování zvýšených buněčných požadavků je dosaženo transformací buněčného metabolismu. První popis metabolických změn v průběhu tvorby nádoru pochází z 30. let 20. století, kdy Otto Warburg pozoroval, že na rozdíl od normálních je v nádorových buňkách posílen glukózový metabolismus [5]. Deregulace metabolismu glukózy dle některých vědců představuje hlavní předpoklad vzniku nádoru a význam nádorového metabolismu dokládá i skutečnost, že metabolické buněčné přeprogramování bylo zařazeno mezi 10 základních vlastností nádorových buněk [6]. Warburgův efekt představuje změnu v metabolismu buněk charakterizovanou zvýšeným příjmem glukózy, která je proměněna na pyruvát a místo následného vstupu do Krebsova cyklu je konvertována na laktát. Tento metabolický proces je běžně uplatňován při hypoxických podmínkách, kdy má buňka nedostatek kyslíku, nicméně nádorové buňky preferují zpracování glukózy na laktát i za přítomnosti kyslíku. Aerobní glykolýza, jak se tento jev nazývá, probíhá v cytozolu bez účasti mitochondrií. Jedná se o rychlý zdroj energie v podobě ATP. Proces je však méně účinný, a nádorové buňky se tedy stávají silně závislé na zvýšeném příjmu glukózy [7]. Této vlastnosti se využívá k diagnostickým účelům, kdy se značený

analog glukózy, 2-deoxy-2-<sup>18</sup>F-fluoro-D-glukóza, aplikuje pacientovi při vyšetření pozitronovou emisní tomografií (<sup>18</sup>F-FDG-PET) k hledání rychle proliferujících primárních nádorů a metastáz [8].

Pro nádorovou buňku je nutné podstoupit metabolické přeprogramování, aby si udržela selektivní výhodu spočívající v buněčném růstu a proliferaci. Musí však najít způsob, jakým získávat nejen energii, ale také stavební materiál pro biosyntézu nukleových kyselin, proteinů, lipidů a kofaktorů, které umožní udržet buněčnou homeostázu v podmínkách zvýšeného buněčného stresu (obr. 1) [9].

Po přijetí buňkami může glukóza vstoupit do procesu glykolýzy vedoucího k produkci ATP nebo může být přeměnována do tzv. pentózofosfátové dráhy (PPP). Během tohoto procesu je produkován ribóza-5-fosfát, který představuje substrát pro syntézu nukleotidů, nukleových kyselin a NADPH (redukováný nikotinamidadeninukleotid fosfát) [10]. Vlivem zrychleného metabolismu a zvýšenou proliferací v porovnání s normálními buňkami dochází v nádorových buňkách často k navození oxidativního stresu vyvolaného přítomností radikálů. Pokud nejsou radikály včas odstraněny, dochází k poškození mitochondriální i jaderné DNA, k oxidaci proteinů a lipidů a tím k narušení jejich funkčnosti. NADPH slouží buňce ke zmírnění a k ochraně před oxidativním



**Obr. 1. Schematické znázornění základních metabolických drah, k jejichž přeprogramování dochází v nádorových buňkách.**

Červenými šipkami je označen metabolismus glukózy, jejíž zvýšený příjem je charakteristický pro nádorové buňky a metabolismus glutaminu. Modře je znázorněn inhibiční vliv nádorového supresoru p53 a zeleně jsou označeny efekty jednotlivých drah na buňku. Klíčové mechanismy spojené s přeprogramováním metabolismu jsou podrobněji popsány v textu.

stresem a zvýšená syntéza tohoto kofaktoru pomocí PPP je tedy pro nádorovou buňku zásadní [11].

Meziprodukty glykolýzy se dále uplatňují při metabolismu serinu, který je nezbytný pro syntézu nukleotidů, lipidů a jiných aminokyselin. Zvýšená exprese enzymu PHGDH (fosfoglycerát dehydrogenáza), který katalyzuje přeměnu 3-fosfoglycerátu získaného glykolýzou na serinový prekurzor, byla prokázána u karcinomu mléčné žlázy [12] a melanomu [12,13]. Kromě glukózy jsou nádorové buňky závislé na glutaminu, jenž se podílí na zrychlené proliferaci. Tato aminokyselina tedy musí být silně zastoupena v kultivačním médiu při studiu nádorových buněk *in vitro*. Glutamin představuje alternativní zdroj pro Krebsův cyklus, kdy po vstupu do buňky je postupně přeměněn na glutamát a následně na acetyl-CoA, který se uplatňuje v biosyntéze lipidů a je též zdrojem energie. Navíc se jedná o donor dusíku pro biosyntézu nukleotidů a bílkovin [14]. Metabolismus glutaminu je spojen se zvýšenou expresí transkripčního faktoru c-Myc. c-Myc reguluje membránové transportéry pro gluta-

min a zároveň indukuje expresi enzymu glutaminázy 1 nutného pro lepší příjem a zpracování glutaminu a výraznější tvorbu prekurzorů nezbytných k syntéze biomolekul [15,16].

Mezi klíčové signální dráhy, které se podílejí na regulaci metabolických změn, patří fosfoinositid-3-kináza (PI3K)/Akt signalizace [17]. Aktivací PI3K/Akt dochází ke zvýšení glukóзовého příjmu díky zvýšené expresi povrchových receptorů GLUT1 a aktivaci hlavních enzymů účastnících se degradace glukózy (hexokináza a fosfofrukto-kináza 1) [15]. Aktivace PI3K/Akt signalizace v průběhu nádorového procesu tak představuje zásadní stimul vedoucí ke změněnému energetickému metabolismu nádorové buňky.

Rozšiřující se poznatky o nádorovém metabolismu vedou k odhalení nových funkcí klíčových a dobře prostudovaných onkoproteinů (c-Myc, proteiny uplatňující se při PI3K/Akt signalizaci) a nádorových supresorů. Nejvýznamnějším inhibítorem karcinogeneze je protein p53, často označovaný jako „strážce genomu“ [18]. Poměrně nedávno byla zjištěna jeho nová úloha, a to v regu-

laci metabolismu. Na úrovni transkripce p53 reprimuje expresi glukózových transportérů a snižuje tak příjem glukózy [19]. Současně p53 snižuje i intracelulární koncentraci fruktóza-2,6-bisfosfátu, čímž dochází nejen k redukcí glykolýzy, ale i k inhibici PI3K/Akt signalizace a potlačení metabolismu glukózy [20]. Protein p53 negativně ovlivňuje i PPP, čímž redukuje produkci ribóza-5-fosfátu a NADPH, klíčových faktorů podporujících růst a dělení nádorových buněk [21].

Přeprogramování metabolismu je regulováno také hypoxií, kdy dochází ke stabilizaci jedné z podjednotek HIF-1 (hypoxií indukibilní faktor 1) komplexu. HIF-1 zvyšuje expresi GLUT-1 (glukózových transportérů 1) na buněčném povrchu, enzymu hexokinázy a laktátdehydrogenázy, čímž stimuluje přeměnu glukózy na laktát [22]. Inhibicí konverze pyruvátu na acetyl-CoA pomocí pyruvátdehydrogenáza kinázy 1 [23] HIF-1 blokuje Krebsův cyklus v metabolismu glukózy [23].

Buněčný metabolický převrat může být způsoben celou řadou faktorů, vč. aktivace onkogenů, represe nádorových supresorových genů, dysfunkce mito-



chondriální DNA (mtDNA) a deregulace řady signálních drah [24]. Navzdory zvýšené snaze porozumět pozměněnému metabolismu v nádorové buňce však stále zůstává otázkou, zdali je příčinou, či pouhým následkem nádorového procesu. Je však vědecky doloženo, že metabolické přeprogramování je nutné pro úspěšný vývoj nádorové buňky. Zesílení glykolýzy, pentózové fosfátové dráhy, metabolismu glutaminu a dalších metabolických pochodů poskytne buňce nejen energii, ale také důležité stavební materiály pro biosyntézu aminokyselin, nukleotidů a lipidů, a tím je transformované buňce umožněno rychleji proliferovat a navozovat svůj nádorový charakter. Metabolické změny v nádorových buňkách představují nejen atraktivní cíl pro vývoj nových diagnostických přístupů, ale poskytují i nové možnosti v souvislosti s cílenou terapií.

### Remodelace cytoskeletu v průběhu nádorové progresy

Metastázy představují hlavní příčinu úmrtí na nádorová onemocnění [25]. Důležitý krok při metastazování představuje proces epiteliálně-mezenchymální tranzice, kdy spolu se změnou adhezivních a migračních vlastností nádorové buňky podstupují morfologickou proměnu. Epiteliální buňky primárního nádoru, které mají apiko-bazální polaritu, se při EMT morfologicky mění, přičemž získávají mezenchymální fenotyp typický pro fibroblasty. Přechod buněk z jednoho místa na druhé a tvorba metastáz tak vyžaduje komplexní a dramatickou reverzibilní změnu buněčného cytoskeletu. Během progresy a šíření nádoru musí nádorové buňky dynamicky reagovat na extracelulární i intracelulární stimuly a v nádoru tak dochází ke změnám v expresi a organizaci proteinů, které jsou významnou součástí buněčného cytoskeletu. Konkrétně se jedná o 1. mikrofilamenta (aktin), 2. intermediární filamenta a 3. mikrotubuly. Alterace cytoskeletu zvyšují buněčnou pohyblivost, kontraktilnost a spolu s aktivací různých signálních kaskád přispívají ke zvýšené agresivitě nádorových buněk.

I když jednotlivé složky cytoskeletu účinkují synergicky, aktin bývá charakte-

rizován jako „motor“ (driving force) buněčné migrace [26]. Aktinová mikrofilamenta regulují morfologii buněk, jejich kompartmentarizaci a udržují buněčnou polaritu. Zároveň se podílejí na regulaci buněčné signalizace. Aktinová filamenta představují přepínač mechanických stimulů přijatých buňkou pomocí integrinů (mechanoreceptorů) z vnějšího prostředí a převádí je na biochemické signály aktivací např. Erk a Akt signalizace [27]. Pro epiteliální buňky je charakteristická kortikální aktinová struktura, zatímco pro mezenchymální buňky je typická organizace aktinových filament do stresových vláken. Aktin ovlivňuje mezibuněčné pevné spoje, kde se adherentní protein E-cadherin váže na cytoskelet. Rozrušením adherentních spojů dochází k translokaci  $\beta$ -kateninu, který následně spustí WNT signalizaci a remodelaci cytoskeletu, jenž potencuje metastatický proces [28]. Změna v cytoskeletu tak umožní buňkám uniknout z původního místa a vede ke vzniku metastáz. Aktin se v buňkách vyskytuje ve dvou izoformách –  $\beta$  a  $\gamma$ , přičemž jejich funkce a distribuce se liší [29].  $\beta$ -aktin zajišťuje buněčné spoje a kontrakce, zatímco  $\gamma$ -aktin je zodpovědný za tvorbu lamelárních, kortikálních a lamelipodních struktur v migrujících buňkách. V neoplasticky transformovaných buňkách jsou hladiny  $\beta$ -aktinu sniženy. V podstatě platí pravidlo, že čím je transformační potenciál silnější, tím intenzivněji vznikají disperzní struktury, které se rozprostírají po celé buňce, zatímco v netransformovaných tvoří shluky v oblasti mezibuněčných spojů [29]. Co do organizace existují v buňce dva typy aktinu: 1. monomerní globulární G-aktin a 2. polymerní filamentární F-aktin. Proces polymerizace a rozpadu aktinových vláken závisí na koncentraci aktinu v buňce. Pro změnu morfologie a zvýšenou migraci a invazi nádorových buněk je klíčovou právě dynamická změna aktinových vláken, kdy se G-protein mění na stresová vlákna F-aktinu a dochází k formaci tzv. vedoucího konce (leading edge) [30].

K vytvoření komplexnější architektury se aktinová filamenta vážou s aktin asociovanými proteiny, např. actin-nucleating factors (ANFs) a/nebo nucleation promoting factors (NPFs), které re-

gulují polymerizaci aktinu a umožňují vytvářet komplexní struktury, jako jsou filopodia, lamelipodia a invadopodia. Tyto tři struktury představují výběžky cytoplazmatické membrány a jsou nezbytné k zajištění adhezivity, migrace a invazivity nádorových buněk [31–33].

Intermediární filamenta (IF) udržují funkčnost plazmatické membrány a správný buněčný tvar. Rozeznáváme šest různých typů. Hlavním typem filament epiteliálních buněk jsou keratinová filamenta, tzv. IF typu I. V endoteliálních, mezenchymálních a hematopoetických buňkách převládají IF typu III, tzv. vimentinová filamenta, která zároveň slouží jako diagnostický marker pro epiteliální buňky, které prošly EMT. V průběhu EMT totiž dochází ke snížení exprese keratinu, který je nahrazen vimentinem, a tato změna je spojená s indukci migračních schopností buněk [34]. Vazba keratinu na desmozomy (adhezivní mezibuněčná spojení) umožňuje silnou mezibuněčnou adhezi a udržuje tak epiteliální strukturu, která představuje bariéru pro indukci EMT. I když samotná ztráta keratinu není dostatečná pro vyvolání změn spojených s EMT, snížená hladina keratinu 8 a 18 představuje významný diagnostický marker spojený se zvýšenou migrací a invazivitou endometriálních a hepatocelulárních karcinomů [35,36]. Při změně exprese proteinů intermediárních filament směrem ke zvýšené expresi vimentinu buňky získávají mezenchymální buněčný tvar a zvýšený migrační potenciál [37].

Třetí složkou cytoskeletu jsou mikrotubuly ( $\alpha$  a  $\beta$  tubulin), které se podílejí na udržení polaritě buňky. Buněčná polarita je klíčovou vlastností, která určuje tvar buňky, asymetrickou lokalizaci proteinů a organel, reguluje dělení buněk a vede k udržení integrity tkání. Ztráta polaritě je považována za jeden ze znaků maligní transformace buněk, neboť polární uspořádání buňky slouží jako bariéra proti vzniku metastáz a potlačuje nekontrolovanou proliferaci buněk. Epiteliální buňky jsou charakterizované svojí apiko-bazální polaritou, která je daná mikrotubuly a při proměně epiteliálních buněk v buňky mezenchymální schopné migrovat pak dochází k prostorové reorganizaci. Ve všech epiteliálních

buňkách vycházejí mikrotubuly tvořené z polymerů  $\alpha$  a  $\beta$  tubulinu z centrozomů umístěných těsně pod apikální stranou buněčné membrány a směřují k bazální straně buněk, zatímco v mezenchymálních buňkách jsou mikrotubuly organizované od buněčného jádra radiálně směrem k povrchu ve směru pohybu buňky [38,39]. Mnohé nádorové supresory indukují stabilizaci mikrotubulů a regulaci epiteliálního fenotypu. Jedním z následků inaktivace nádorového supresoru v průběhu vývoje a progresu nádoru je tedy i narušení epiteliální polarizace, čímž je umožněn vznik agresivnějších nádorů. Mezi pět takových nejlépe popsaných nádorových supresorů patří APC (adenomatous polyposis coli), RASSF1A (Ras associated domain family 1A), VHL (von Hippel-Lindau), E-cadherin a merlin. Jejich inaktivace má za následek destabilizaci mikrotubulů vedoucí ke změnám v cytoskeletu, která vede ke zvýšení migračních vlastností buňky a rovněž k intracelulárním translokacím onkogenních molekul [39].

Buněčná migrace je obvykle spouštěna různými chemoatraktanty, které se vážou na membránové receptory a indukují signalizaci, která se projevuje cytoskeletálními změnami. Mezi nejvíce studované signální proteiny, které spouštějí cytoskeletální remodelaci v nádorových buňkách, patří proteiny WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)/Arp2/3, LIM-kinázy/kofilin a kontraktilin. Zvýšená aktivace těchto signalizací byla popsána u řady nádorů – např. u karcinomu prsu, kolorektálního a hepatocelulárního karcinomu a úzce souvisí s fenotypem nádorových buněk [32,40].

### Buněčné přeprogramování – nádorová plasticita

Buněčná plasticita představuje schopnost některých buněk změnit svůj fenotyp. První experimentální důkaz přeměny buněčného fenotypu byl získán v roce 1971, kdy Pierce et al pomocí světelné a elektronové mikroskopie v kombinaci s radioaktivním značením prokázali změnu nediferencovaných buněk na buňky diferencované [41]. Navození změny fenotypu umožní nádorovým buňkám rychle reagovat na různé podněty, které by mohly ovlivnit buněčné

chování. Mezi vnitřní stimuly, které mohou vést k indukci změny fenotypu, patří změna genové exprese vyvolaná radioterapií nebo chemoterapií. Příkladem terapií vyvolané plasticity u nádorových buněk jsou leukemické buňky, které se vlivem ozáření proměnily na buňky s podobnými charakteristikami, jako mají leukemické kmenové buňky, jež jsou odolné vůči léčbě [42], nebo buňky karcinomu prsu, které se fenotypově mění z diferencovaných na buňky mezenchymální s vlastnostmi nádorových kmenových buněk v rámci odpovědi na chemoterapii [43,44]. Na změně fenotypu a přechodu mezi různými typy buněk se však podílejí i vnější podněty. Nejvýznamnější stimuly z vnějšího prostředí představují vzájemná interakce mezi buňkou a extracelulární matrix [45] a přítomnost rozdílných typů buněk v nádorovém stromatu.

Nejběžnějším příkladem buněčné plasticity je embryogeneze, při níž epiteliální buňky podstoupí transformaci na buňky mezenchymální. Tyto změny v adhezivitě a buněčném chování umožní buňkám vycestovat a vytvořit ostatní orgány [46]. Po dosažení místa určení buňky přejdou zpět k původnímu fenotypu, který jim umožní usadit se a vytvořit nové orgány. Analogický proces jako buňky embryonální adoptovaly i nádorové buňky. Nazývá se epiteliálně-mezenchymální tranzice, resp. mezenchymálně-epiteliální tranzice a je považován za klíčový při vzniku nádorových metastáz [47].

Buněčná plasticita představuje nástroj, kterým buňky mění vlastní identitu a získávají vlastnosti, které odpovídají jiným buněčným typům. Nádorovým buňkám pomáhá získat výhodu v metastazování, agresivnějším průběhu onemocnění a v úniku při cílené léčbě. Proces tumorigeneze, kdy se normální buňky promění na nádorové, je stejně tak možný pouze v případě, pokud buňky iniciující vznik nádorů mají plastické schopnosti, a tedy schopnost přeprogramovat svou vlastní identitu. Jako příklad úplné transdiferenciace nádorových buněk na jiný typ buněk slouží vytvoření vaskulárních mimiker. Bylo prokázáno, že vlivem hypoxie došlo u glioblastomů ke změně nádorových buněk na buňky endoteliální,

které byly rezistentní k anti-VEGF terapii, a přispívaly tak ke zvýšení agresivity onemocnění [48].

### Závěr

Buněčná a molekulární plasticita představuje klíčovou vlastnost buněk i při rozvoji mnohobuněčného organismu. Nádorové buňky si tuto vlastnost zachovávají a stávají se tak nejen agresivnější, ale posilují i svou odolnost vůči léčbě. Tradičně se předpokládá, že dceřiné buňky kmenových buněk projdou progresivními a jednosměrnými změnami v genové expresi a tím dochází k jejich buněčné diferenciaci. Avšak tento koncept byl zavržen v důsledku nedávného objevu, který prokázal, že stačí pouze změna v expresi čtyř klíčových transkripčních faktorů (mezi které patří Oct-3/4, Sox2, KLF4 a c-Myc) [49,50], která spustí kaskádu změn vedoucích k rychlejšímu přeprogramování tisíce genů, což má za následek změnu buněčného fenotypu, kdy se buňky diferencované transformují na buňky podobné kmenovým buňkám, nazvaným indukované pluripotentní kmenové buňky [51].

Dediferenciace a následná rediferenciace nádorových buněk potencuje růst nádoru a zvyšuje jeho agresivitu vzhledem k již existujícím genetickým modifikacím. Bylo získáno několik důkazů o pozitivním vlivu nádorové plasticity na nádor, např. ztráta citlivosti leukemických buněk k imatinibu [52], nebo když vlivem hypoxie došlo k vytvoření dediferencovaných buněk, které následně vykazovaly vyšší tumorigenicitu [53]. Nicméně buněčné přeprogramování nemusí nutně vést jen ke zvýšení nádorového potenciálu. Některé studie naopak dokazují, že správnou kombinací aktivace a represe genů může být přeprogramovatelnost využita i k terapeutickým účelům [54]. Porozumění přeprogramovacímu procesu nádorových buněk tudíž představuje značně perspektivní úkol na poli nádorové biologie a mohlo by vytvořit základ pro nové terapeutické strategie v boji s nádorovými onemocněními.

### Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57–70.

2. Klein CA. Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* 2013; 501(7467): 365–372. doi: 10.1038/nature12628.
3. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the micro-environment: plasticity and reciprocity. *Cell* 2011; 147(5): 992–1009. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.016.
4. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(2): 85–95. doi: 10.1038/nrc2981.
5. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123(3191): 309–314.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next environment. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
7. Granja S, Pinheiro C, Reis RM et al. Glucose addiction in cancer therapy: advances and drawbacks. *Curr Drug Metab* 2015; 16(3): 221–242.
8. Kelloff GJ, Hoffman JM, Johnson B et al. Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development. *Clin Cancer Res* 2005; 11(8): 2785–2808.
9. Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* 2012; 491(7424): 364–373. doi: 10.1038/nature11706.
10. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 441–464. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
11. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci* 2014; 39(8): 347–354. doi: 10.1016/j.tibs.2014.06.005.
12. Possemato R, Marks KM, Shaul YD et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 2011; 476(7360): 346–350. doi: 10.1038/nature10350.
13. Mullarky E, Mattaini KR, Vander Heiden MG et al. PHGDH amplification and altered glucose metabolism in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24(6): 1112–1115. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00919.x.
14. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 2008; 7(1): 11–20. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002.
15. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(49): 19345–19350.
16. Dang CV. MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3(8): pii: a014217. doi: 10.1101/cshperspect.a014217.
17. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930): 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.
18. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381): 15–16.
19. Schwartzberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 2004; 64(7): 2627–2633.
20. Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(10): 691–700. doi: 10.1038/nrc2715.
21. Jiang P, Du W, Wang X et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol* 2011; 13(3): 310–316. doi: 10.1038/ncb2172.
22. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(9): 705–713. doi: 10.1038/nrc2468.
23. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006; 3(3): 177–185.
24. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008; 13(6): 472–482. doi: 10.1016/j.ccr.2008.05.005.
25. Schroeder A, Heller DA, Winslow MM et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(1): 39–50. doi: 10.1038/nrc3180.
26. Chan E, Saito A, Honda T et al. The acetylenic tricyclic bis(cyano enone), TBE-31 inhibits non-small cell lung cancer cell migration through direct binding with actin. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014; 7(7): 727–737. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0403.
27. Müller P, Langenbach A, Kaminski A et al. Modulating the actin cytoskeleton affects mechanically induced signal transduction and differentiation in mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2013; 8(7): e71283. doi: 10.1371/journal.pone.0071283.
28. Schlessinger K, Hall A, Tolwinski N. Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev* 2009; 23(3): 265–277. doi: 10.1101/gad.1760809.
29. Shagieva GS, Domnina LV, Chipysheva TA et al. Actin isoforms and reorganization of adhesion junctions in epithelial-to-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells. *Biochemistry (Mosc)* 2012; 77(11): 1266–1276. doi: 10.1134/S0006297912110053.
30. Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(3): 177–187. doi: 10.1038/nrc3003.
31. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(6): 446–454. doi: 10.1038/nrm2406.
32. Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(5): 642–652.
33. Leong HS, Robertson AE, Stoletov K et al. Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis. *Cell Rep* 2014; 8(5): 1558–1570. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.050.
34. Helfand BT, Chang L, Goldman RD. The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 445–467.
35. König K, Meder L, Kröger C et al. Loss of the keratin cytoskeleton is not sufficient to induce epithelial mesenchymal transition in a novel KRAS driven sporadic lung cancer mouse model. *PLoS One* 2013; 8(3): e57996. doi: 10.1371/journal.pone.0057996.
36. Fortier AM, Asselin E, Cadrin M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem* 2013; 288(16): 11555–11571. doi: 10.1074/jbc.M112.428920.
37. Lang SH, Hyde C, Reid IN et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate* 2002; 52(4): 253–263.
38. Müsch A. Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic* 2004; 5(1): 1–9.
39. Hernandez P, Tirnauer JS. Tumor suppressor interactions with microtubules: keeping cell polarity and cell division on track. *Dis Model Mech* 2010; 3(5–6): 304–315. doi: 10.1242/dmm.004507.
40. Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15(1): 87–96.
41. Pierce GB, Wallace C. Differentiation of malignant to benign cells. *Cancer Res* 1971; 31(2): 127–134.
42. Lee GY, Shim JS, Cho B et al. Stochastic acquisition of a stem cell-like state and drug tolerance in leukemia cells stressed by radiation. *Int J Hematol* 2011; 93(1): 27–35. doi: 10.1007/s12185-010-0734-2.
43. Almendro V, Kim HJ, Cheng YK et al. Genetic and phenotypic diversity in breast tumor metastases. *Cancer Res* 2014; 74(5): 1338–1348. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2357-T.
44. Almendro V, Cheng YK, Randles A et al. Inference of tumor evolution during chemotherapy by computational modeling and in situ analysis of genetic and phenotypic cellular diversity. *Cell Rep* 2014; 6(3): 514–527. doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.041.
45. Lipkin G. Plasticity of the cancer cell: implications for epigenetic control of melanoma and other malignancies. *J Invest Dermatol* 2008; 128(9): 2152–2155. doi: 10.1038/jid.2008.69.
46. Acloque H, Adams MS, Fishwick K et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 2009; 119(6): 1438–1449. doi: 10.1172/JCI38019.
47. Thiery JP, Acloque H, Huang RY et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139(5): 871–890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
48. Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(11): 4274–4280. doi: 10.1073/pnas.1016030108.
49. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663–676.
50. Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif* 2008; 41 (Suppl 1): 51–56. doi: 10.1111/j.1365-2184.2008.00493.x.
51. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917–1920.
52. Carette JE, Pruszk J, Varadarajan M et al. Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. *Blood* 2010; 115(20): 4039–4042. doi: 10.1182/blood-2009-07-231845.
53. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res* 2011; 71(13): 4640–4652. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3320.
54. Miyoshi N, Ishii H, Nagai K et al. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(1): 40–45. doi: 10.1073/pnas.0912407107.

# Vícestupňový proces vzniku vzdálených metastáz u karcinomů

## Multistep Process of Establishing Carcinoma Metastases

Ondroušková E., Sommerová L., Hrstka R.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Diseminace nádorových buněk z ložiska primárního nádoru a zakládání vzdálených metastáz, u nichž je úspěšnost terapie již velmi omezená, je nejčastější příčinou úmrtí onkologických pacientů. Samotný primární nádor je tvořen heterogenní populací buněk, na něž působí různé selekční tlaky v podobě aktivity imunitního systému, sníženého přísunu živin a kyslíku, chemoterapie, radioterapie atd., které vedou k postupnému převládání rezistentních, přizpůsobivých nádorových buněk. Další selekce nastává při metastatickém procesu a díky ní přežívají ve vzdálených ložiscích, zakládáných v různých tkáních, jen buňky schopné se na nové prostředí úspěšně adaptovat a proliferovat v něm. **Cíl:** Cílem tohoto přehledového článku je představit jednotlivé kroky metastatické kaskády, které musí invazivní buňka překonat, a mechanismy a signální dráhy, které k tomu využívá. Metastazování je v podstatě velmi neefektivní proces a jen velmi malý zlomek buněk z těch, které opustily primární nádor, v něm uspějí. Důležitou podporu jim při tom poskytují nejen pro-metastatické mutace, které se v nich díky selekčnímu tlaku hromadí, ale také „spolupracující“ nenádorové buňky z jejich okolí a jimi sekretované podpůrné faktory. **Závěr:** Současné pokroky ve výzkumu vedou k hlubšímu porozumění komplexních procesů vedoucích ke vzniku a šíření nádorových buněk. Poznání klíčových bodů metastatické kaskády a principy její regulace snad v budoucnu vyústí ve vývoj účinných chemoterapeutik cílených na metastazující buňky.

### Klíčová slova

metastázy – karcinom – vaskulární endoteliální růstový faktor A – epiteliálně-mezenchymální tranzice

### Summary

**Background:** Dissemination of cancer cells from the primary tumor and establishment of therapy-resistant distant metastases is the most common cause of human cancer deaths. The primary tumor consists of a heterogeneous population of cancer cells that have to overcome activity of the immune system, insufficient delivery of nutrients and oxygen, chemotherapy, radiotherapy etc. that lead to the selection of resistant and plastic cancer cells. Another selection pressure during metastatic spread gives rise to resistant subpopulations of cells, capable of surviving and proliferating in the hostile microenvironment of distant tissues. **Aim:** In this article, individual steps of the metastatic cascade are described as well as the mechanisms and signaling pathways that cancer cells use to deal with them. Metastatic process is generally inefficient and only very few cells released from the primary tumor develop into metastases. This success is enabled by pro-metastatic mutations, accumulated due to the selection pressure and also by cooperation of non-transformed cells that secrete supporting factors. **Conclusion:** Recent advances in research provide deeper insights into the complex processes that lead to formation and dissemination of cancer cells. Deciphering the key points of metastatic cascade and principles of its regulation will perhaps lead to development of efficient therapeutics targeting metastatic cells.

### Key words

metastasis – carcinoma – vascular endothelial growth factor A – epithelial-mesenchymal transition

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



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

Obdrženo/Submitted: 6. 5. 2016

Přijato/Accepted: 19. 5. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164512>

## Úvod

Neléčitelné rozšíření metastáz, nikoliv samotný primární nádor, je příčinou více než 90 % úmrtí onkologických pacientů [1]. Metastazování představuje proces přemístění nádorových buněk z místa primárního nádoru, dávající vznik novým ložiskům na vzdálených místech. Jedná se o vícestupňový proces, jehož jednotlivé kroky zahrnují uvolnění buněk z primárního nádoru, intravazaci do krevního nebo lymfatického oběhu, přežití buněk v oběhu, extravazaci v sekundárním místě, tvorbu mikrometastáz a nakonec klinicky detekovatelných, vaskularizovaných a rostoucích makrometastáz. Předmětem intenzivního výzkumu posledních let je také otázka, kdy přesně se metastazující buňky z primárního nádoru uvolní a proniknou do cílové tkáně. Jak naznačují výsledky, u jednotlivých typů nádorů se situace jeví odlišně. Původní představa lineárního vývoje nádoru a pozdního vzniku metastazujících buněk zřejmě odpovídá skutečnosti v případě adenokarcinomů plic a slinivky [2]. U jiných typů karcinomů, obzvláště pak u karci-

nomů prsu, jsou však metastázy běžně diagnostikovány roky až desítky let po odstranění primárního nádoru. K diseminaci buněk tedy zřejmě dochází velmi brzy, v pre-maligní fázi onemocnění, tyto buňky se po různě dlouhém období dormance v osídlené tkáni dále vyvíjejí nezávisle a od buněk primárního nádoru se svými genetickými změnami významně liší [3].

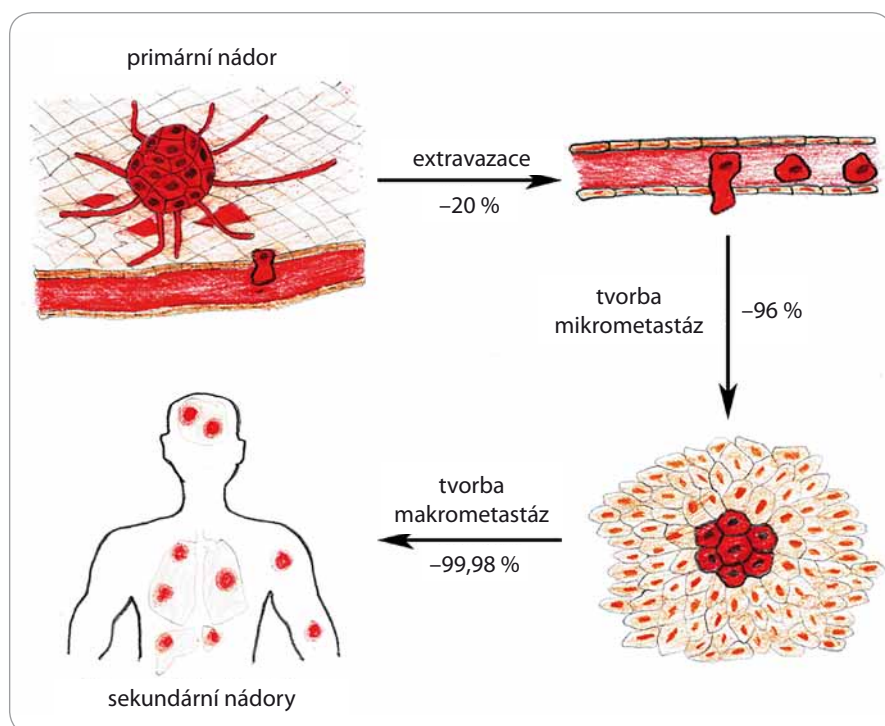
Experimentální studie ukazují, že zatímco až 80 % buněk, které se uvolnily z primárního nádoru, projde úspěšně prvními kroky až po extravazaci (vč.), jen asi 2–4 % těchto buněk iniciuje růst mikrometastáz a ještě menší část z nich, méně než 0,02 %, v novém prostředí přežijí a dají vznik makrometastázám [4]. Tyto poslední dva kroky jsou tedy při vývoji makrometastáz kritické a jen malá část buněk s vhodnými vyselektovanými vlastnostmi jimi úspěšně projde (obr. 1). Tato hypotéza je podpořena klinickými studiemi ukazujícími, že přestože může být u pacientů v krvi i v tkáních vzdálených od primárního nádoru detekováno velké množství diseminovaných nádorových buněk, jen velmi malému

procentu z nich se podaří založit makrometastázy [5,6]. Jednotlivé fáze metastatického procesu a změny chování nádorových či s nádorem asociovaných buněk budou v následujících kapitolách popsány podrobněji.

## Lokální invaze

Rozrůstající se primární karcinom je obklopen sousedícími nenádorovými buňkami a od pojivové tkáně je oddělen bazální membránou. Invazivní nádorové buňky musí nejprve uvolnit kontakty s okolními buňkami a se složkami extracelulární matrix (ECM). Kontakty s okolními buňkami jsou z podstatné části zajišťovány proteinem E-cadherinem a snížení jeho hladiny je spojeno s progresí nádoru a zhoršeným přežitím např. u pacientek s karcinomem prsu [7]. Snížení hladiny proteinů spojených s epiteliálním fenotypem buněk (E-cadherin, claudin-1, cytokeratiny) a naopak zvyšování hladiny proteinů podporujících mezenchymální charakter (N-cadherin, fibronectin, vimentin) je znakem epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), tj. procesu, který umožní přeměnu nepohyblivých epiteliálních buněk dlaždicovitého tvaru ve vřetenovité, elastické a migrace schopné buňky mezenchymálního typu [8]. Tyto buňky jsou navíc rezistentní k indukci buněčné smrti způsobené ztrátou kontaktů s ECM a okolními buňkami (tzv. anoikis) [9]. EMT je indukována mnoha signálními drahami, aktivovanými např. ligandy TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), EGF (epidermal growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin-like growth factor), Wnt, Notch [10], hypoxií [11], prozánětlivými cytokiny nebo mechanickými faktory, jako je hustota ECM [12]. Tyto signální dráhy vedou k aktivaci některého z transkripčních faktorů TWIST1, SNAI1, SNAI2 (SLUG), ZEB1, ZEB2 (SIP1), Brachyury, Goosecoid, SIX1 a PRRX1, jež přímo nebo nepřímo reprimují expresi E-cadherinu a dalších s EMT asociovaných cílových proteinů [13].

EMT podporuje také aktivaci a sekreci metaloproteináz (MMP), serinových proteáz a katepsinů, a tím narušení kontaktu buněk se složkami ECM zprostředkované nejrůznějšími povrchovými



**Obr. 1. Selekcí v průběhu metastatické kaskády.**

Jednotlivé fáze metastazování připomínají darwinovskou selekci s nejkritičtějším kroky v závěru celého procesu, kdy se nádorové buňky musí adaptovat v novém prostředí a iniciovat proliferaci.

proteiny [14]. Tyto proteinázy jsou produkovány i s nádorem asociovanými stromálními buňkami, především fibroblasty, jež tak přispívají k uvolnění nádorových buněk z místa primárního nádoru [15,16]. Jednotlivé uvolněné buňky pak mohou migrovat dvěma způsoby, buď mezenchymálním pohybem, který je závislý na aktivitě proteáz, nebo améboidním pohybem, který je na aktivitě proteáz závislý v menší míře, případně mezi těmito dvěma způsoby přecházet, jak bylo popsáno např. u buněk melanomu [17]. Kromě jednotlivých buněk migrují nádorové buňky často v klastrech a tento způsob se může dokonce vyznačovat vyšší efektivitou migrace [18].

I v pozdějších stádiích ovlivňuje EMT efektivitu metastatického procesu, protože může vést ke vzniku celé řady přechodných epiteliálně/mezenchymálních fenotypů buněk lišících se svými invazivními a metastatickými schopnostmi, které mohou organizmem cestovat v klastrech, spolupracovat a zvyšovat tak úspěšnost při diseminaci a zakládání vzdálených metastáz [19]. Epiteliální charakter metastáz naznačuje, že proces EMT je reverzibilní a že v pozdějších stádiích diseminace dochází naopak k mezenchymálně-epiteliální transici (MET) [20].

### **Intravazace a přežití v krevním oběhu**

Přechod přes stěnu cév, tzv. transendoteliální migrace (TEM), je nezbytným krokem diseminace nádorových buněk. Vstup do cévy (intravazace) je poněkud usnadněn angiogenezí, kterou primární nádor indukuje, protože stěny nových kapilár mají obecně slabší mezibuněčné spoje [21]. Paracelulární vstup do krevního řečiště se děje přes přechodně uvolněné mezibuněčné spoje. Rozvolnění mezibuněčných spojů je indukováno např. TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), EGF, VEGF (vascular endothelial growth factor), CSF-1 (colony stimulating factor-1) či TGF- $\beta$ , které jsou sekretovány s tumorem asociovanými makrofágy nebo samotnými nádorovými buňkami [4]. Rozrušení endoteliálních mezibuněčných spojů je také důsledkem aktivity proteáz, např. MMP1 (ště-

pící protease-activated receptor 1), MMP2 nebo ADAM12 (štěpící vascular endothelial cadherin a angiopoietin 1 receptor) [22]. *In vitro* byl pozorován i alternativní typ intravazace, tzv. transcelulární, který je umožněn remodelací membrán a cytoskeletonu endoteliální buňky v místě jejího kontaktu s buňkou nádorovou. Calmodulinovou signalizací je aktivována kináza MLCK (myosin light chain kinase), v důsledku čehož dochází ke kontrakci actomyozinu. Vznikají přechodné pórovité struktury, kterými nádorová buňka pronikne přes endoteliální buňku [23].

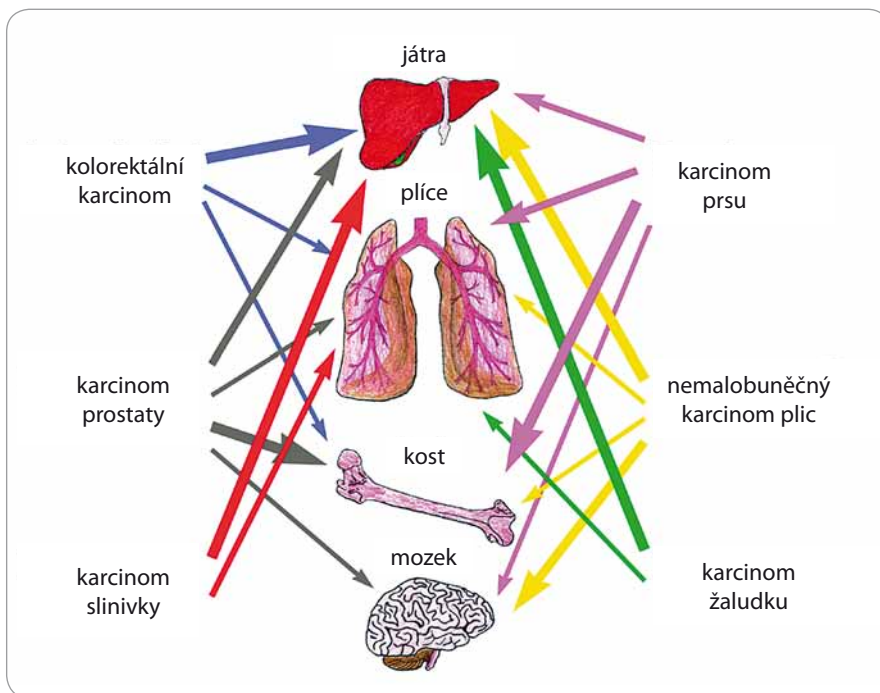
Po úspěšném průniku do krevního řečiště se cirkulující nádorová buňka (circulating tumor cell – CTC) ocitne v nepřátelském mikroprostředí, kde se musí vyrovnat s hemodynamickými silami krevního proudu, aktivitou imunitních buněk či s nedostatkem živin. Některé studie ukazují, že maligní buňky jsou k fyzikální zátěži krevním proudem odolnější a dokážou se na něj adaptovat rychleji než netransformované epiteliální buňky [24]. Hlavním obranným mechanismem nádorových buněk je jejich spolupráce s aktivovanými krevními destičkami, které CTC obklopi a fungují jako ochranný štít před možným mechanickým poškozením turbulencemi v krevním řečišti [25]. Pro-koagulační kaskádu podporují nádorové buňky sekrecí TF (tissue factor) a expresí receptorů Par1, Par2 a fosfatidylserinu na svém povrchu [26,27]. Důsledkem celého procesu je vznik agregátů nádorových buněk a krevních destiček propojených fibrinovými vlákny navázanými prostřednictvím integrinů na povrch obou typů buněk. Tyto agregáty rovněž poskytují nádorovým buňkám ochranu před buňkami imunitního systému, obzvláště NK buňkami [28]. Funkční studie na zvířecích modelech prokázaly, že přítomnost/nepřítomnost destiček v oběhu je pro tvorbu vzdálených metastáz poměrně zásadní [27,29].

### **Tkáňový tropizmus a extravazace**

Mezi dvě základní hypotézy tkáňového tropizmu metastáz patří hypotéza založená na kompatibilitě nádorové buňky a osídlované tkáně a hypotéza hemodynamická/mechanická. První vyslovil

již před více než 120 lety Stephen Paget a je známá pod výstižným názvem „seed and soil“ hypotéza. Předpokládá, že konkrétní nádorová buňka se může usídlit a začít proliferovat jen v místě, které ji svým mikroprostředím vyhovuje [30]. „Mechanický“ koncept naproti tomu zdůrazňuje roli fyzického zachycení cirkulujících nádorových buněk v kapilárách optimálního průměru a proudění krve [31]. K extravazaci nádorových buněk totiž dochází typicky v malých kapilárách podobného průměru, jako mají buňky samotné, což naznačuje, že i mechanické zachycení napomáhá pozdější tvorbě stabilních vazeb pomocí povrchových molekul [32]. V některých orgánech (kostní dřev, játra, slezina) jsou kapiláry sinusoidní, s kolísající průsvitností, širokými štěrbinami mezi endotelovými buňkami a řídkým pojivovým obalem, které jsou pro cirkulující nádorové buňky snadno prostupné [33]. Naopak v dalších orgánech je endotelová vrstva kompaktní a brání snadnému průniku buněk. Přesto fakt, že karcinomy konkrétního typu metastazují přednostně do určitých orgánů (tkáňový tropizmus), ukazuje, že propustnost cév není jediným rozhodujícím faktorem při diseminaci nádorových buněk. Dokonce i podtypy jednotlivých karcinomů se svým tkáňovým tropizmem mohou odlišovat. Kostí jsou nejobvyklejším místem vzniku metastáz u všech subtypů prsních karcinomů s výjimkou bazálního, který nejčastěji metastazuje do plic. Přítomnost HER2 (human epidermal growth factor receptor) je zase asociovaná se zvýšenou frekvencí vzniku metastáz v mozku, játrech a plicích [34,35]. Příklady tkáňového tropizmu nejčastějších typů karcinomů jsou znázorněny na obr. 2.

Některé z těchto příkladů preferenčních metastatických míst mohou být vysvětleny kompatibilitou chemokinů v cílové tkáni a expresí odpovídajících receptorů na povrchu nádorových buněk. Chemokiny jsou malé cytokiny, které indukují migraci buněk a aktivují signální dráhy regulující adhezi a remodelaci cytoskeletonu. Zřejmě nejlépe prozkoumaným příkladem je CXCL12 (CXCL12) sekretovaný stromálními buňkami, který působí jako chemoatraktant na nádorové buňky



**Obr. 2. Tkáňový tropismus.**

Různé typy karcinomů a cílové tkáně, do nichž nejčastěji metastazují. Frekvence metastáz je znázorněna silou jednotlivých šipek.

exprimující receptory CXCR4 a CXCR7 (s G-proteinem spojené receptory). Tato vzájemná interakce také napomáhá adhezi CTC k endoteliálním buňkám, podporuje extravazaci a následně i ukotvení k ECM a stromálním buňkám. Význam receptoru CXCR4 pro metastazování nádorů prsu, prostaty, plic, kolorekta a mnoha dalších byl potvrzen řadou studií [36–38]. Inhibice interakce CXCR4-CXCL12 *in vivo* vedla k významnému snížení metastazování nádorových buněk prsu do lymfatických uzlin a plic [39]. Další příklady chemokinů a jejich receptorů ve vývoji metastatického onemocnění, vč. tkáňově specifitějších interakcí, jsou shrnuty v podrobnějších přehledových člancích [40–42].

Jak již bylo zmíněno, chemokiny a jejich odpovídající receptory napomáhají diseminaci CTC nejen mechanismem chemoatrakce, ale podporují i následnou adhezi k endoteliálním buňkám, extravazaci a osídlení nového místa v přilehlých tkáních. Pro adhezi CTC na stěny kapilár jsou dále důležité membránové proteiny, především ty interagující s receptory na povrchu endoteliálních buněk, kde se nachází mj. selektiny nebo VCAM1 (vascular cell adhesion mo-

lecule) [43]. Mezi tyto proteiny exprimované na povrchu nádorových buněk patří např. E-selectin/L-selectin ligand (HCELL), P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL1), CD44, CD24, mucin 1 (MUC1) a integriny [44,45]. U buněk karcinomu prsu metastazujících do plic byl detekován povrchový protein metadherin, který zprostředkovává specifickou vazbu mezi nádorovou buňkou a buňkami plicního endotelu [46].

Po vytvoření kontaktů s endoteliálními buňkami musí nádorová buňka znovu přejít přes stěnu cév, přičemž si pomáhá expresí proteinů zvyšujících permeabilitu cév. Rozvolnění mezibuněčných spojů je opět indukováno sekretovanými faktory zvyšujícími permeabilitu cévních stěn, např. VEGF, který vede k disociaci komplexu VE-cadherinu a  $\beta$ -cateninu [47], TGF- $\beta$ , indukující tvorbu angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) [48] nebo SPARC (secreted protein, acidic, rich in cysteine), který vazbou na VCAM1 aktivuje signální dráhu p38-MAPK [49]. Při extravazaci nádorových buněk se často uplatňují i imunitní buňky. Bylo prokázáno, že chemokin CCL2 produkovaný nádorovými buňkami v plicních kapilárách přitahuje zánětlivé monocytů a ty následně sekreci

VEGF podporují extravazaci nádorových buněk [50]. Všechny tyto interakce vedou k reorganizaci cytoskeletonu endoteliálních buněk a k uvolnění jejich mezibuněčných spojů.

### Osídlení pre-metastatické niche, dormance a reaktivace

Po úvodních krocích metastatické kaskády, kterými je schopna projít většina z invazivních nádorových buněk, přichází kritické části – osídlení nové tkáně a obnovení proliferace vedoucí ke tvorbě makrometastáz. Ještě předtím, než dorazí první metastatické buňky, může být mikroprostředí v cílové tkáni ovlivněno primárním nádorem. Buňky primárního nádoru podporují tvorbu tzv. pre-metastatické niche tím, že do cirkulace sekretují různé cytokiny či růstové faktory [51]. Mezi jinými k tvorbě pre-metastatické niche u různých typů nádorových buněk přispívají VEGF, placental-growth factor (PIGF), TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , lysyl oxidase (LOX), versican nebo granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). Tyto faktory ovlivňují vlastnosti stromálních buněk a ECM v cílové tkáni, případně mobilizují jiné podpůrné buňky (např. makrofágy z kostní dřeně) k jejich přemístění a přeměně mikroprostředí na příznivější pro diseminované nádorové buňky [52]. Z primárního nádoru jsou uvolňovány také exozomy, detailně byl popsán např. jejich vliv na jaterní metastazování buněk adenokarcinomu slinivky. Exozomy uvolňované z buněk primárního nádoru obsahující faktor MIF (macrophage migration inhibitory factor) byly pohlceny Kupferovými buňkami, které poté začaly sekretovat TGF- $\beta$  a přitahovat makrofágy podílející se dále na přípravě pre-metastatické niche [53].

Přes tyto předem indukované změny jsou novému prostředí nádorové buňky bezprostředně po jeho dosažení jen málo přizpůsobeny a často je u nich indukována buněčná smrt. U mnoha pacientů s karcinomy prostaty, prsu, ledvin nebo s melanomem však dochází k relapsu onemocnění po letech, někdy i desítkách let od odstranění primárního nádoru. Klinické studie prokázaly, že diseminované nádorové buňky jsou přítomny v kostní dřeni pacientek s prsními karcinomy již v raném stadiu [54]. Toto

klinické pozorování bylo vysvětleno zpomalením fyziologických procesů a zastavením proliferace diseminovaných nádorových buněk, tedy navozením tzv. dormance [55]. Zastavení proliferace je důsledkem nedostatečné kompatibility nádorové buňky a mikroprostředí, kdy díky odlišnému složení ECM a jiným typům stromálních buněk, než byly v místě primárního nádoru, není vytvořeno s okolím dostatečné množství kontaktů. Přežití buněk ve stadiu dormance je podporováno vyšší aktivitou stresových signálních drah, např. fokální adhezivní kinázy (FAK) [56], Src [57], ERK/p38 či Akt [58]. Tyto dráhy jsou aktivovány prostřednictvím povrchových proteinů a receptorů, např. integrinu  $\beta 1$ , CXCR4 nebo VCAM1, v závislosti na tom, v jaké tkáni se buňka nachází [59,60]. Dalším důvodem k tomu, že se mikrometastázy v novém místě nezvětšují, může být i zvýšená frekvence odumírání způsobená nedostatečnou vaskularizací proliferující nádorové tkáně [61]. Rovněž aktivní represe mikrometastáz ze strany stromálních buněk, např. prostřednictvím BMP proteinů, byla popsána v *in vivo* modelu dormantních buněk prsního karcinomu metastazujících do plic [62].

K reaktivaci proliferace dormantních buněk napomáhá obnovení mezibuněčných kontaktů a parakrinní signalizace se stromálními buňkami. Do plic metastazující buňky prsního karcinomu produkují ve zvýšeném množství protein Tenascin C, složku ECM, která podporuje Notch a Wnt signalizaci [63]. Nádorové buňky dále sekretují TGF- $\beta 3$ , který stimuluje stromální buňky ke zvýšené tvorbě periostinu, jenž po vazbě na Wnt ligand aktivuje Wnt signalizaci [64]. Notch/Wnt signální dráha podporuje průchod buněčným cyklem prostřednictvím proteinů Myc a cyklin D1. TGF- $\beta 1$  sekretovaný dormantními buňkami prsního karcinomu v plicích mikrometastázách zase u stromálních buněk indukuje tvorbu kolagenu 1, který podporuje přechod z dormantního do proliferativního stavu aktivací integrin  $\beta 1$  signální dráhy [65]. Represe proliferace způsobená vazbou BMP proteinů stromálního původu na receptory nádorových buněk je např. u buněk prsního karcinomu

v plicích mikrometastázách zablokována sekrecí BMP inhibitoru Coco [62]. Proliferaci podporuje rovněž zvýšené množství růstových faktorů v prostředí, jejichž důležitým zdrojem jsou infiltrující imunitní buňky původem z kostní dřene. Infiltraci podporují faktory uvolňované nádorovými buňkami, jako jsou osteopontin nebo CXCL12 [66,67]. Na těchto příkladech jsou demonstrovány některé mechanismy, kterými může nádorová buňka přejít ze stadia dormance do proliferace a dát vznik klinicky detekovatelným makrometastázám. Jaké faktory přesně rozhodují o čase, kdy se tak stane, a které signální dráhy jsou pro tento proces nejpodstatnější, však ještě není příliš známo, i když výzkum v této oblasti je v posledních letech stále intenzivnější.

### Závěr

Přestože jen velmi malé procento nádorových buněk disponuje vlastnostmi, které jsou nezbytné k úspěšné kolonizaci vzdálené tkáně, jsou metastázy jednou z nejčastějších příčin úmrtí onkologických pacientů. V nádorových buňkách se postupně hromadí genetické a epigenetické změny zvyšující jejich invazivitu, rezistenci k buněčné smrti, adaptabilitu a další schopnosti umožňující jim úspěšně projít všemi kroky metastatické kaskády. Nádorové buňky, ať už v místě primárního nádoru, nebo vzdálených metastáz, jsou obklopeny stromálními buňkami, žírnými buňkami, makrofágy a dalšími buňkami imunitního systému. Jejich vzájemná komunikace zprostředkovaná povrchovými molekulami a cytokiny aktivuje různé intracelulární signální dráhy, často dále napomáhající k rozvoji a diseminaci nádorového onemocnění. Intenzivní výzkum těchto komplexních procesů snad povede k identifikaci klíčových molekul, na které by se mohl v budoucnu zaměřit vývoj nových terapeutik.

### Poděkování

Děkujeme JUDr. Ivaně Veselé za provedení ilustrací do obr. 1 a 2.

### Literatura

- Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127(4): 679–695.
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4): 274–284. doi: 10.1038/nrc2622.

- Kozłowski J, Kozłowska A, Kocki J. Breast cancer metastasis – insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2015; 69: 447–451.
- Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011; 147(2): 275–292. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.024.
- Tarin D, Price JE, Kettlewell MG et al. Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res* 1984; 44(8): 3584–3592.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8): 563–572.
- Gould Rothberg BE, Bracken MB. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100(2): 139–148.
- Heerboth S, Housman G, Leary M et al. EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med* 2015; 4: 6–19. doi: 10.1186/s40169-015-0048-3.
- Rennebeck G, Martelli M, Kyprianou N. Anoikis and survival connections in the tumor microenvironment: is there a role in prostate cancer metastasis? *Cancer Res* 2005; 65(24): 11230–11235.
- Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(2): 131–142.
- Zhang L, Huang G, Li X et al. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of Snail1 by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2013; 13: 108–117. doi: 10.1186/1471-2407-13-108.
- Kumar S, Das A, Sen S. Extracellular matrix density promotes EMT by weakening cell-cell adhesions. *Mol Biosyst* 2014; 10(4): 838–850. doi: 10.1039/c3mb70431a.
- Sanchez-Tillo E, Liu Y, de Barrios O et al. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(20): 3429–3456. doi: 10.1007/s00018-012-1122-2.
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011; 278(1): 16–27. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x.
- Almholt K, Johnsen M. Stromal cell involvement in cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003; 162: 31–42.
- Sloane BF, Sameni M, Podgorski I et al. Functional imaging of tumor proteolysis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 301–315.
- Taddei ML, Giannoni E, Morandi A et al. Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Commun Signal* 2014; 12: 24–36. doi: 10.1186/1478-811X-12-24.
- Kumar S, Kapoor A, Desai S et al. Proteolytic and non-proteolytic regulation of collective cell invasion: tuning by ECM density and organization. *Sci Rep* 2016; 6: 19905–19922. doi: 10.1038/srep19905.
- Jolly MK, Boaretto M, Huang B et al. Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. *Front Oncol* 2015; 5: 155–174. doi: 10.3389/fonc.2015.00155.
- Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev* 2013; 27(20): 2192–2206. doi: 10.1101/gad.225334.113.
- Siemann DW. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by tumor-vascular disrupting agents. *Cancer Treat Rev* 2011; 37(1): 63–74. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.05.001.
- Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(12): 858–870. doi: 10.1038/nrc3628.
- Khuon S, Liang L, Dettman RW et al. Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast



- cancer cells through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 3): 431–440. doi: 10.1242/jcs.053793.
24. Barnes JM, Nauseef JT, Henry MD. Resistance to fluid shear stress is a conserved biophysical property of malignant cells. *PLoS One* 2012; 7(12): e50973. doi: 10.1371/journal.pone.0050973.
25. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(2): 123–134. doi: 10.1038/nrc3004.
26. Liu Y, Jiang P, Capkova K et al. Tissue factor-activated coagulation cascade in the tumor microenvironment is critical for tumor progression and an effective target for therapy. *Cancer Res* 2011; 71(20): 6492–6502. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1145.
27. Camerer E, Qazi AA, Duong DN et al. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 2004; 104(2): 397–401.
28. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005; 105(1): 178–185.
29. Karparkin S, Pearlstein E, Ambrogio C et al. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J Clin Invest* 1988; 81(4): 1012–1019.
30. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1889; 8(2): 98–101.
31. Weiss L. Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin Exp Metastasis* 1992; 10(3): 191–199.
32. Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 2010; 16(1): 116–122. doi: 10.1038/nm.2072.
33. Lorusso G, Rüegg C. New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* 2012; 22(3): 226–233. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.03.007.
34. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2010; 28(20): 3271–3277. doi: 10.1200/JCO.2009.25.9820.
35. Soni A, Ren Z, Hameed O et al. Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases. *Am J Clin Pathol* 2015; 143(4): 471–478. doi: 10.1309/AJCPY05F5V3UPEXS.
36. Furusato B, Mohamed A, Uhlen M et al. CXCR4 and cancer. *Pathol Int* 2010; 60(7): 497–505. doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02548.x.
37. Cavallaro S. CXCR4/CXCL12 in non-small-cell lung cancer metastasis to the brain. *Int J Mol Sci* 2013; 14(1): 1713–1727. doi: 10.3390/ijms14011713.
38. Li YM, Pan Y, Wei Y et al. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 2004; 6(5): 459–469.
39. Müller A, Homey B, Soto H et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410(6824): 50–56.
40. Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I et al. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* 2013; 4(12): 2171–2185.
41. Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 2006; 79(4): 639–651.
42. Géraud C, Koch PS, Damm F et al. The metastatic cycle: metastatic niches and cancer cell dissemination. *J Dtsch Dermatol Ges* 2014; 12(11): 1012–1019. doi: 10.1111/ddg.12451.
43. Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol* 2012; 2012: 676731–676741.
44. Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL et al. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25(4): 305–324.
45. Kobayashi H, Boelte KC, Lin PC. Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. *Curr Med Chem* 2007; 14(4): 377–386.
46. Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell* 2004; 5(4): 365–374.
47. Weis S, Cui J, Barnes L et al. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol* 2004; 167(2): 223–229.
48. Padua D, Zhang XH, Wang Q et al. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 2008; 133(1): 66–77. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.046.
49. Tichet M, Prod'Homme V, Fenouille N et al. Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun* 2015; 6: 6993–7008. doi: 10.1038/ncomms7993.
50. Qian BZ, Li J, Zhang H et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011; 475(7355): 222–225. doi: 10.1038/nature10138.
51. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438(7069): 820–827.
52. Sceneay J, Smyth MJ, Moller A. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev* 2013; 32(3–4): 449–464. doi: 10.1007/s10555-013-9420-1.
53. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* 2015; 17(6): 816–826. doi: 10.1038/ncb3169.
54. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(5): 329–340. doi: 10.1038/nrc2375.
55. Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(1): 80–85.
56. Shibue T, Weinberg RA. Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(25): 10290–10295. doi: 10.1073/pnas.0904227106.
57. Barkan D, El Touny LH, Michalowski AM et al. Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. *Cancer Res* 2010; 70(14): 5706–5716. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2356.
58. Giancotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell* 2013; 155(4): 750–764. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.029.
59. Zhang XH, Wang Q, Gerald W et al. Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals. *Cancer Cell* 2009; 16(1): 67–78. doi: 10.1016/j.ccr.2009.05.017.
60. Chen Q, Zhang XH, Massagué J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 538–549. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.025.
61. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1(2): 149–153.
62. Gao H, Chakraborty G, Lee-Lim AP et al. The BMP inhibitor Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites. *Cell* 2012; 150(4): 764–779. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.035.
63. Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH et al. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med* 2011; 17(7): 867–874. doi: 10.1038/nm.2379.
64. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 2012; 481(7379): 85–89. doi: 10.1038/nature10694.
65. Barkan D, Chambers AF. Beta1-integrin: a potential therapeutic target in the battle against cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 2011; 17(23): 7219–7223. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0642.
66. McAllister SS, Gifford AM, Greiner AL et al. Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell* 2008; 133(6): 994–1005. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.045.
67. Hiratsuka S, Duda DG, Huang Y et al. C-X-C receptor type 4 promotes metastasis by activating p38 mitogen-activated protein kinase in myeloid differentiation antigen (Gr-1)-positive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(1): 302–307. doi: 10.1073/pnas.1016917108.

# Mechanismy regulace proteinové homeostázy ve vývoji nádorových onemocnění

## Mechanisms of Protein Homeostasis Regulation in Cancer Development

Trčka F., Müller P., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Proteom eukaryotické buňky představuje komplexní systém, jehož složky jsou vystaveny nepříznivým vlivům vnitřního a vnějšího prostředí. Funkce buněčného proteomu je tudíž závislá na existenci kompenzačních mechanismů udržujících vnitřní proteinovou homeostázu – proteostázu. K těmto mechanismům náleží síť molekulárních chaperonů a transkripční program řídící jejich syntézu. Proces kancerogeneze je provázen výraznými změnami faktorů vnitřního prostředí nádorových buněk – teplota, pH, dostupnost živin. Tyto změny představují na jedné straně důsledek deregulovaného růstu nádorové tkáně a na straně druhé mohou být zdrojem selekčního tlaku, který umožňuje vznik rezistentních a agresivních populací nádorových buněk. Popis složek proteostatického aparátu a mechanismus jejich zapojení ve vývoji nádorové tkáně jsou předmětem tohoto přehledového článku. **Cíl:** Tento přehledový článek se věnuje popisu dvou kauzálně propojených skupin proteostatických dějů, jejichž vzájemná koordinace je klíčová pro průběh odpovědi nádorové buňky a potažmo i celé nádorové tkáně na environmentální i vnitřní stresové faktory. První skupina těchto dějů je zastoupena „vykonavatelskou“ úlohou molekulárních chaperonů z rodiny HSP70, HSP90 a tzv. malých molekulárních chaperonů. Tyto proteiny se podílejí na udržování stability buněčných proteinů nezbytných pro regulaci proliferace, apoptózy, senescence, migrace a fenotypové plasticity nádorových buněk. K druhé skupině popisovaných dějů pak náleží posttranslační řízení „systémové“ úlohy transkripčního faktoru HSF1 při regulaci exprese genů pro molekulární chaperony a dalších genů specificky regulovaných tímto transkripčním faktorem v nádorových a stromálních buňkách.

### Klíčová slova

molekulární chaperony – heat-shock factor 1 – rakovina – proteinová homeostáza

### Summary

**Background:** The proteome of eukaryotic cells represents a complex system. Its components are exposed to various intrinsic and extrinsic stresses. Therefore, the function of the cellular proteome is dependent on the existence of compensatory mechanisms balancing the inner protein homeostasis – proteostasis. These mechanisms involve the network of molecular chaperones and transcriptional program regulating their expression. The process of cancerogenesis is accompanied by significant changes in the intracellular milieu of cancer cells – temperature, pH, availability of nutrients. On the one hand, these changes represent a consequence of the deregulated growth of the tumor tissue; on the other hand, they can be a source of selection pressure, which allows the emergence of resistant and aggressive tumor cell populations. Description of the proteostatic apparatus components and the mechanism of their involvement in the tumor tissue development is provided in this review article. **Aim:** This review focuses on the description of two causally linked groups of proteostatic events; their mutual coordination is crucial to the process of tumor cell and by extension the entire tumor tissue response to environmental and internal stress factors. The first group of these processes is represented by the “executory” role of molecular chaperones from HSP70, HSP90 and so-called small molecular chaperone protein families. These proteins are involved in maintaining stability of cellular proteins essential for proliferation, apoptosis, senescence, migration and phenotypic plasticity of tumor cells. The second group of the described processes comprises the posttranslational control of the “systemic” role of the transcription factor HSF1 in regulating the gene expression of molecular chaperones and other genes specifically regulated by this transcription factor in the tumor and stromal cells.

### Key words

molecular chaperones – heat-shock factor 1 – cancer – protein homeostasis

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Filip Trčka, Ph.D.

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

Obdrženo/Submitted: 15. 5. 2016

Přijato/Accepted: 25. 5. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164518>

## Úvod

Proteinová homeostáza nebo také proteostáza je souhrnné označení molekulárních dějů podílejících se na udržení balancovaného stavu buněčného proteomu [1]. Mezi procesy, jejichž průběh je regulován proteostatickým buněčným aparátem, patří zejména syntéza proteinů na ribozomech, jejich skládání, intracelulární transport a konečně degradace. Homeostáza intracelulárního proteinového prostředí je za fyziologických podmínek udržována konstitutivní syntézou proteinů tepelného šoku (heat-shock proteins – HSP). HSP proteiny představují molekulární chaperony („gardedámy“, doprovod) napomáhající skládání sekundárních, terciárních i kvarterních proteinových struktur, umožňují transport proteinů, jejich modifikace typu ubiquitinace a také jejich řízenou degradaci v proteazomu [2]. Překročení proteostatické kapacity HSP proteinů vlivem vnějších či vnitřních faktorů vyvolává v buňce stav proteotoxického stresu provázený akumulací/agregací poškozených a nedegradovaných proteinů [3]. Proteotoxický stres aktivuje evolučně konzervovaný transkripční program, v jehož důsledku dochází k silné indukcii exprese molekulárních chaperonů [4,5]. Tento transkripční program se nazývá heat-shock response (HSR) a je řízen skupinou sekvenčně příbuzných transkripčních faktorů HSF (heat-

-shock factor). Klíčovým členem (master regulator) této rodiny transkripčních faktorů je protein HSF1 [6]. Inhibice aktivity HSF1 vede k narušení indukce HSR a činí buňky vysoce senzitivními k proteotoxickému stresu [7,8]. Buňky s inaktivovaným genem pro protein HSF1 nejsou schopny indukovat expresi HSP70 při zvýšení intracelulární teploty, což vede k jejich snížené termotoleranci a indukcii apoptózy [7].

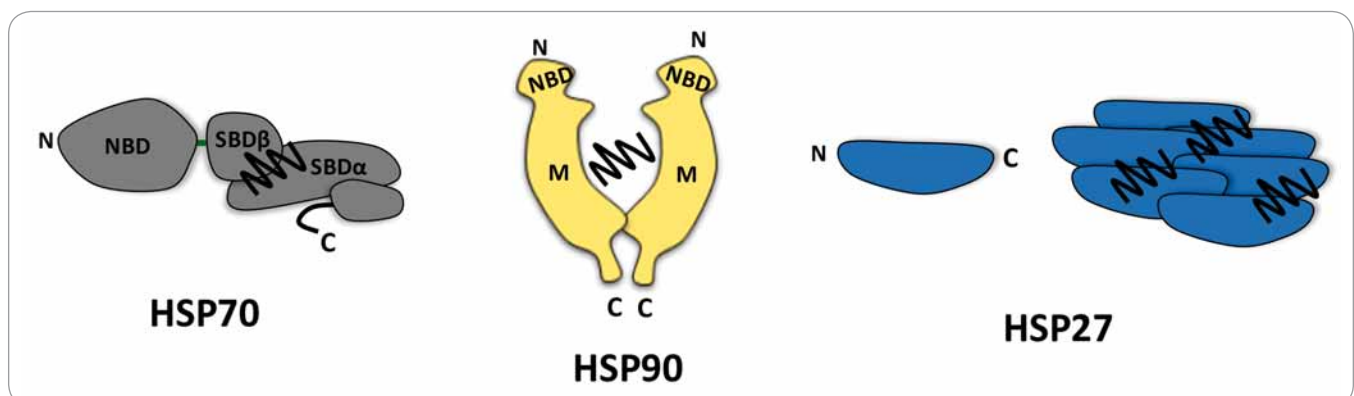
Zvýšená anabolická aktivita, mutační a metabolická zátěž představují významné zdroje proteotoxického stresu provázejícího proces maligní transformace a následné proliferace nádorové tkáně [9–11]. V nádorových buňkách byla prokázána zvýšená hladina HSP proteinů a stejně tak konstitutivní aktivace transkripčního faktoru HSF1 v důsledku chronického narušení homeostázy vnitrobuněčného prostředí [12,13]. Způsob, jakým jsou výše popsané složky proteostatického aparátu (HSP a HSF1) zapojeny v procesu kancerogeneze, bude detailněji popsán v následujících odstavcích.

## HSP – molekulární chaperony

V souvislosti se stresem indukovaným v nádorových buňkách se zaměříme na popis dvou skupin molekulárních chaperonů, které se liší mechanismem svého působení (obr. 1).

První skupinou jsou HSP proteiny s multidoménnou strukturou vyžadující ke

své aktivitě enzymatickou konverzi molekul ATP. Tato skupina chaperonů je reprezentována evolučně konzervovanými proteiny HSP70 a HSP90 (výskyt už v prokaryotech, sekvenční konzervovanost s lidskými proteiny je až 50 %) [14,15], jejichž klidová hladina v buňce dosahuje v případě HSP90 až 1–2 % celkového proteomu [16,17]. Strukturálně jsou proteiny HSP70/HSP90 definovány přítomností nukleotid a substrát vázajících domén, jejichž vazebná aktivita je obousměrně alostericky regulována [18,19]. Výrazná konformační flexibilita těchto alostericky aktivních proteinů řízená hydrolyzou ATP představuje mechanistickou podstatu jejich úlohy jakožto molekulárních chaperonů. Avšak zatímco protein HSP70 váže svou substrátovou doménou krátké hydrofobní sekvence existujících či nově tvořených proteinů, čímž zabraňuje jejich denaturaci a agregaci [20], molekulární chaperon HSP90 postrádá přesně definovaný vazebný motiv ve struktuře svých substrátů a přednostně kontaktuje konformačně nestabilní proteiny typu receptorů pro steroidní hormony nebo protein kináz [21–23]. Je nutné poznamenat, že ATP závislý chaperonový cyklus, selekce substrátů a také lokalizace HSP70 a HSP90 v buňce jsou významně ovlivňovány přítomností celé řady tzv. ko-chaperonů, tedy proteinů asociovaných s těmito molekulárními chaperony [24].



**Obr. 1. Molekulární chaperony HSP70, HSP90 a HSP27.**

Molekulární chaperony HSP70 a HSP90 se vyznačují vícedoménnou strukturou. Vazba ATP do NBD (nucleotide-binding domain) chaperonu HSP70 vede k alosterickým změnám v SBDαβ (substrate-binding domain), které ovlivňují uvolňování navázaného substrátu (vlnovka). Protein HSP90 tvoří konstitutivní dimer. Substrát vázající místo není u tohoto chaperonu přesně definováno, avšak konformační změny HSP90 jsou indukovány vazbou ATP do NBD. Struktura HSP90 je dále tvořena střední (middle – M) a C-koncovou doménou (C-terminal domain – C). Chaperon HSP27 náležící k malým HSP proteinům nemá ATPázovou aktivitu a vykazuje homologii k αB-kristalinu. Tento chaperon je schopen tvořit oligomery, které se podílejí na zabraňování tvorby agregátů.

Druhou zde popisovanou skupinou molekulárních chaperonů jsou tzv. malé HSP proteiny. Na rozdíl od HSP70/HSP90 představují malé HSP proteiny molekulární chaperony se značně odlišnou aminokyselinovou sekvencí, strukturou i velikostí. Jejich společným rysem je přítomnost asi stoaminokyselinové domény homologní s doménou kanonického člena malých HSP proteinů  $\alpha$ B-krystatinu [25]. Tyto proteiny se nezávisle na ATP vážou na denaturované nebo nestrukturované oblasti proteinů a zabraňují jejich agregaci, čímž je udržují ve stavu kompetentním pro jejich zpracování ATP závislými chaperonovými systémy HSP70/HSP90 [26]. Mechanismus transferu substrátu mezi těmito skupinami chaperonových systémů je neznámý. Tyto HSP proteiny jsou nazývány malými, jelikož jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 10–40 kDa. Monomery o této velikosti se však organizují do rozsáhlých oligomerů čítajících až desítky podjednotek v reakci na tepelný šok [27]. Mezi nejznámější stresem indukované malé HSP chaperony patří proteiny HSP27 a  $\alpha$ B-krystatin [28].

### HSP proteiny a nádory

Proces maligní transformace buňky a vývoj metastazující nádorové tkáně je provázen řadou patologických změn v molekulárních mechanismech regulace buněčné proliferace, apoptózy, senescence, migrace a genomové stability označovaných souhrnně jako Hallmarks of cancer [29]. Proteostatické mechanismy řízené HSP proteiny sehrávají v těchto procesech důležitou roli.

Kontrola průchodu buněčným cyklem je u nádorových buněk porušena. Mezi klíčové molekuly řídící proliferaci soběstačnost transformovaných buněk patří zejména komponenty mitogenní signální kaskády spouštěné vazbou růstových faktorů k receptorovým tyrozinkinázám [30]. Deregulace některé ze složek mitogenní kaskády (zvýšená míra exprese, zvýšená aktivita, amplifikace genů, aktivační/inaktivační mutace) může mít onkogenní charakter [31,32]. Chaperon HSP90 se podílí na udržování aktivního stavu nukleárních receptorů steroidních hormonů [33,34]

a řady signalizačních molekul účastnících se mitogenní signalizace. Aktivační mutace onkogenních kináz EGFR a BRAF vedou k jejich strukturní nestabilitě a činí je výrazně závislými na přítomnosti HSP90 [35–38]. Další onkogenní kinázou stabilizovanou HSP90 je fúzní kináza BCR-ABL [39]. Rovněž virové kinázy v-Src, Fes, Fps a Yes vyžadují asistenci HSP90 [40,41]. Chaperon HSP90 zároveň stabilizuje buněčné kinázy CDK4, HCK a ERBB2 [42–44]. Obdobnou úlohu při regulaci proliferace nádorových buněk pravděpodobně hraje také protein HSP70, jehož inaktivace vede k inhibici proliferace myších nádorových buněk prsní žlázy [45,46]. Stabilizace onkogenních kináz chaperonem HSP90 a proteostatická aktivita HSP70 tak přispívají ke stimulaci mitogenní signalizace v nádorových buňkách.

Dalším znakem maligně transformované buňky je její schopnost nepodléhat programované buněčné smrti – apoptóze [47]. Ukazuje se, že stresem indukované chaperony HSP27 a HSP70 výrazně inhibují apoptotické signální dráhy svou interakcí s jejich proteinovými komponentami [48]. Protein HSP27 ovlivňuje apoptózu na více úrovních – inhibuje uvolňování cytochromu c a proteinu SMAC-Diablo z mitochondrií, tlumí aktivitu kaspázy 3 a 9 a také signalizaci zprostředkovanou ligandy Fas, TNF a TRAIL [49–52]. Chaperon HSP70 inhibuje apoptózu svou vazbou na protein Apaf-1, čímž zabraňuje tvorbě apoptozómu [53]. V nenádorové buňce tak chaperony HSP27 a HSP70 slouží jako homeostatický mechanismus tolerance určitého stupně proteotoxického stresu dříve, než je nenávratně aktivována programovaná buněčná smrt. Nádorová buňka naopak nadměrnou produkcí HSP27 a HSP70 zvyšuje svou rezistenci k cytotoxickým látkám inaktivací apoptotické dráhy.

Nádorové buňky obcházejí přirozený proces replikativní senescence aktivací telomerázy [54]. Účinnost telomerázy je podmíněna její asociací s HSP90 [55]. Farmakologická inhibice HSP90 vede k inaktivaci telomerázové funkce v nádorových buňkách [56]. HSP90 se v nádorových buňkách podílí také na regulaci exprese genu kódujícího telome-

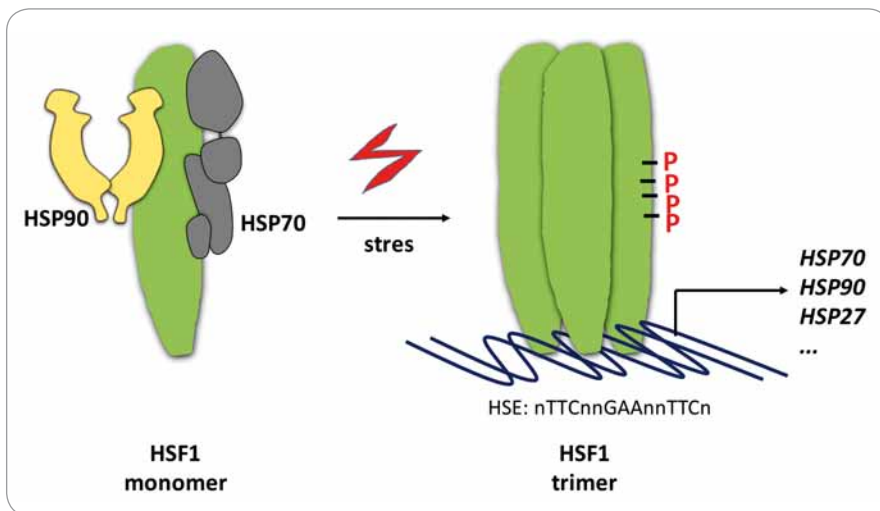
rázu [57]. Těmito mechanismy přispívá HSP90 v nádorových buňkách k inhibici senescence.

Metastazování nádorových buněk z primárního ložiska je mnohastupňovým procesem zahrnujícím remodelaci nádorové tkáně, extravazaci nádorových buněk do krevního řečiště a jejich usazení v cílové tkáni [29]. Ačkoli spektrum mutací podmiňujících metastatický potenciál nádorových buněk je heterogenní [58,59], zvýšená aktivita molekulárních chaperonů představuje nutnou podmínku metastatické kaskády [60,61]. Stabilizace kináz podílejících se na regulaci signalizace z extracelulární matrix (focal adhesion kinase – FAK, integrin-linked kinase – ILK) a receptorových tyrozinkináz ERBB2 a MET chaperonem HSP90 výrazně přispívá k metastatickému potenciálu nádorových buněk [60]. Inaktivace HSP70 vede ke snížení exprese a aktivity MET kinázy u myších prsních nádorů [46]. Bylo zjištěno, že proces epiteliálně-mezenchymální transzice, který provází metastazování, je značně závislý na expresi chaperonu HSP27 [61–63].

Hypotéza vysvětlující význam regulátorů proteostázy a zejména pak proteinu HSP90 pro fenotypovou plasticitu nádorové tkáně pokládá HSP90 za „pufra“ genetické nestability [64]. Tato hypotéza vychází z předpokladu, že vzrůstající genetická nestabilita v nádorové tkáni (především mutace strukturních genů) je na úrovni proteinů „pufrována“ chaperonovým systémem HSP90. Limitní hodnoty proteotoxického stresu v buňkách lokalizovaných v centru nádoru vystavených hypoxickému acidifikovanému prostředí [64] mohou vést k inaktivaci chaperonu HSP90 a fenotypové manifestaci nahromaděných genetických změn. Tato „exploze“ fenotypových variant v pokročilejších nádorech by mohla vysvětlovat vznik buněčných klonů vykazujících rezistenci k použité léčbě [65,66].

### HSF1 – transkripční regulace HSR

HSP proteiny představují „vykonavatelskou“ složku proteostatického aparátu. Na systémové úrovni je reakce na proteotoxický stres spouštěna robustním transkripčním programem řízeným transkripčním faktorem HSF1. Transkripční



**Obr. 2. Aktivace HSF1.**

Transkripční faktor HSF1 se vyskytuje v nestresovaných buňkách jako monomer v inhibičním komplexu s chaperony HSP70 a HSP90. Stresové podmínky vedou k disociaci molekulárních chaperonů a trimerizaci HSF1. Transkripčně aktivní forma HSF1 je pak dále modifikována fosforylacemi (P) a vyhledává svá vazebná místa (heat-shock elements – HSE) v promotorech genů. Mezi HSF1-řízené patří také geny kódující HSP70, HSP90 a HSP27. Jejich syntézou se uzavírá zpětnovazební regulační smyčka aktivity HSF1.

faktor HSF1 je v nestresovaných buňkách přítomen v monomerním stavu, který je udržován jeho asociací s chaperony HSP70 a HSP90 (obr. 2) [67,68]. V buňkách vystavených nepříznivým vnitřním či vnějším podmínkám dochází k disociaci HSP70/HSP90 od monomeru HSF1, který následně trimerizuje za vzniku transkripčně aktivní formy lokalizované v jádře, kde se váže ke konsenzuálnímu sekvenčnímu motivům označovaným jako heat-shock elements (HSE, sekvence nTTCnnGAAnnTTCn) v promotorových oblastech regulovaných genů [69]. Aktivace HSF1 je provázána rozsáhlým spektrem jeho posttranslačních modifikací. Patří k nim zejména fosforylace [3], acetylace [70] a sumoylace [71]. Tyto modifikace jsou součástí komplexního mechanismu „vyladování“ transkripční aktivity proteinu HSF1.

### HSF1 – regulace aktivity fosforylací

Účinná aktivace HSF1 při proteotoxickém stresu je závislá na fosforylaci tohoto faktoru. Modifikaci podléhají zbytky serinu a threoninu v pozicích S230, S320, S419 a T142 katalyzované kinázami CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II), PKA (protein kinase A),

CK2 (casein kinase 2) a PLK1 (polo-like kinase 1) [72–75]. Za klíčovou fosforylací nutnou pro stresem indukovanou aktivaci HSF1 je považována modifikace serinu S326 [76]. Na modifikaci serinu S326 se podílí kináza mTOR [77] a také kináza RAS/MAPK kaskády [3].

RAS/MAPK kaskáda (RAS-RAF-MEK-ERK) je centrální signální drahou řídící buněčnou proliferaci a diferenciací, ale také metabolickou aktivitu [78]. Bylo pozorováno, že zatímco inhibice kinázy MEK vede ke snížení stresem indukované fosforylace HSF1 v pozici S326, inhibice aktivity kinázy ERK naopak tuto fosforylací zvyšuje [3]. Jelikož je kináza ERK považována za výlučný substrát kinázy MEK a za konečný efektor RAS/MAPK kaskády, bylo toto zjištění překvapující. Navíc byla prokázána existence stresem indukovaného komplexu proteinů HSF1, MEK a ERK, ve kterém dochází k inhibici MEK regulované fosforylace serinu S326 proteinu HSF1 prostřednictvím ERK katalyzovaných inhibičních fosforylací threoninů T292 a T386 kinázy MEK. Tato pozorování dokládají regulační úlohu RAS aktivované kinázy MEK jak v dráze vedoucí ke kináze ERK, tak k transkripčnímu faktoru HSF1 a odhalují vzájemně protikladné efekty kinázy MEK a ERK při regulaci aktivity HSF1.

Jelikož aktivací mutace komponent RAS/MAPK signální dráhy jsou přítomny až u 30 % nádorů, představuje aberantní konstitutivní aktivace transkripčního faktoru HSF1 inherentní proces maligní transformace [79].

Cílená fosforylace se také podílí na inhibici aktivace HSF1. Mezi inhibiční fosforylace HSF1 náleží modifikace serinu S121, která je katalyzována kinázou AMPK (AMP-activated protein kinase) v podmínkách snížené dostupnosti živin vyvolávajících metabolický stres [80]. Tato kináza reaguje na nerovnováhu buněčného metabolismu projevující se zvýšenou intracelulární koncentrací AMP oproti ATP a fosforyluje řadu buněčných efektorů, které se podílejí na aktivaci energeticky nákladných anabolických procesů (lipogeneze, glykolýza, beta oxidace, proteinová syntéza) [81]. AMPK indukované snížení spotřeby ATP a zvýšení jeho produkce vede k ustavení metabolické homeostázy [81]. Aktivace AMPK v průběhu metabolického stresu inhibuje HSF1 řízenou HSR a činí nádorové buňky náchylné k proteotoxickému stresu [80]. Tyto antagonické vztahy mezi úlohou HSF1 (proteotoxický stres) a AMPK (metabolický stres) mohou také vysvětlovat Warburgův efekt, tedy závislost proteotoxicky stresovaných nádorových buněk na glukóze.

### HSF1 – translace proteinů

Aktivita mTOR kinázy je spojena s indukci syntézy proteinů a lipidů v buňkách stimulovaných růstovými faktory a v prostředí s dostatkem živin a kyslíku [82]. Ve stresových podmínkách (energetická disbalance, nedostatek aminokyselin) je naopak mTOR inhibována a dochází k indukci autofágie [83]. Nádorové buňky jsou závislé na robustní proteinové syntéze [9]. Spolu s proteinem p53 tak patří kináza mTOR a její nadřazené regulační komponenty PI3K, PTEN a AKT k nejčastěji mutovaným signálním drahám v nádorech [82]. Již jsme zmínili, že kináza mTOR se podílí na aktivaci HSF1 jeho fosforylací [77]. Inhibice aktivity kinázy mTOR zabraňuje HSF1 indukované expresi HSP proteinů v přítomnosti proteotoxického stresu [84]. Dále bylo popsáno, že k výrazné inaktivaci transkripční funkce HSF1 dochází

při inhibici mTOR aktivovaného [85] eukaryotického iniciačního translačního faktoru 4A (eIF4A) látkou zvanou roglamid A [11]. Pozoruhodné je také zjištění, že alternativní sestřih transkriptu eukaryotického elongačního faktoru eEF1B $\delta$  vede ke vzniku mRNA kódující transkripční faktor kooperující s HSF1 při regulaci exprese genů, jejichž promotory obsahují HSE element [86]. Tyto skutečnosti naznačují, že míra proteinové syntézy regulovaná kinázou mTOR a translačními faktory je koordinována s mírou syntézy složek proteostatického aparátu řízenou HSF1.

V současnosti je intenzivně studován tzv. Ribosome quality complex (RQC) [87]. Jedná se o proteinový komplex asociovaný s ribozomy, které vykazují známky aberantního průběhu syntézy. Je tvořen komponentami RQC1, Linsterin 1 (LTN1), CDC48, TEA2 a dalšími. Vazba RQC k aberantnímu ribozomu vede k ubikvitinaci a proteazomální degradaci syntetizovaných polypeptidů a k recyklaci ribozomálních podjednotek [88]. Protein TEA2 je schopen katalyzovat prodloužení C-konce nedosyntetizovaných polypeptidů o zbytky alaninu a threoninu, což vede k aktivaci HSF1 [87,89]. Mechanismus této aktivace prozatím není znám. Aktivita HSF1 tak není korelována pouze s mírou translace, ale také s její kvalitou monitorovanou RQC.

### HSF1 – nádorově specifická funkce

Transkripční faktor HSF1 neaktivuje pouze geny zapojené do proteostatických mechanismů, ale také řadu dalších funkčně rozmanitých genů [90,91]. V nádorech je aktivován zcela specifický transkripční program řízený HSF1 [91]. Řada promotorů stresem indukovaných genů není v nádorových buňkách obsazena HSF1. Naopak, HSF1 se v transformovaných buňkách váže k promotorovým sekvencím odlišným od těch, které jsou aktivovány při stresových podmínkách [91]. Nádorově specifický transkripční program proteinu HSF1 je pravděpodobně důsledkem odlišností v typech a míře stresů, kterým je vystavena nádorová buňka na rozdíl od buňky vystavené tepelnému šoku. Mezi geny aktivované HSF1 v nádorových

buňkách patří geny zapojené v proteosyntéze (EIF4A2, RPL22), regulaci buněčného cyklu (CDC6, KNTC1, POLA2), reparaci DNA a chromatinové remodelaci (MLH1, CBX3), metabolismu (FASN, PGK1) a úpravách mRNA (HNRNPA3, RBM23) [91]. Unikátní HSF1 transkripční program je také aktivován ve fibroblastech nádorového stromatu [92]. HSF1 ve stromálních fibroblastech řídí expresi secernovaných cytokinů TGF- $\beta$  a SDF1, které stimulují růst sousedních nádorových buněk. Tyto skutečnosti ukazují, že transkripční faktor HSF1 je svou transaktivací schopný na systémové úrovni ovlivňovat nejen fyziologické děje v nádorových buňkách, ale také ve smíšené nádorové tkáni, čímž výrazně přispívá k fenotypové plasticitě, agresivitě a rezistenci nádorů.

### Závěr

„Vykonavatelské“ i „systémové“ složky mechanismů řídicích buněčnou odpověď na proteotoxický stres zastoupené molekulárními chaperony a transkripčním faktorem HSF1 reprezentují evolučně konzervovaný biologický princip, jehož původní funkcí byla reakce na nepříznivé podmínky prostředí. Proteiny HSP jsou známy už u prokaryot. Transkripční faktor HSF1 se objevil u jednobuněčných eukaryot, kvasinek. Vznik mnohobuněčných organismů přenesl nutnost jednotlivých buněk reagovat na změny prostředí na centralizovanou, organizmální úroveň. Zdá se, že u mnohobuněčných organismů, u člověka, nezastává osa HSF1-HSP pouze úlohu signální dráhy přežití individuálních buněk, ale koordinuje homeostázu celých tkání [92,93]. Heterogenní populace nádorových a nenádorových buněk v komplexní nádorové tkáni vystavené proměnlivým podmínkám prostředí tak pravděpodobně v deregulované podobě využívají transkripčního programu HSF1 pro své vlastní přežití nezávisle na přežití celého organismu. Ačkoli systém HSF1-HSP představuje pro nádorovou tkáň efektivní ochranu před cytotoxickou protinádorovou léčbou, cílená a efektivní inhibice tohoto systému v nádorových buňkách by mohla inaktivovat jeden z klíčových mechanismů vzniku progresivního nádorového onemocnění.

### Literatura

1. Labbadia J, Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 2015; 84: 435–464. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033955.
2. Trcka F, Vojtesek B, Muller P. Protein quality control and cancerogenesis. *Klin Onkol* 2012; 25 (Suppl 2): 2538–2544.
3. Tang Z, Dai S, He Y et al. MEK guards proteome stability and inhibits tumor-suppressive amyloidogenesis via HSF1. *Cell* 2015; 160(4): 729–744. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.028.
4. Morimoto RI. The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011; 76: 91–99. doi: 10.1101/sqb.2012.76.010637.
5. Anckar J, Sistonen L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 1089–1115. doi: 10.1146/annurev-biochem-060809-095203.
6. Vihervaara A, Sistonen L. HSF1 at a glance. *J Cell Sci* 2014; 127(Pt 2): 261–266. doi: 10.1242/jcs.132605.
7. Zhang Y, Huang L, Zhang J et al. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J Cell Biochem* 2002; 86(2): 376–393.
8. Izu H, Inouye S, Fujimoto M et al. Heat shock transcription factor 1 is involved in quality-control mechanisms in male germ cells. *Biol Reprod* 2004; 70(1): 18–24.
9. Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 2003; 3(3): 179–192.
10. Roux PP, Topisirovic I. Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(11): pii: a012252. doi: 10.1101/cshperspect.a012252.
11. Santagata S, Mendillo ML, Tang YC et al. Tight coordination of protein translation and HSF1 activation supports the anabolic malignant state. *Science* 2013; 341(6143): 1238303. doi: 10.1126/science.1238303.
12. Dai C, Santagata S, Tang Z et al. Loss of tumor suppressor NF1 activates HSF1 to promote carcinogenesis. *J Clin Invest* 2012; 122(10): 3742–3754. doi: 10.1172/JCI62727.
13. Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol* 2013; 87(1): 19–48. doi: 10.1007/s00204-012-0918-z.
14. Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(19): 6455–6459.
15. Chen B, Zhong D, Monteiro A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 2006; 7: 156.
16. Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely P et al. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 2004; 562(1–3): 11–15.
17. Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 2003; 112(1): 41–50.
18. Mayer MP, Schroder H, Rudiger S et al. Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol* 2000; 7(7): 586–593.
19. Li J, Buchner J. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomed J* 2013; 36(3): 106–117. doi: 10.4103/2319-4170.113230.
20. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(6): 670–684.
21. Taipale M, Tucker G, Peng J et al. A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways. *Cell* 2014; 158(2): 434–448. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.039.
22. Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M et al. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of

- substrate recognition. *Cell* 2012; 150(5): 987–1001. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.047.
23. Kirschke E, Goswami D, Southworth D et al. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* 2014; 157(7): 1685–1697. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.038.
24. Calderwood SK. Molecular cochaperones: tumor growth and cancer treatment. *Scientifica (Cairo)* 2013; 2013: ID 217513. doi: 10.1155/2013/217513.
25. Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D et al. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12(10): 842–846.
26. Cashikar AG, Duenwald M, Lindquist SL. A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J Biol Chem* 2005; 280(25): 23869–23875.
27. van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL et al. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol* 2001; 8(12): 1025–1030.
28. Arrigo AP, Simon S, Gilbert B et al. Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett* 2007; 581(19): 3665–3674.
29. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
30. Momeny M, Saunus JM, Marturana F et al. Heregulin-HER3-HER2 signaling promotes matrix metalloproteinase-dependent blood-brain-barrier transendothelial migration of human breast cancer cell lines. *Oncotarget* 2015; 6(6): 3932–3946.
31. Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci* 2016; 129(7): 1287–1292. doi: 10.1242/jcs.182873.
32. Wang S, Cang S, Liu D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 2016; 9: 34. doi: 10.1186/s13045-016-0268-z.
33. Joab I, Radanyi C, Renoir M et al. Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature* 1984; 308(5962): 850–853.
34. Sanchez ER, Toft DO, Schlesinger MJ et al. Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J Biol Chem* 1985; 260(23): 12398–12401.
35. Zhang X, Gureasko J, Shen K et al. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 2006; 125(6): 1137–1149.
36. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116(6): 855–867.
37. Shimamura T, Lowell AM, Engelman JA et al. Epidermal growth factor receptors harboring kinase domain mutations associate with the heat shock protein 90 chaperone and are destabilized following exposure to geldanamycins. *Cancer Res* 2005; 65(14): 6401–6408.
38. da Rocha Dias S, Friedlos F, Light Y et al. Activated B-RAF is an Hsp90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res* 2005; 65(23): 10686–10691.
39. Tao W, Chakraborty SN, Leng X et al. HSP90 inhibitor AUY922 induces cell death by disruption of the Bcr-Abl, Jak2 and HSP90 signaling network complex in leukemia cells. *Genes Cancer* 2015; 6(1–2): 19–29.
40. Brugge JS, Erikson E, Erikson RL. The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with two cellular proteins. *Cell* 1981; 25(2): 363–372.
41. Lipsich LA, Cutt JR, Brugge JS. Association of the transforming proteins of Rous, Fujinami, and Y73 avian sarcoma viruses with the same two cellular proteins. *Mol Cell Biol* 1982; 2(7): 875–880.
42. Vaughan CK, Gohlke U, Sobott F et al. Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex. *Mol Cell* 2006; 23(5): 697–707.
43. Scholz GM, Hartson SD, Cartledge K et al. The molecular chaperone Hsp90 is required for signal transduction by wild-type Hck and maintenance of its constitutively active counterpart. *Cell Growth Differ* 2001; 12(8): 409–417.
44. Xu W, Yuan X, Xiang Z et al. Surface charge and hydrophobicity determine ErbB2 binding to the Hsp90 chaperone complex. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12(2): 120–126.
45. Meng L, Hunt C, Yaglom JA et al. Heat shock protein Hsp72 plays an essential role in Her2-induced mammary tumorigenesis. *Oncogene* 2011; 30(25): 2836–2845. doi: 10.1038/onc.2011.5.
46. Gong J, Weng D, Eguchi T et al. Targeting the hsp72 gene delays mammary tumor initiation and inhibits tumor cell metastasis. *Oncogene* 2015; 34(43): 5460–5471. doi: 10.1038/onc.2015.1.
47. Ouyang L, Shi Z, Zhao S et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012; 45(6): 487–498. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
48. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S et al. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* 2007; 1(1): 53–60.
49. Chauhan D, Li G, Hideshima T et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 2003; 102(9): 3379–3386.
50. Paul C, Simon S, Gilbert B et al. Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27). *Exp Cell Res* 2010; 316(9): 1535–1552. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.03.006.
51. Zenke G, Strittmatter U, Tees R et al. A cocktail of three monoclonal antibodies significantly increases the sensitivity of an enzyme immunoassay for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunoassay* 1991; 12(2): 185–206.
52. Arrigo AP, Gilbert B. HspB1 dynamic phospho-oligomeric structure dependent interactome as cancer therapeutic target. *Curr Mol Med* 2012; 12(9): 1151–1163.
53. Beere HM, Wolf BB, Cain K et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; 2(8): 469–475.
54. Jaskelioff M, Song W, Xia J et al. Telomerase deficiency and telomere dysfunction inhibit mammary tumors induced by polyomavirus middle T oncogene. *Oncogene* 2009; 28(48): 4225–4236. doi: 10.1038/onc.2009.268.
55. Toogun OA, Dezwain DC, Freeman BC. The hsp90 molecular chaperone modulates multiple telomerase activities. *Mol Cell Biol* 2008; 28(1): 457–467.
56. Chaklader M, Das P, Pereira JA et al. 17-AAG mediated targeting of Hsp90 limits tert activity in peritoneal sarcoma related malignant ascites by downregulating cyclin D1 during cell cycle entry. *Exp Oncol* 2012; 34(2): 90–96.
57. Kim RH, Kim R, Chen W et al. Association of hsp90 to the hTERT promoter is necessary for hTERT expression in human oral cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29(12): 2425–2431. doi: 10.1093/carcin/bgn225.
58. Lipsyc M, Yaeger R. Impact of somatic mutations on patterns of metastasis in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 2015; 6(6): 645–649. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.045.
59. Dharnija S, Diederichs S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis. *Int J Cancer* 2016; 139(2): 269–280. doi: 10.1002/ijc.30039.
60. Tsutsumi S, Beebe K, Neckers L. Impact of heat-shock protein 90 on cancer metastasis. *Future Oncol* 2009; 5(5): 679–688. doi: 10.2217/fon.09.30.
61. Pavan S, Musiani D, Torchiario E et al. HSP27 is required for invasion and metastasis triggered by hepatocyte growth factor. *Int J Cancer* 2014; 134(6): 1289–1299. doi: 10.1002/ijc.28464.
62. Shiota M, Bishop JL, Nip KM et al. Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis, and circulating tumor cells in prostate cancer. *Cancer Res* 2013; 73(10): 3109–3119.
63. Gibert B, Eckel B, Gonin V et al. Targeting heat shock protein 27 (HspB1) interferes with bone metastasis and tumour formation in vivo. *Br J Cancer* 2012; 107(1): 63–70. doi: 10.1038/bjc.2012.188.
64. Rutherford SL, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 1998; 396(6709): 336–342.
65. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013; 501(7467): 338–345. doi: 10.1038/nature12625.
66. Turtoi A, Blomme A, Castronovo V. Intratumoral heterogeneity and consequences for targeted therapies. *Bull Cancer* 2015; 102(1): 17–23. doi: 10.1016/j.bulcan.2014.12.006.
67. Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* 1998; 12(5): 654–666.
68. Ali A, Bharadwaj S, O'Carroll R et al. HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* 1998; 18(9): 4949–4960.
69. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(8): 545–555. doi: 10.1038/nrm2938.
70. Raychaudhuri S, Loew C, Korner R et al. Interplay of acetyltransferase EP300 and the proteasome system in regulating heat shock transcription factor 1. *Cell* 2014; 156(5): 975–985. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.055.
71. Brunet Simioni M, De Thonel A, Hammann A et al. Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene* 2009; 28(37): 3332–3344. doi: 10.1038/onc.2009.188.
72. Holmberg CI, Hietakangas V, Mikhailov A et al. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J* 2001; 20(14): 3800–3810.
73. Zhang Y, Murshid A, Prince T et al. Protein kinase A regulates molecular chaperone transcription and protein aggregation. *PLoS One* 2011; 6(12): e28950. doi: 10.1371/journal.pone.0028950.
74. Soncin F, Zhang X, Chu B et al. Transcriptional activity and DNA binding of heat shock factor-1 involve phosphorylation on threonine 142 by CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303(2): 700–706.
75. Kim SA, Yoon JH, Lee SH et al. Polo-like kinase 1 phosphorylates heat shock transcription factor 1 and mediates its nuclear translocation during heat stress. *J Biol Chem* 2005; 280(13): 12653–12657.
76. Guettouche T, Boellmann F, Lane WS et al. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem* 2005; 6: 4.
77. Chou SD, Prince T, Gong J et al. mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis. *PLoS One* 2012; 7(6): e39679. doi: 10.1371/journal.pone.0039679.
78. Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13(12): 928–942. doi: 10.1038/nrd4281.
79. Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011; 2(3): 344–358. doi: 10.1177/1947601911411084.
80. Dai S, Tang Z, Cao J et al. Suppression of the HSF1-mediated proteotoxic stress response by the metabolic stress sensor AMPK. *EMBO J* 2015; 34(3): 275–293. doi: 10.15252/embj.201489062.

81. Hardie DG. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 33: 1–7. doi: 10.1016/j.ceb.2014.09.004.
82. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(1): 21–35. doi: 10.1038/nrm3025.
83. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 1998; 273(7): 3963–3966.
84. Acquaviva J, He S, Sang J et al. mTOR inhibition potentiates HSP90 inhibitor activity via cessation of HSP synthesis. *Mol Cancer Res* 2014; 12(5): 703–713. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0605.
85. Showkat M, Beigh MA, Andrabi KI. mTOR signaling in protein translation regulation: implications in cancer genesis and therapeutic interventions. *Mol Biol Int* 2014; 2014: ID 686984. doi: 10.1155/2014/686984.
86. Kaitsuka T, Tomizawa K, Matsushita M. Transformation of eEF1Bdelta into heat-shock response transcription factor by alternative splicing. *EMBO Rep* 2011; 12(7): 673–681. doi: 10.1038/embor.2011.82.
87. Brandman O, Stewart-Ornstein J, Wong D et al. A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* 2012; 151(5): 1042–1054. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044.
88. Brandman O, Hegde RS. Ribosome-associated protein quality control. *Nat Struct Mol Biol* 2016; 23(1): 7–15.
89. Shen PS, Park J, Qin Y et al. Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* 2015; 347(6217): 75–78. doi: 10.1126/science.1259724.
90. Trinklein ND, Murray JI, Hartman SJ et al. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Biol Cell* 2004; 15(3): 1254–1261.
91. Mendillo ML, Santagata S, Koeva M et al. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell* 2012; 150(3): 549–562. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.031.
92. Scherz-Shouval R, Santagata S, Mendillo ML et al. The reprogramming of tumor stroma by HSF1 is a potent enabler of malignancy. *Cell* 2014; 158(3): 564–578. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.045.
93. Douglas PM, Baird NA, Simic MS et al. Heterotypic signals from neural HSF-1 separate thermotolerance from longevity. *Cell Rep* 2015; 12(7): 1196–1204.



# Chaperony endoplazmatického retikula na povrchu nádorové buňky a v extracelulárním prostředí

## Endoplasmic Reticulum Chaperones at the Tumor Cell Surface and in the Extracellular Space

Brychtová V., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Chaperony endoplazmatického retikula jsou stresem indukované proteiny, které mohou být translokovány mimo endoplazmatické retikulum do cytozolu, buněčné membrány, případně extracelulárního prostředí. K transportu chaperonů z endoplazmatického retikula dochází především za podmínek stresu endoplazmatického retikula, přičemž konstitutivní extracelulární exprese chaperonů byla zaznamenána u nádorových onemocnění. Chaperony endoplazmatického retikula lokalizované na povrchu buněk nebo v extracelulárním prostředí zastávají odlišné funkce ve srovnání s jejich endoplazmaticko-retikulární rezidentní variantou, neboť se chovají jako multifunkční receptory a ovlivňují tak buněčnou signalizaci a proliferaci. **Cíl:** Předkládaná přehledová práce se zaměřuje především na expresi chaperonů endoplazmatického retikula na povrchu nádorových buněk a v extracelulárním prostředí. Popisuje možné mechanismy translokace chaperonů endoplazmatického retikula na povrch nádorových buněk zahrnující KDEL transportní mechanismus a retrotranslokační dráhu a dále vliv posttranslačních modifikací chaperonů na jejich lokalizaci v buňce. K nejvíce popsáným chaperonům endoplazmatického retikula detekovaným na membráně nádorových buněk patří GRP78, GRP94, kalretikulín a kalnexin, které se různým způsobem podílejí na signalizaci nádorových buněk. Pozornost je dále věnována imunogenním vlastnostem membránově lokalizovaných chaperonů, neboť tyto chaperony se mohou účastnit imunitních reakcí buněk. Prostřednictvím interakcí s toll-like receptory nebo při prezentaci antigenů se tak mohou podílet na vrozené i adaptivní imunitní odpovědi organismu a také nádorově-specifické imunitě. Exprese chaperonů na povrchu nádorových buněk je potenciálně využitelná ve specificky cílené protinádorové léčbě, stejně tak jako při přípravě léčebných vakcín, proto je závěrečná část práce věnována tomuto tématu.

### Klíčová slova

endoplazmatické retikulum – glukózou regulované proteiny – molekulární chaperony – KDEL sekvence – imunobiologie

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



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

Obdrženo/Submitted: 17. 5. 2016  
Přijato/Accepted: 20. 7. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164S25>

## Summary

**Background:** Endoplasmic reticulum chaperones are stress induced proteins capable of translocation into cytosol, cell membrane or extracellular space. The chaperones are transported from the endoplasmic reticulum particularly under endoplasmic reticulum stress conditions, while their constitutive extracellular expression was found in many cancers. Cell surface or extracellular endoplasmic reticulum chaperones take up distinct functions compared to their endoplasmic reticulum resident variants because they act like multifunctional receptors and thus affect cell signaling and proliferation. **Aim:** The presented review focuses primarily on endoplasmic reticulum chaperones expression on the cell surface of cancer cells and into extracellular space. The work describes possible mechanisms of chaperones translocation to the cancer cell surface, including KDEL transport mechanism and retrotranslocation and the influence of chaperone posttranslational modifications on their localization within the cell. Well described cancer cell surface endoplasmic reticulum chaperones include GRP78, GRP94, calreticulin and calnexin that are involved in cancer cell signaling in different ways. The attention is also paid to immunogenic properties of membrane-localized chaperones for their ability to participate in immune reactions. They can take part in innate and adaptive immune response through their interaction with toll-like receptors or during the antigen presentation as well as in tumor-specific immunity. The expression of endoplasmic reticulum chaperones on the cancer cells surface is potentially exploitable in specific antitumor therapy as well as vaccine therapy, thus the final part of this review is dedicated to this topic.

## Key words

endoplasmic reticulum – glucose-regulated proteins – molecular chaperones – KDEL sequence – immunobiology

## Úvod

Endoplazmatické retikulum (ER) a navazující Golgiho komplex je nepostradatelný buněčný aparát, ve kterém probíhá velké množství procesů vč. biosyntézy proteinů, jejich sbalení do stabilního prostorového uspořádání a následné posttranslační modifikace. Globulární proteiny se v buňkách mohou za určitých podmínek vyskytovat v nesbalené nebo jen částečně sbalené formě, a to bezprostředně po vlastní biosyntéze nebo při průchodu buněčnými membránami. K denaturaci proteinu nebo nedokonalému skládání naopak dochází za stresových podmínek, jako je vyšší teplota, změna pH nebo hypoxie. Základní ochranu buňky před vznikem denaturovaných a agregujících

proteinů zajišťují molekulární chaperony. Chaperony lze zařadit do několika vzájemně nepříbuzných rodin proteinů, které se kromě prevence vzniku amorfních proteinových agregátů podílejí i na regulaci vápníkového metabolismu buňky. Mezi nejvíce abundantní lumenální chaperony ER patří glukózou regulované proteiny (GRP), které zahrnují protein GRP78 kódovaný genem *HSPA5*, dále protein GRP94 kódovaný genem *HSP90B1*, protein GRP170 kódovaný genem *HYOU1* a protein GRP75 kódovaný genem *HSPA9* z rodiny proteinů teplotního šoku (heat shock proteins – HSP) a multifunkční protein kalretikulín. Molekulární chaperony se dělí do několika rodin na základě molekulové hmotnosti (pro přehled-

nost tab. 1). Kromě chaperonů obsahuje lumen ER množství enzymů, které se také účastní formování prostorového uspořádání proteinů. Patří mezi ně enzymy z rodiny protein disulfid izomeráz (PDI) s nejvíce zastoupenými ERP57 a PDI a skupina protein prolyl izomeráz [1,2].

Vysoká intracelulární hladina chaperonů je typická pro většinu nádorů a je dána zvýšenou proteosyntézou a nároky na kapacitu ER u proliferaujících nádorových buněk. Udržováním homeostázy ER přispívají chaperony ER k přežívání nádorových buněk a jejich proliferaci. Proteomickou analýzou bylo zjištěno, že buněčná membrána nádorových buněk obsahuje poměrně velké množství HSP a GRP [3], které jsou preferenčně exprimovány na povrchu nádorových buněk ve srovnání s buňkami zdravé tkáně (např. GRP78) [4–6]. Ukazuje se, že funkce lumenálních chaperonů přesahují hranice ER a kromě skládání proteinů zahrnují i další procesy, jako je regulace proliferace, apoptóza a imunitní reakce buněk [7–10].

## Lokalizace chaperonů ER

Molekulární chaperony byly dlouhou dobu považovány za typické intracelulární proteiny s charakteristickou subcelulární lokalizací. Později se ukázalo, že se vyskytují i v buněčné membráně a v extracelulárním prostoru. V současnosti je známo, že za normálních podmínek se chaperony vyskytují téměř ve všech buněčných kompartmentech, kde se po-

Tab. 1. Rozdělení molekulárních chaperonů do rodin.

	gen	protein	synonyma	lokalizace
Rodina HSP70	<i>HSPA9</i>	HSP70-9	GRP75/mtHSP70	mitochondrie (ER)
	<i>HSPA5</i>	HSP70-5	BiP/GRP78	ER
	<i>HYOU1</i>	HYOU1	GRP170, ORP-150	ER
	<i>HSPA1A</i>	HSP70	HSX70, HSP72, HSP70i, HSP70-1	jádro/cytozol
Rodina HSP90	<i>HSP90AA1</i>	HSP90- $\alpha_1$	HSP90A, HSP89, HSP86	cytozol
	<i>HSP90AA2</i>	HSP90- $\alpha_2$	HSP90alpha	cytozol
	<i>HSP90AB1</i>	HSP90- $\beta$	HSP84, HSP90B	cytozol
	<i>HSP90B1</i>	endo-plazmin	Gp96, GRP94	ER

ER – endoplazmatické retikulum

dílejší na skládání nově vznikajících proteinů, jejich transportu přes membrány a také brání agregaci proteinů [11].

Chaperony ER jsou solubilní proteiny, které se v lumen ER a v organelách podél celé sekreční dráhy (cis-Golgiho aparát) účastní posttranslačních úprav proteinů. Z cis-Golgiho komplexu jsou „recyklovány“ a navraceny zpět do ER tzv. COPI (Coat protein 1) transportním systémem prostřednictvím transportních váčků. Tento mechanismus rozpoznává ER rezidentní proteiny na základě charakteristické sekvence na C-konci obsahující aminokyseliny Lys-Asp-Glu-Leu (zkracováno KDEL) [12]. Chaperony mohou nést různé alternativy KDEL sekvence, které však mají obdobnou funkci [13]. Proteiny vybavené KDEL sekvencí nebo její alternativou se pak účastní vezikulárního transportu proteinů mezi ER, ER-Golgiho komplexem a trans-Golgiho komplexem, aniž by docházelo k jejich uvolňování ven z buňky a ztrátám. Chaperony nesoucí KDEL sekvenci jsou vychytávány pomocí KDEL receptorů přítomných v organelách sekreční dráhy a následně vráceny zpět do ER [14]. Doposud byly popsány tři typy KDEL receptorů (KDEL1, KDEL2, KDEL3), přičemž každý z nich interaguje s jedinečnými retenčními motivy chaperonů ER [13].

Přestože jsou chaperony ER aktivně zadržovány v ER, vyskytují se i v ostatních organelách, jako je buněčné jádro, mitochondrie a buněčná membrána. Mimo ER se množství chaperonů z rodiny HSP běžně nachází v cytozolu [15]. Některé z nich mohou asociovat s fosfolipidy na lumenální straně buněčné membrány a asistovat při exportu proteinů z buňky [16]. V mitochondriích jsou zase nejvíce zastoupeny chaperony z rodin HSP60 a HSP70, které se zde účastní biogeneze mitochondriálních proteinů [17]. Chaperony se dále účastní transportu proteinů z cytozolu do mitochondrií a ER [18]. Jaderné chaperony se naopak podílejí na interakcích DNA s kompletně sbalenými proteiny, a to při vzniku multiproteinových komplexů v průběhu remodelace chromatinu [18]. V extracelulárním prostředí byly chaperony detekovány v extracelulární matrix a tělních tekutinách, jako je krevní sérum a moč (tab. 2) [19].

**Tab. 2. Lokalizace chaperonů ER mimo ER/Golgiho komplex.**

Protein	Lokalizace mimo ER/Golgiho komplex
HSP47/serpin H1	buněčný povrch, extracelulární prostor, krevní sérum
GRP78/BiP	buněčný povrch, jádro, cytozol, mitochondrie
GRP94/gp96	buněčný povrch, jádro
GRP170	buněčný povrch
PDI	buněčný povrch
ERP57	buněčný povrch, jádro, cytozol, extracelulární prostor, moč
kalretikulín	buněčný povrch, cytozol, extracelulární prostor

ER – endoplazmatické retikulum

### Mechanismus translokace chaperonů ER na buněčný povrch a do extracelulárního prostoru

Mechanismus transportu chaperonů ER nesoucích KDEL sekvenci na povrch živočišných buněk je vysvětlován několika teoriemi. Za normálních podmínek se chaperony ER dostávají do extracelulárního prostředí pomocí KDEL receptorů cestou tzv. anterográdního transportu. Za podmínek buněčného stresu tento systém naopak napomáhá zadržování chaperonů v ER-Golgiho komplexu obráceným, tzv. retrográdním způsobem, kdy jsou nároky buňky na aktivitu chaperonů ER zvýšené [20]. Dále se chaperony ER mohou směrem ven z buňky dostávat jako součást sekrečních váčků, přičemž retence pomocí KDEL receptorů je překonána z důvodu: 1. nasycení kapacity KDEL receptorů např. v důsledku stresu ER v průběhu tumorigeneze, 2. mutace v oblasti KDEL sekvence nebo KDEL receptorů [14,19], nebo 3. maskování KDEL retenčního motivu asociovaným proteinem [21]. Další způsoby, jakými mohou chaperony ER „uniknout“ z prostředí ER, zahrnují uvolňování pomocí extracelulárních váčků (případně exozomů) [22], případně za podmínek buněčného stresu to může být transport prostřednictvím tzv. retrotranslokační dráhy. Tato dráha je součástí ER-asociované degradace proteinů (ERAD), která zbavuje buňku nestabilních proteinů cestou ubiquitinace a degradace proteazomem [23]. Chaperony relokované tímto způsobem (např. kalretikulín) se dostávají z ER do cytozolu, avšak není

zcela jasné, zdali je tato dráha současně i zdrojem membránových nebo extracelulárních variant chaperonů ER [19].

Lokalizaci chaperonů ER může kromě výše zmiňovaných transportních drah ovlivňovat také jejich posttranslační modifikace, jak je to známo u kalretikulínu. Extracelulárně se vyskytující forma kalretikulínu je glykosylovaná, naopak neglykosylovaná forma je výhradně intracelulární, neboť není schopná projít anterográdní sekreční dráhou ven z buňky [20]. Glykosylace nebo jiná modifikace tak může maskovat signální tetrapeptid KDEL a zabránit tak jeho vazbě s receptorem. U proteinu GRP78 bylo v blízkosti KDEL sekvence identifikováno potenciální glykosylační místo (Thr648) [24,25]. Současně byly popsány další odlišně lokalizované posttranslačně modifikované varianty kalretikulínu v buňce zahrnující arginylovanou formu na buněčné membráně a v cytozolu [26] a citrullinovanou formu související s imunitní aktivitou u revmatoidní artritidy [27,28].

### Imunogenní vlastnosti chaperonů ER

Chaperony ER se mohou díky lokalizaci do buněčné membrány nebo extracelulárního prostředí přímo podílet na modulaci imunitní odpovědi buněk [29]. Imunogenní vlastnosti extracelulárních chaperonů ER jsou spjaté s proteiny, které se na povrchu buňky chovají jako „signál označující nebezpečí“ a jsou schopné interagovat s receptory buněk imunitního systému. Je známo, že extracelu-

lární chaperony, jako jsou HSP27, HSP60, HSP70, GRP94, HSP90 nebo GRP170, se mohou vázat s TLR (toll like receptor) receptory, které jsou obvykle exprimovány dendritickými buňkami a makrofágy, a tudíž se účastní vrozené imunitní odpovědi organismu [29]. Jako chaperony ER schopné aktivovat imunitní systém na povrchu buňky nebo v extracelulárním prostředí byly popsány kalretikulin, GRP78 a GRP94 [30–34]. Kromě toho je známo, že GRP96 je schopný aktivovat nádorově-specifickou imunitu [35].

GRP94 a GRP170 se podílejí na prezentaci antigenu a jejich sekretované formy jsou schopné vyvolat vrozenou a adaptivní imunitní odpověď [2]. Na základě výše uvedených vlastností se vybrané chaperony ER ukazují jako potenciálně vhodné cíle pro vývoj protinádorových léčebných vakcín.

### Chaperony ER na povrchu nádorových buněk

ER je jednou z klíčových organel pro udržení stavu buněčné homeostázy. Pokud jsou funkce ER narušeny v důsledku nedostatku živin, hypoxie, změn v metabolismu vápníku, změn v oxido-redukční rovnováze nebo změn v hodnotě pH, dochází ke stresu ER a následnému hromadění nesbalených nebo špatně sbalených proteinů.

V mikroprostředí nádoru jsou buňky vystaveny stresu ER v důsledku změn buněčného metabolismu na mnoha úrovních. Na tyto podmínky pak reagují mimo jiné i extracelulární expresí chaperonů ER.

#### GRP78/BiP

Jedním z nejlépe popsaných chaperonů ER je GRP78 (BiP). GRP78 patří do rodiny HSP70 a je považován za hlavní chaperon ER, který zprostředkovává skládání proteinů vč. jejich kontroly, účastní se vápníkového metabolismu udržováním jeho homeostázy a podílí se na signalizaci během stresu ER. V prostředí nádoru nebo za podmínek stresu ER je exprese GRP78 výrazně indukovaná. GRP78 byl kromě ER detekován také na membráně nádorových buněk, přičemž buňky zdravé tkáně povrchový GRP78 normálně neexprimují. Mechanismus, kterým se GRP78 dostává na povrch, nebyl

doposud přesně popsán. K relokalizaci dochází pravděpodobně v důsledku přesycení kapacity retenčního systému ER, nebo je GRP78 transportován společně s klientními proteiny (může se jednat o adaptivní mechanismus nádorových buněk). Povrchový GRP78 má také zcela jiné funkce než jeho ER varianta, protože se chová jako multifunkční receptor, jehož aktivovaná forma podporuje nádorové bujení. GRP78 je schopný vázat  $\alpha$ 2-makroglobulin a podporovat tak proliferaci, přežívání a metastazování nádorových buněk [36–38]. Interakce s  $\alpha$ 2-makroglobulinem dále vede k aktivaci signálních kaskád ERK1/2, p38 MAPK, Akt, PI3K a NF- $\kappa$ B [37,39–42]. Kromě výše uvedeného může GRP78 membránový receptor jako povrchový protein podporovat tvorbu autoprotilátek, které mají vlastnosti agonistické s  $\alpha$ 2-makroglobulinem a po interakci s receptorem vedou k indukci proliferace nádorových buněk [43,44].

#### GRP94/Gp96

GRP94 je nejvíce abundantním proteinem ER a podobně jako u GRP78 jeho zvýšená exprese souvisí s nádorovou transformací [45]. Jako chaperon ER nese C-koncový ER retenční peptid KDEL, který však nefunguje absolutně. Z toho důvodu byl GRP94 detekován i na membráně nádorových buněk a v extracelulární tekutině (pankreatické šťávě) [46–48]. Jeho funkce na membráně však není zcela jasná, ale je známo, že GRP94 je schopný aktivovat dendritické buňky a nádorově specifické T buňky [49].

#### Kalretikulin a kalnexin

Kalretikulin je vysoce konzervovaný chaperon ER, který ačkoliv je majoritně lokalizován do ER, vykazuje množství dalších intra- i extracelulárních lokalizací. V ER je jeho hlavní úlohou asistovat společně se svým homologem kalnexinem při skládání a kontrole nově syntetizovaných glykoproteinů. Povrchově lokalizovaný kalretikulin má různé funkce, které zahrnují podporu rozpadu fokálních adhezí a migrace [50,51], dále zprostředkování fagocytózy umírajících nádorových buněk [52–54]. Kalnexin patří stejně jako kalretikulin mezi proteiny ER detekované na buněčné membráně. Funkcí povr-

chově lokalizovaného kalnexinu je zřejmě modulace adhezivních vlastností a integrinem řízené buněčné signalizace [55].

### Extracelulární HSP70 a HSP90

Přestože HSP70 a HSP90 nejsou chaperony ER, uvádíme je zde z toho důvodu, že jejich extra- i intracelulární funkce jsou poměrně dobře popsány a současně se jedná o homology ER rezidentních chaperonů (GRP78, GRP94), které jsou nádorovými buňkami uvolňovány.

#### HSP70

Členové rodiny HSP70 asistují při skládání nascentních proteinů a jsou důležitou součástí procesů zajišťujících buněčnou homeostázu. V nádorových buňkách je exprese HSP70 často zvýšena a koreluje s horší prognózou onemocnění [56]. Extracelulární HSP70 se vyskytuje jako solubilní protein, dále potom v komplexu s antigenními peptidy nebo jako součást exozomů. Tyto odlišné varianty interagují s povrchovými receptory nádorových buněk, buněk imunitního systému, endotelovými a epitelovými buňkami. Extracelulární HSP70 v komplexu s nádorovými peptidy interaguje s receptory na povrchu antigen-prezentujících buněk (CD91, SREC-1) [57,58] a je schopný aktivovat NK buňky [37]. Samotný extracelulární HSP70 spouští nespecifické imunitní reakce (signalizace prostřednictvím aktivace TLR2/4 receptoru) [58], ovlivňuje invazivitu nádorových buněk regulací aktivity matrix-metaloproteázy [59] a aktivací zánětlivého mikroprostředí (produkce reaktivních kyslíkových radikálů) [60].

#### HSP90

HSP90 je vysoce exprimovaný chaperon, který ovlivňuje funkci a stabilitu velkého množství klientních proteinů. V jaderých buňkách obratlovců se vyskytuje ve dvou cytozolárních variantách – HSP90 $\alpha$  a HSP90 $\beta$ . HSP90 se ve zdravých buňkách za fyziologických podmínek vyskytuje nejčastěji v cytoplazmě, malá frakce je přítomna také v jádře.

V klidovém stavu buňky HSP90 extracelulárně neuvolňuje, ačkoliv k jeho sekreci dochází v důsledku stresových podmínek, jako je hypoxie, hladovění, virová infekce,  $\gamma$ -záření nebo v přítomnosti reaktivních kyslíkových radikálů [61–65].

Naopak nádorové buňky vykazují konstitutivní extracelulární expresi HSP90, obzvláště v případě nádorů s abnormálně vysokou expresí HIF-1 $\alpha$  [66]. Mezi popsané buněčné regulátory sekrece HSP90 patří nádorový supresor p53, HIF-1 $\alpha$  a ubikvitin ligáza Hectd1 [65].

HSP90 nese sekreční signální peptid a je uvolňován z buněk prostřednictvím exozomální sekreční dráhy [67]. Jeho hlavní funkcí je podpora motility a nádorové progresy, za což je odpovědný 115 aminokyselin dlouhý peptid (aminokyseliny 236-350) na povrchu proteinu. Mezi extracelulární interakční partnery HSP90 patří HER2 receptor, matrix metaloproteázy, LRP-1 [68].

HSP90 byl podobně jako i další HSP proteiny detekován jako molekula cirkulující v krvi. Zvýšené hladiny plazmatického HSP90 $\alpha$  byly popsány u pacientů s karcinomem prsu, plic, pankreatu a jater. Přesto diagnostický význam detekce HSP90 v krvi zatím není zcela jednoznačný [66].

### Povrchové a extracelulární chaperony ER a protinádorová léčba

Preferenční exprese GRP78 na povrchu nádorových buněk umožňuje využití specificky cílené protinádorové léčby s minimálním nežádoucím účinkem na zdravé buňky. Potenciálním cílem této léčby jsou současně podpurné buňky nádorové tkáně, na jejichž povrchu byl GRP78 také identifikován [2]. Léčebné strategie zaměřené na GRP78 využívají např. peptidových ligandů konjugovaných s cytotoxickým agens. Aplikace specifické IgG monoklonální protilátky (Mab159) spouští endocytózu a degradaci povrchového GRP78 a současně apoptózu nádorových buněk (xenograftů karcinomu plic, tlustého střeva, metastáz karcinomu prsu a melanomu) prostřednictvím inhibice PI3K signalizace [39]. Tato protilátka je potenciálně využitelná pro *in vivo* zobrazování při výběru vhodného pacienta pro léčbu protinádorovou Mab159 protilátkou nebo pro sledování progresy onemocnění a odpovědi na léčbu.

Další léčebnou strategií je protinádorová vakcinace, která umožňuje personalizovanou léčbu pacientů s nádorovým onemocněním.

Doposud bylo testováno využití autologního sekrečního fúzního proteinu GRP94 s nádorovými antigenními peptidy. Tato vakcína měla na myších modelech antiproliferativní a antimetastatický efekt, avšak v klinických testech byl její imunogenní účinek velmi variabilní [69–71]. Využití GRP170 fúzního proteinu s plnodélkovými antigeny se ukázalo jako efektivní při léčbě nádorů prostaty na myších modelech [72]. Aktivace dendritických buněk a protinádorová imunitní odpověď byla posílena při syntéze fúzního proteinu GRP170 s NF- $\kappa$ B aktivující doménou bakteriálního proteinu flagelinu u metastazujících nádorů u myši [73].

### Závěr

Hlavní složky extracelulárního prostředí zahrnují metaloproteázy a signální molekuly extracelulárního prostředí s jejich receptory. Z pohledu nádorové biologie mohou extracelulární chaperony působit jako na membránu vázané proteiny, které interakcí s povrchovými receptory spouštějí intracelulární signalizaci. Jako extracelulární solubilní proteiny interagují se složkami extracelulární matrix a podporují tak metastazování a invazivitu nádorů. Současně mohou sloužit jako onkogenní proteiny aktivní v mezibuněčné komunikaci. Obecně tedy mohou chaperony ER hrát dvojí biologickou a imunologickou roli, která vychází především z jejich buněčné lokalizace. Intracelulární chaperony ER mají ochrannou funkci podporující přežití nádorových buněk za nepříznivých podmínek, zatímco na membránu vázané a extracelulární chaperony ER usnadňují imunologické rozpoznání nádorových buněk a jejich likvidaci.

Přes značné množství odborných prací stále zůstávají nezodpovězené otázky ohledně mechanismu exportu chaperonů ER do extracelulárního prostředí nádoru a jejich přesné extracelulární funkce. Je však zřejmé, že chaperony ovlivňují jak samotné nádorové buňky, tak i nádorové mikroprostředí. Jako stresem indukované proteiny mohou přispívat k tumorigenezi a lékové rezistenci, ale současně díky možnosti své specifické inhibice jsou zároveň i nadějnými cíli protinádorové terapie.

### Literatura

- Gidalevitz T, Stevens F, Argon Y. Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(11): 2410–2424. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.03.007.
- Lee AS. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(4): 263–276. doi: 10.1038/nrc3701.
- Shin BK, Wang H, Yam AM et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J Biol Chem* 2003; 278(9): 7607–7616.
- Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ et al. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell* 2004; 6(3): 275–284.
- Kim Y, Lillo AM, Steiniger SC et al. Targeting heat shock proteins on cancer cells: selection, characterization, and cell-penetrating properties of a peptidic GRP78 ligand. *Biochemistry* 2006; 45(31): 9434–9444.
- Liu Y, Steiniger SC, Kim Y et al. Mechanistic studies of a peptidic GRP78 ligand for cancer cell-specific drug delivery. *Mol Pharm* 2007; 4(3): 435–447.
- Gonzalez-Gronow M, Selim MA, Papalas J et al. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(9): 2299–2306. doi: 10.1089/ARS.2009.2568.
- Gray PC, Vale W. Cripto/GRP78 modulation of the TGF- $\beta$  pathway in development and oncogenesis. *FEBS Lett* 2012; 586(14): 1836–1845. doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.051.
- Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J* 2011; 434(2): 181–188. doi: 10.1042/BJ20101569.
- Sato M, Yao VJ, Arap W et al. GRP78 signaling hub a receptor for targeted tumor therapy. *Adv Genet* 2010; 69: 97–114. doi: 10.1016/S0065-2660(10)69006-2.
- Horvath I, Multhoff G, Sonnleitner A et al. Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(7–8): 1653–1664. doi: 10.1016/j.bbame.2008.02.012.
- Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 1987; 48(5): 899–907.
- Raykhel I, Alanen H, Salo K et al. A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol* 2007; 179(6): 1193–1204.
- Capitani M, Sallèse M. The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett* 2009; 583(23): 3863–3871. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.053.
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T et al. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001; 14(3): 303–313.
- Arispe N, De Maio A. ATP and ADP modulate a cation channel formed by Hsc70 in acidic phospholipid membranes. *J Biol Chem* 2000; 275(40): 30839–30843.
- Voos WK, Rottgers K. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592(1): 51–62.
- Philpott A, Krude T, Laskey RA. Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11(1): 7–14.
- Wiersma VR, Michalak M, Abdullah TM et al. Mechanisms of translocation of ER chaperones to the cell surface and immunomodulatory roles in cancer and autoimmunity. *Front Oncol* 2015; 5: 7. doi: 10.3389/fonc.2015.00007.
- Cancino J, Jung JE, Luini A. Regulation of Golgi signaling and trafficking by the KDEL receptor. *Histochem Cell Biol* 2013; 140(4): 395–405. doi: 10.1007/s00418-013-1130-9.
- Marzec M, Eletto D, Argon Y. GRP94: an HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823(3): 774–787. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.10.013.

22. De Maio A, Vazquez D. Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock* 2013; 40(4): 239–246. doi: 10.1097/SHK.0b013e3182a185ab.
23. Stolz A, Wolf DH. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(6): 694–705. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.02.005.
24. Jakobsen CG, Rasmussen N, Laenkholm AV et al. Phage display derived human monoclonal antibodies isolated by binding to the surface of live primary breast cancer cells recognize GRP78. *Cancer Res* 2007; 67(19): 9507–9517.
25. Zhang Y, Liu R, Ni M et al. Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem* 2010; 285(20): 15065–15075. doi: 10.1074/jbc.M109.087445.
26. Decca MB, Carpio MA, Bosc C et al. Post-translational arginylation of calreticulin: a new isospecies of calreticulin component of stress granules. *J Biol Chem* 2007; 282(11): 8237–8245.
27. Ling S, Cheng A, Pumpens P et al. Identification of the rheumatoid arthritis shared epitope binding site on calreticulin. *PLoS One* 2010; 5(7): e11703. doi: 10.1371/journal.pone.0011703.
28. Ling S, Pi X, Holoshitz J. The rheumatoid arthritis shared epitope triggers innate immune signaling via cell surface calreticulin. *J Immunol* 2007; 179(9): 6359–6367.
29. Graner MW, Lillehei KO, Katsanis E. Endoplasmic reticulum chaperones and their roles in the immunogenicity of cancer vaccines. *Front Oncol* 2014; 4: 379. doi: 10.3389/fonc.2014.00379.
30. Eggleton P, Reid KB, Kishore U et al. Clinical relevance of calreticulin in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6(7): 564–571.
31. Kishore U, Sontheimer RD, Sastry KN et al. The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes. *Clin Exp Immunol* 1997; 108(2): 181–190.
32. Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N et al. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* 2008; 15(9): 1499–1509. doi: 10.1038/cdd.2008.67.
33. Tarr JM, Winyard PG, Ryan B et al. Extracellular calreticulin is present in the joints of patients with rheumatoid arthritis and inhibits FasL (CD95L)-mediated apoptosis of T cells. *Arthritis Rheum* 2010; 62(10): 2919–2929. doi: 10.1002/art.27602.
34. Weber CK, Haslbeck M, Englbrecht M et al. Antibodies to the endoplasmic reticulum-resident chaperones calnexin, BiP and Grp94 in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49(12): 2255–2263. doi: 10.1093/rheumatology/keq272.
35. Tamura Y, Hirohashi Y, Kutomi G et al. Tumor-produced secreted form of binding of immunoglobulin protein elicits antigen-specific tumor immunity. *J Immunol* 2011; 186(7): 4325–4330. doi: 10.4049/jimmunol.1004048.
36. Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J Biol Chem* 2005; 280(28): 26278–26286.
37. Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J Biol Chem* 2006; 281(19): 13694–13707.
38. Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G et al. A novel receptor function for the heat shock protein Grp78: silencing of Grp78 gene expression attenuates alpha2M\*-induced signalling. *Cell Signal* 2004; 16(8): 929–938.
39. Liu R, Li X, Gao W et al. Monoclonal antibody against cell surface GRP78 as a novel agent in suppressing PI3K/AKT signaling, tumor growth, and metastasis. *Clin Cancer Res* 2013; 19(24): 6802–6811. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1106.
40. Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G et al. The role of Grp 78 in alpha 2-macroglobulin-induced signal transduction. Evidence from RNA interference that the low density lipoprotein receptor-related protein is associated with, but not necessary for, GRP 78-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 42082–42087.
41. Misra UK, Pizzo SV. Receptor-recognized alpha(2)-macroglobulin binds to cell surface-associated GRP78 and activates mTORC1 and mTORC2 signaling in prostate cancer cells. *PLoS One* 2012; 7(12): e51735. doi: 10.1371/journal.pone.0051735.
42. Zhang Y, Tseng CC, Tsai YL et al. Cancer cells resistant to therapy promote cell surface relocation of GRP78 which complexes with PI3K and enhances PI(3,4,5)P3 production. *PLoS One* 2013; 8(11): e80071. doi: 10.1371/journal.pone.0080071.
43. Gonzalez-Gronow M, Cuchacovich M, Llanos C et al. Prostate cancer cell proliferation in vitro is modulated by antibodies against glucose-regulated protein 78 isolated from patient serum. *Cancer Res* 2006; 66(23): 11424–11431.
44. Tsunemi S, Nakanishi T, Fujita Y et al. Proteomics-based identification of a tumor-associated antigen and its corresponding autoantibody in gastric cancer. *Oncol Rep* 2010; 23(4): 949–956.
45. Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(7): 741–744.
46. Altmeyer A, Maki RG, Feldweg AM et al. Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int J Cancer* 1996; 69(4): 340–349.
47. Bruneau N, Lombardo D, Bendayan M. Participation of GRP94-related protein in secretion of pancreatic bile salt-dependent lipase and in its internalization by the intestinal epithelium. *J Cell Sci* 1998; 111(Pt 17): 2665–2679.
48. Frasson M, Vitadello M, Brunati AM et al. Grp94 is Tyrosine-phosphorylated by Fyn in the lumen of the endoplasmic reticulum and translocates to Golgi in differentiating myoblasts. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(2): 239–252. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.001.
49. Zheng H, Dai J, Stoilova D et al. Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J Immunol* 2001; 167(12): 6731–6735.
50. Orr AW, Elzie CA, Kucik DF et al. Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 14): 2917–2927.
51. Orr AW, Pedraza CE, Pallero MA et al. Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly. *J Cell Biol* 2003; 161(6): 1179–1189.
52. Eggleton P, Lieu TS, Zappi EG et al. Calreticulin is released from activated neutrophils and binds to C1q and mannan-binding protein. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 72(3): 405–409.
53. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 2001; 194(6): 781–795.
54. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA et al. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol* 2002; 169(7): 3978–3986.
55. Okazaki Y, Ohno H, Takase K et al. Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2000; 275(46): 35751–35758.
56. Nimmervoll B, Chtcheglova LA, Juhasz K et al. Cell surface localised Hsp70 is a cancer specific regulator of clathrin-independent endocytosis. *FEBS Lett* 2015; 589(19 Pt B): 2747–2753. doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.037.
57. Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J et al. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 2002; 17(3): 353–362.
58. Theriault JR, Mambula SS, Sawamura T et al. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett* 2005; 579(9): 1951–1960.
59. Sims JD, McCready J, Jay DG. Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90alpha assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS One* 2011; 6(4): e18848. doi: 10.1371/journal.pone.0018848.
60. Ellerman JE, Brown CK, de Vera M et al. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(10): 2836–2848.
61. Hung CY, Tsai MC, Wu YP et al. Identification of heat-shock protein 90 beta in Japanese encephalitis virus-induced secretion proteins. *J Gen Virol* 2011; 92(Pt 12): 2803–2809. doi: 10.1099/vir.0.033993-0.
62. Chen JS, Hsu YM, Chen CC et al. Secreted heat shock protein 90alpha induces colorectal cancer cell invasion through CD91/LRP-1 and NF-kappaB-mediated integrin alphaV expression. *J Biol Chem* 2010; 285(33): 25458–25466. doi: 10.1074/jbc.M110.139345.
63. Li W, Li Y, Guan S et al. Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J* 2007; 26(5): 1221–1233.
64. Liao DF, Jin ZG, Baas AS et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275(1): 189–196.
65. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 2006; 66(9): 4795–4801.
66. Li W, Tsen F, Sahu D et al. Extracellular Hsp90 (eHsp90) as the actual target in clinical trials: intentionally or unintentionally. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013; 303: 203–235. doi: 10.1016/B978-0-12-407697-6.00005-2.
67. McCready J, Sims JD, Chan D et al. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 2010; 10: 294. doi: 10.1186/1471-2407-10-294.
68. Eustace BK, Jay DJ. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle* 2004; 3(9): 1098–1100.
69. Colaco C. Autologous heat-shock protein vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2013; 9(2): 275–276.
70. Randazzo M, Terness P, Opelz G et al. Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited. *Int J Cancer* 2012; 130(10): 2219–2231. doi: 10.1002/ijc.27332.
71. Reitsma DJ, Combast AJ. Challenges in the development of an autologous heat shock protein based anti-tumor vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 2012; 8(8): 1152–1155. doi: 10.4161/hv.21382.
72. Gao P, Sun X, Chen X et al. Secretion of stress protein grp170 promotes immune-mediated inhibition of murine prostate tumor. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58(8): 1319–1328. doi: 10.1007/s00262-008-0647-6.
73. Yu X, Guo C, Yi H et al. A multifunctional chimeric chaperone serves as a novel immune modulator inducing therapeutic antitumor immunity. *Cancer Res* 2013; 73(7): 2093–2103. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1740.

# Proteiny Rab, vnitrobuněčný transport a nádorová onemocnění

## Rab Proteins, Intracellular Transport and Cancer

Černochová R., Nekulová M., Holčáková J.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Proteiny Rab jsou malé monomerní enzymy umožňující hydrolýzu guanozintrifosfát (GTP) na guanozindifosfát (GDP) a se řadí se do rozsáhlé nadrodiny proteinů Ras. Dosud bylo popsáno více než 60 těchto proteinů, které působí především jako regulátory vnitrobuněčného transportu. Většina Rab GTPáz je umístěna specificky na vnitrobuněčných membránách, kde zajišťují napojení na motorické proteiny a cytoskelet a řídí různé kroky transportních drah vč. formování a pohybu vezikulů či membránových fúzí kontrolujících sekreci, endocytózu, recyklaci a degradaci proteinů. V posledních letech je stále častěji zmiňována deregulace exprese proteinů Rab u různých typů malignit. Zvyšuje se počet onemocnění, u kterých byla zjištěna souvislost s mutacemi v proteinech Rab či v proteinech s nimi spolupracujících a přibývají důkazy o zapojení Rab do patologických stavů lidského organismu, jako je selhání imunity, obezita a diabetes, Alzheimerova choroba nebo dědičná genetická onemocnění. Funkční poruchy Rab způsobené mutacemi nebo aberantními posttranslačními modifikacemi vedou ke změnám v transportu proteinů a vezikulů, které hrají zásadní úlohu při vzniku a vývoji nádorových onemocnění a deregulace exprese Rab často ovlivňuje migraci, invazivitu, proliferaci a lékovou rezistenci nádorových buněk. **Cíle:** Tento článek shrnuje základní funkce proteinů Rab v buňce, popisuje mechanismus jejich působení a zaměřuje se na současné poznatky o úloze těchto GTPáz při karcinogenezi.

### Klíčová slova

proteiny Rab – transport proteinů – karcinogeneze

### Summary

**Background:** Rab proteins are small monomeric enzymes which belong to the large Ras protein superfamily and allow hydrolysis of guanosine triphosphate (GTP) to guanosine (GDP). Up to now more than 60 proteins have been described that act primarily as regulators of intracellular transport. Rab GTPases are mostly located at the intracellular membranes, where they provide connections to motor proteins and to the cytoskeleton and control various steps of the traffic pathways including the formation and movement of vesicles or membrane fusion controlling secretion, endocytosis, recycling and degradation of proteins. Today, the deregulated expression of Rab protein is discussed in different types of malignancies. The number of identified diseases associated with mutations in Rab proteins or their cooperating partners increases and the evidence for the involvement of Rab to the human pathologies such as the immune failure, obesity and diabetes, Alzheimer's disease or hereditary genetic diseases is growing. The malfunctions of Rab proteins caused by mutations or aberrant posttranslational modifications lead to changes in the protein and vesicle trafficking, which play a crucial role in the formation and development of cancer and the deregulation of Rab expression frequently influences the migration, invasion, proliferation and drug resistance of the tumor cells. **Aims:** This article summarizes the main functions of Rab proteins in the cells, describes the mechanism of their activity and focuses on the current knowledge about the roles of these GTPases in carcinogenesis.

### Key words

Rab GTPases – protein transport – carcinogenesis

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



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

Obdrženo/Submitted: 13. 5. 2016

Přijato/Accepted: 31. 5. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164531>

## Úvod

Proces maligní transformace buňky je ovlivněn řadou buněčných pochodů a studium procesů probíhajících v nádorových buňkách je nezbytné pro pochopení vlastností malignit a hledání vhodných přístupů při jejich léčbě. Správný průběh životního cyklu buňky je podmíněn uplatněním funkcí jednotlivých proteinů, k čemuž je nezbytná nejen jejich správná syntéza, ale i třídění uvnitř buňky a doprava k cílovým místům působení. Je zřejmé, že vnitrobuněčný transport proteinů zahrnuje široké spektrum procesů a je ovlivňován mnoha faktory. Na těchto komplikovaných procesech se značnou měrou podílejí i proteiny rodiny Rab. Proteiny Rab se účastní hned několika kroků intracelulárního transportu proteinů a jsou zapojeny i do regulace sekrece a endocytózy [1]. Odchytky v endocytóze, nepřesné cílení transportních váčků či nesprávná recyklace buněčných receptorů se následně projevují v procesech buněčné adheze, migrace a proliferace, v polaritě buněk a v jejich přežívání. Abnormality v intracelulárním transportu proteinů poté mohou iniciovat některá onemocnění, vč. nádorového bujení, Alzheimerovy choroby či autoimunitních onemocnění [2].

## Vnitrobuněčný transport proteinů

Vnitrobuněčný transport je tradičně dělen na dvě základní dráhy – exocytickou a endocytickou. Exocytóza zahrnuje transport materiálu syntetizovaného buňkou k plazmatické membráně směřující k sekreci makromolekul ven z buňky a také distribuci syntetizovaných makromolekul k organelám vlastního endomembránového systému. Endocytóza naopak označuje příjem molekul menších než 500 nm z vnějšího prostředí buňky [3]. Nejčastěji se jedná o složky plazmatické membrány, povrchové receptory a také živiny. Část endocytovaného materiálu může být recyklována a transportována zpět na povrch buňky, čímž dochází k propojení obou drah [4]. Jednotlivé transportní kroky jsou uskutečňovány prostřednictvím váčků nazývaných vezikuly. Celý transportní proces zahrnuje vytvoření vezikulu, jeho pohyb směrem k akceptoru, připojení a závěrečnou fúzi s akceptorovou membránou.

Pohyb váčku probíhá za účasti cytoskeletu nebo pomocí difuze [5].

## Exocytická dráha

Drsné endoplazmatické retikulum (ER) je buněčná organela zodpovědná za syntézu transmembránových a sekretovaných proteinů. Aby mohly nově syntetizované proteiny plnit své funkce, je nutný jejich transport k cílovým místům v buňce. Po složení proteinu, případných posttranslačních modifikací a kontrole kvality jsou proteiny shromážděny a baleny do anterográdních (směřujících vpřed) transportních vezikulů, jejichž povrch je tvořen obalovými proteiny COPII (coat protein II) [6]. Tyto transportní váčky přenášejí proteiny z ER na přilehlou, cis stranu Golgiho aparátu (GA). Soustava GA je zodpovědná za úpravu a třídění proteinů a dalších buněčných makromolekul.

Některé z proteinů, hlavně ty s cílovou lokalizací v ER, mohou být z cis strany GA vráceny zpět do ER pomocí retrográdních (zpětných) transportních vezikulů, které jsou tvořeny obalovými proteiny COPI (coat protein I) [6]. Většina proteinů je však v GA dále modifikována, případně skladována a následně přemístována z cis-GA do odvrácené, trans strany GA, resp. až na okrajovou část nazývanou trans Golgiho síť (*trans*-Golgi network – TGN), ve které dochází k hlavnímu třídění proteinů [7].

V oblasti TGN se rozhoduje o dalším osudu proteinů. Jednou z možností je dráha konstitutivní sekrece, kdy jsou proteiny nepřetržitě transportovány k plazmatické membráně a vylučovány ven z buňky. Možná je také exocytóza využívající transportní nosiče, které proteiny převzaté z TGN na určitý čas zadržují v cytozolu a vylučují je z buňky až po přijetí signálu stimulujícího exocytózu. Třetí možností je pohyb molekul z TGN anterográdním směrem do cílového místa jejich působení a poté, co splní svoji funkci, následný transport přes endozom až do lysozomu (Lys), kde jsou degradovány [8].

## Endocytická dráha

Vznik endocytického váčku z komponent plazmatické membrány je zprostředkován specifickými obalovými

proteiny, mezi které patří např. klatrin a kaveolin [3]. Endocytický váček následně fúzuje s raným endozomem (EE). Odtud většina proteinů postupuje přes pozdní endozom (LE) až k Lys, kde jsou degradovány. Některé proteiny však mohou být z EE recyklovány a transportovány zpět na plazmatickou membránu. Tímto procesem dochází k propojení endocytické a exocytické dráhy a vznikají tzv. endocytické a exocytické cykly (EECs) [4].

EECs se velkou měrou zapojují do regulace signálních buněčných drah. Je-li receptor nebo jeho ligand endocytován a následně degradován, dochází k oslabení signální dráhy, naopak transport receptorů na buněčnou membránu vede k zesílení buněčné signalizace. Příkladem může být signalizace zprostředkovaná receptorem pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor – EGFR) [4].

Z důvodu velkého množství různorodých molekul směřujících do jednotlivých cílových destinací v buňce je nezbytná dokonalá regulace jednotlivých transportních drah. Klíčovými regulátory těchto pochodů jsou proteiny rodiny Rab.

## Rab proteiny

Proteiny Rab jsou jedny z klíčových faktorů řídících vnitrobuněčný vezikulární transport. Jejich hlavními funkcemi je zajištění specifity transportu vazbou na transportní váček a definování identity jednotlivých buněčných organel. Umožňují také napojení na motorové proteiny (myozin) a cytoskelet, čímž usnadňují pohyb vezikulů s transportovaným materiálem k příslušným cílovým organelám [9]. Proteiny rodiny Rab jsou malé monomerní GTPázy, tedy enzymy hydrolyzující guanozintrifosfát (GTP) na guanozindifosfát (GDP), které se spolu s příbuznými rodinami ARF, Ran a Rho řadí do proteinové nadrodiny Ras [3]. Jejich vlastní GTPázová aktivita umožňující přechod mezi aktivními a neaktivními stavy proteinu je předurčuje k roli důležitých regulačních molekul.

## Struktura proteinů Rab

Dosud bylo v lidském genomu identifikováno přibližně 70 genů pro pro-



teiny Rab [8], které jsou lokalizovány na různých chromozomech [10]. Produkty těchto genů regulují jednotlivé kroky třídění a přenosu proteinů v různých částech buňky. Jednotlivé geny kódující různé proteiny Rab mohou podléhat alternativnímu sestřihu, což vede ke vzniku proteinových izoform s odlišnými funkcemi [10]. U mnohých proteinů Rab není jejich přesná funkce zatím známa [2].

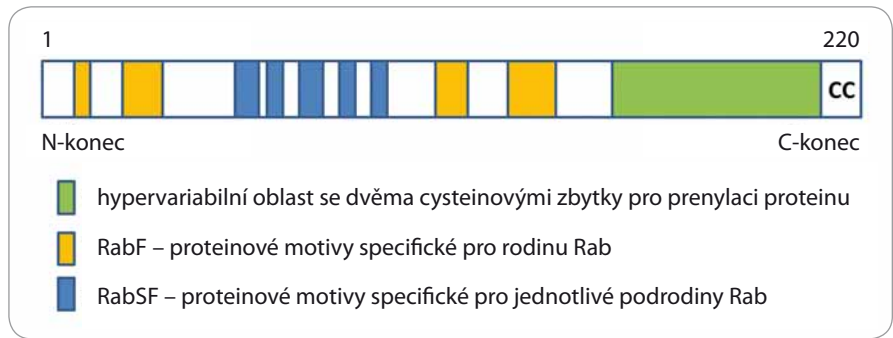
Proteiny rodiny Rab vykazují průměrně pouze 30% sekvenční homologie [2]. Jsou tvořeny přibližně 220 aminokyselinami a jejich molekulová hmotnost se pohybuje okolo 24 kDa [3].

Pro strukturu těchto proteinů je typická přítomnost několika vysoce konzervovaných oblastí vyskytujících se i u dalších zástupců nadrodiny Ras. Důležitá je guanin nukleotid vazebná doména obecně se vyskytující u GTPázy. Pět krátkých oblastí označovaných RabF1–5 bylo naopak identifikováno pouze u rodiny Rab [11]. Rodina proteinů Rab je dále dělena na tzv. podrodiny, pro které byly definovány čtyři charakteristické proteinové motivy označované RabSF1–4 [3]. Celkem bylo definováno 10 podrodin – Rab1, Rab3, Rab4, Rab5, Rab6, Rab8, Rab11, Rab22, Rab27 a Rab40, nicméně mnoho proteinů Rab není možné do těchto podrodin zařadit. V zásadě se jednotlivé proteiny Rab odlišují především v C-terminální oblasti, která je nezbytná pro správnou lokalizaci proteinu Rab v buňce [12]. Nacházejí se zde proteinové motivy XXXCC, XXCCX, XCCXX, CCXXX a XXCX (kde X je libovolná aminokyselina) obsahující dva cysteinové zbytky nezbytné pro prenylaci proteinu (viz níže) (obr. 1) [13].

**Cyklus Rab proteinů v buňce**

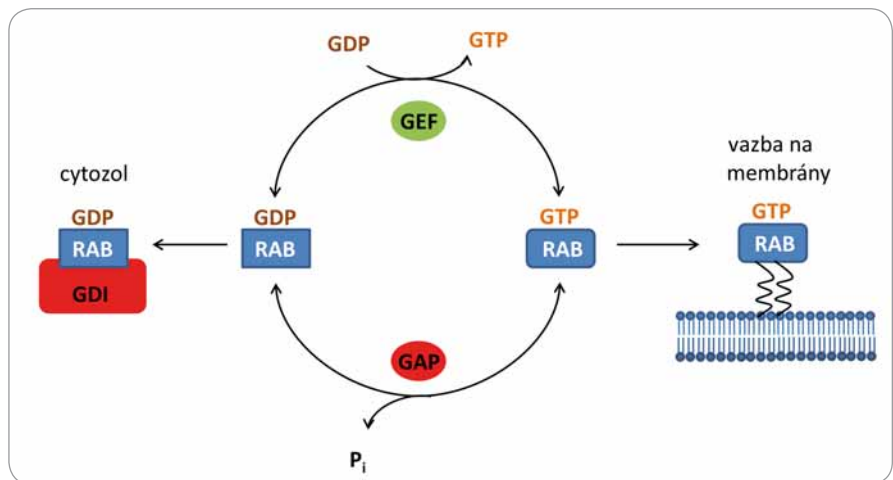
Obdobně jako jiné GTPázy, mohou se proteiny Rab vyskytovat v buňce ve dvou formách, a to v aktivní formě s navázaným GTP (Rab-GTP) a neaktivní formě s navázaným GDP (Rab-GDP). V cytozolu se vyskytují v neaktivní konformaci v komplexu s disociačním inhibitem (GDI) [10]. Pro aktivaci Rab a umožnění jeho fúze s membránou je nutné odstranění GDI a následná výměna GDP za GTP (obr. 2).

Syntéza proteinů Rab *de novo* probíhá na ribozomech v cytozolu a vede ke



**Obr. 1. Schéma struktury proteinu Rab.**

Struktura proteinu Rab s označenými motivy specifickými pro celou rodinu Rab (RabF) a pro jednotlivé podrodiny Rab (RabSF), které se podílejí na protein-proteinových interakcích. Na C-konci proteinu je hypervariabilní doména s dycysteinovým prenylačním signálem (CC).



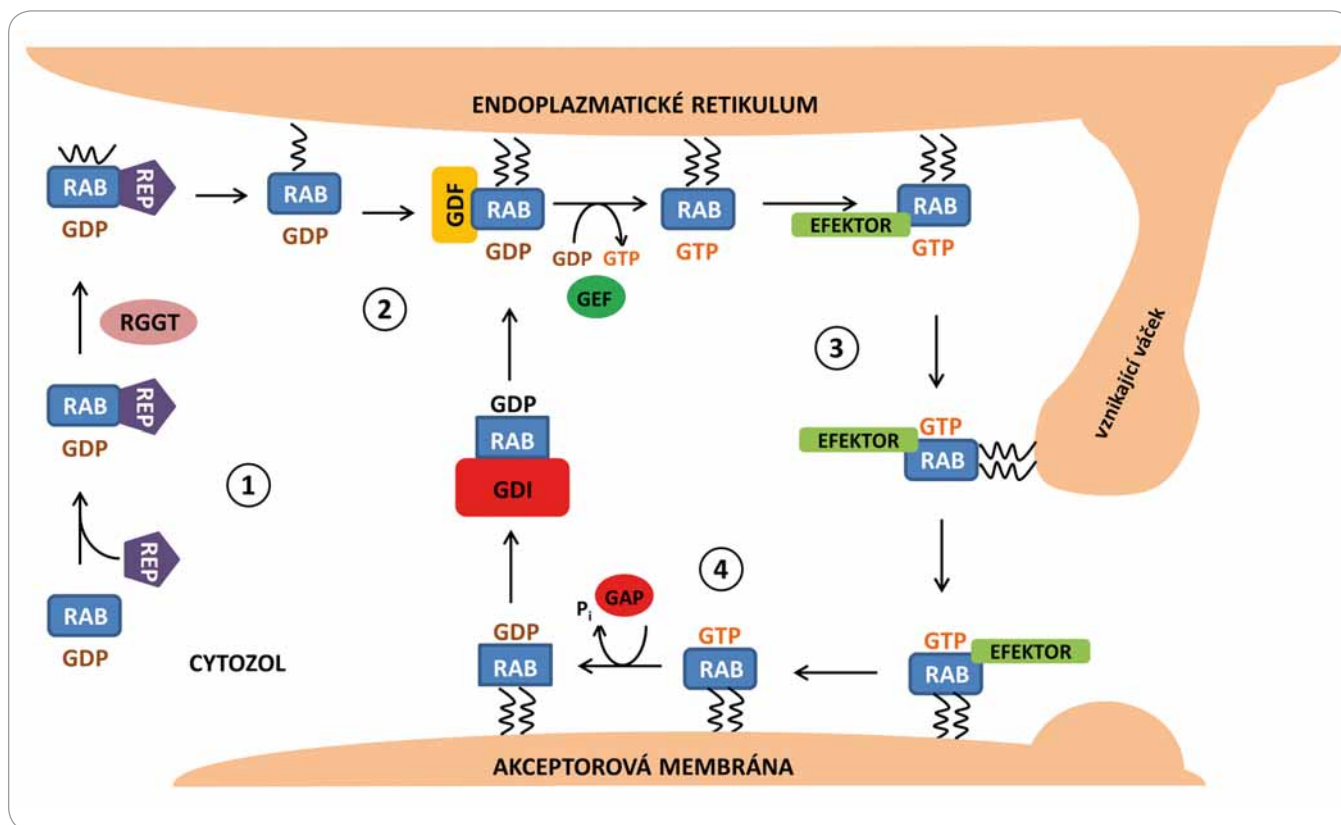
**Obr. 2. Schematické znázornění aktivace proteinů Rab v buňce.**

Proteiny Rab se vyskytují v buňce ve dvou formách – v aktivní formě s navázaným GTP a neaktivní formě s navázaným GDP. V cytozolu jsou proteiny Rab neaktivní v komplexu s disociačním inhibitorem (GDI). Pro aktivaci Rab a jeho připojení k membráně je nezbytné odstranění GDI a výměna GDP za GTP.

vzniku neaktivních forem Rab-GDP [2]. Pro jejich aktivaci je zapotřebí procesu prenylace. Prenylace proteinů je posttranskripční modifikace, při které jsou na cysteinové zbytky obsažené v proteinových motivech C-terminální oblasti připojeny izoprenoidní zbytky, které molekule dodají hydrofobní charakter a usnadní pozdější spojení daného proteinu s konkrétními místy v cílové membráně. V případě proteinů Rab se jedná o kovalentní připojení geranylové skupiny na dva cysteinové zbytky pomocí enzymu Rab geranylgeranyl transferázy (RGGT) [14]. Pokud není protein Rab prenylován, resp. geranylován, zůstává i nadále v cytozolu buňky. Nově syntetizované proteiny Rab však mají nízkou

afinitu k enzymu RGGT. Z tohoto důvodu cytozolický Rab-GDP interaguje s Rab doprovodným proteinem (REP), který napomáhá interakci s RGGT a umožní tak potřebnou modifikaci proteinu [15].

V případě potřeby jsou proteiny Rab směřovány k membráně a dochází k jejich přeměně na aktivní formu. Pro tuto aktivaci je potřeba odstranění GDI a následná výměna GDP za GTP. Regulační protein označovaný GDF podporuje připojení Rab-GDP k membráně. Po připojení může výměna guanozin nukleotidů proběhnout samovolně vlastní aktivitou Rab GTPázy, obvykle je však uskučtečněna pomocí regulačního proteinu GEF, který tento proces značně urychluje [16]. Na aktivní komplex Rab-GTP se



Obr. 3. Cyklus proteinů Rab v buňce.

1. Nově syntetizovaný protein Rab a průběh prenylace. 2. Odstranění disociačního inhibitoru, aktivace Rab a jeho připojení na membránu. 3. Zapojení jednotlivých regulačních molekul a efektorů, vznik, navedení a transport vezikulu k akceptorové membráně. 4. Hydrolyza GTP a deaktivace Rab proteinu.

následně mohou vázat další efektorové molekuly.

Po splnění své funkce je protein Rab inaktivován hydrolyzou GTP, která může proběhnout opět samovolně vlastní GTPázovou aktivitou proteinu Rab nebo s pomocí regulačního proteinu GAP, který hydrolyzu usnadňuje a také urychluje [16]. Po inaktivaci může být Rab-GDP recyklován zpět do donorového kompartmentu za účasti inhibičního regulátoru GDI, kde může být reaktivován a opětovně tak plnit svou funkci (obr. 3) [10].

### Molekuly regulující aktivitu proteinů Rab

#### GEFs a GAPs

GEFs vystupují jako pozitivní regulátory cyklu Rab proteinů stimulují výměnu GDP za GTP u proteinu Rab na membráně donorového kompartmentu, čímž podporují vznik jeho aktivní formy [2]. GAPs (GTPase activating proteins) jsou naopak negativní regulátory způsobující

hydrolyzu GTP aktivního proteinu, a tedy jeho přeměnu na neaktivní formu [17]. Obsahují regulační doménu TBC s konzervovanou oblastí obsahující aminokyseliny arginin a glutamin, které přispívají ke zrychlení katalytické aktivity GTPázy Rab [18]. Dosud bylo identifikováno nejméně 38 různých lidských GAPs [19]. Většina GEFs a GAPs jsou periferní membránové proteiny, které regulují aktivitu určitých proteinů Rab, a jiné proteiny z rodiny Rab zase mohou řídit jejich funkci. Vzniká tak síť vzájemných pozitivních a negativních interakcí mezi jednotlivými proteiny Rab [1].

#### GDI a GDFs

Funkce GDI se uplatňuje po ukončení procesu vezikulárního transportu, resp. po deaktivaci proteinu Rab a jeho disociaci z membrány. GDI preferuje vazbu na neaktivní konformaci Rab-GDP. Váže se na jeho C-terminální prenylovanou část, čímž zabraňuje interakci s membránou a protein je tak udržován v cytosolu

buňky [20]. V případě potřeby opětovné aktivace proteinu Rab se uplatní funkce proteinů GDFs, které katalyzují disociaci GDI z proteinu Rab [21].

### Mechanismus působení Rab proteinů

#### Efaktorové molekuly proteinů Rab

Proteiny Rab mohou být k transportním váčkům přidruženy hned při jejich formování na donorové membráně nebo až po určité době od jejich vzniku. Následně jsou vezikuly přemísťovány k cílovým místům pomocí difuze nebo za účasti motorových proteinů cytoskeletu [5].

Proteiny Rab ve své GTP vázané aktivní formě interagují v blízkosti svých cílových membrán s řadou efektorových molekul. Jednotlivé komplexy Rab-efektor se liší svou strukturou a podle typu proteinu Rab také svou lokalizací v buňce [22]. Obecně jsou tyto efekторы označovány jako proteiny SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive fac-

tor attachment protein receptors) [19]. Se SNAREs dále interagují SM proteiny (Sec1/Munc18-like proteins) a jiné uvazující (tethering) faktory [23].

Jako uvazující faktory jsou označovány proteiny potřebné k ukotvení váčku k membráně před samotným procesem fúze. Dělí se na dvě hlavní skupiny, které se vyskytují napříč endocytickou i sekreční dráhou [24]. První skupinou jsou homodimerické šroubovicové proteiny (coiled-coil tethering proteins), které díky své délce přibližně 200 nm mohou transportní vezikul vázat na poměrně dlouhou vzdálenost [25]. Druhou skupinu tvoří proteinové komplexy složené z několika podjednotek (multisubunit tethering complexes), které s váčkem interagují na vzdálenost pouze 30 nm po jeho předchozí vazbě s coiled-coil proteinem [26].

SNAREs jsou malé membránové proteiny, které se podle své lokalice dělí na v-SNAREs (vesicle-SNAREs) a t-SNAREs (target-SNAREs). Při formování transportních vezikulů na donorové membráně jsou do obalu váčku začleňovány v-SNAREs proteiny. Proteiny t-SNAREs jsou naopak lokalizovány na cílových membránách. Při fúzování váčku s membránou dochází k tvorbě šroubovicových trans-komplexů mezi zmínovanými typy SNAREs [19]. Při iniciaci fúzování hrají důležitou úlohu také rozpustné SM proteiny, které řídí vznik komplexů SNAREs [27].

#### Fúzování vezikulů s cílovou membránou

Proces splynutí váčku s cílovou membránou je uskutečňován pomocí fúzního aparátu. Předpokladem fúze je dostatečné přiblížení transportního váčku k cílové membráně pomocí uvazujících proteinů. Proteiny Rab se následně uplatňují při řízení a zrychlování interakcí mezi příbuznými v- a t-SNAREs. Jejich vzájemná vazba vede k vytvoření trans-komplexů přibližujících membrány do těsné blízkosti [27]. Mechanismus následného svázání obou membrán za současného vytvoření fúzního póru dosud není zcela objasněn [12]. Vytvořeným fúzním pórem může rozpustný náklad z vezikulu pronikat do cílové organely [23]. Již během procesu fúze, pří-

padně následně po přesunu nákladu do akceptorové organely, dochází k inaktivaci proteinu Rab a k jeho disociaci z membrány.

#### Vnitrobuněčná lokalizace proteinů Rab

Za podmínek dynamické rovnováhy buňky jsou proteiny Rab akumulovány u svých cílových organel, a mohou být proto považovány za markery těchto jednotlivých buněčných kompartmentů [12]. Distribuce jednotlivých proteinů Rab je z velké části ovlivněna výskytem jejich efektorových molekul [28]. Pro jednotlivé zástupce rodiny Rab je však dosud popsáno jen málo konkrétních efektorů a ty byly nejčastěji identifikovány pomocí kvasinkového dvouhybridního systému nebo metodou afinitní chromatografie. U některých zástupců proteinů Rab nebyly efektorové zatím vůbec popsány a jejich funkce tak zůstávají nejasné [29].

#### Proteiny Rab a nádorová onemocnění

V posledních desetiletích se zvyšuje počet onemocnění, u kterých byla zjištěna souvislost s mutacemi v proteinech Rab či proteinech s nimi spolupracujících. Přibývají důkazy o zapojení proteinů Rab do patologických stavů lidského organismu, jako jsou selhání imunity, výskyt obezity a diabetu, Alzheimerova choroba, dědičná genetická onemocnění (Carpenterův syndrom, Griscelliho syndrom, Heřmanského-Pudlákův syndrom apod.) nebo nádorová onemocnění [29].

Proteiny Rab jsou klíčové pro proliferaci a migraci nádorových buněk a jejich invazi do extracelulární matrix (ECM), komunikaci se stromálními buňkami a rezistenci vůči léčivům [30]. Z pohledu karcinogeneze se jako zásadní jeví zapojení proteinů Rab do přepravy buněčných povrchových receptorů. V tomto ohledu je pozornost věnována např. EGFR a receptoru pro mannosu-6-fosfát (M6PR) [8]. Transport těchto endocytovaných receptorů a s nimi asociovaných molekul mezi cytoplazmatickou membránou a membránami buněčných organel má za následek selektivní degradaci, recyklaci a sekreci signál-

ních molekul. Deregulace této endocytické dráhy může bránit normální degradaci receptorů nebo naopak vést k jejich nadměrné recyklaci a transportu zpět na buněčný povrch. Následkem těchto odchylek od běžných procesů může být narušení homeostázy buňky a změny vlastností buněk, které úzce souvisejí s procesem karcinogeneze [2]. Přehled vybraných proteinů Rab a jejich exprese u nádorových onemocnění jsou shrnuty v tab. 1 [31–68].

Dosud bylo popsáno několik mechanismů, jakými mohou proteiny Rab ovlivňovat maligní transformaci buněk a růst nádorů.

#### Změny exprese proteinů Rab v nádorových buňkách

U nádorových buněk zatím nebyla nalezena žádná aktivující mutace genů *RAB*, u různých typů nádorů však byly identifikovány odchylky v expresi proteinů Rab, které souvisejí se změnami v membránovém přenosu [69]. Příkladem jsou proteiny Rab1b, Rab4b, Rab10, Rab22a nebo Rab24, jejichž exprese je zvýšena u hepatocelulárního karcinomu [70].

Hladiny proteinů Rab1 a Rab2, které zajišťují transport mezi ER a GA, jsou zvýšeny u karcinomu jazyka [31] a vysoká hladina Rab20 byla zjištěna u karcinomu pankreatu a triple negativního karcinomu prsu [71,72].

Ze studií expresních profilů mikroRNA (miRNA) u nádorových vzorků je zřejmé, že snížení hladiny některých miRNA je spojeno s vysokou expresí proteinů Rab. Příkladem je *miR-9* a Rab34, *let-7a* a Rab40c u karcinomu žaludku [73,74] nebo *has-miR-373* a Rab22a u karcinomu střeva [75]. Zároveň mohou být geny *RAB* hypermetyleovány a jejich exprese potlačena, příkladem je Rab32 u karcinomu střeva a žaludku [63,64] nebo Rab37 u metastazujícího karcinomu plic [66].

Z veřejně dostupných databází expresního profilování vyplývá, že exprese genů *RAB* je snížena nebo zvýšena u všech typů nádorů kromě myelomů [76]. Pro správnou funkci intracelulárního transportu je patrně nutné udržení správné hladiny proteinů Rab, exprese téhož proteinu totiž může být

**Tab. 1. Přehled deregulace exprese proteinů Rab u různých typů nádorů.**

Protein	Typ nádoru	Expresa	Asociace	Reference
<b>Rab1a</b>	karcinom jazyka	zvýšení		[31]
	karcinom tlustého střeva	zvýšení	mTOR signalizace	[32]
	karcinom prostaty	snížení	regulace přes miR-221	[33]
<b>Rab1b</b>	karcinom prsu	snížení	TGF- $\beta$ , SMAD signalizace	[34]
	karcinom tlustého střeva	snížení	regulace přes miR-502	[35]
<b>Rab3a</b>	nádor mozku	zvýšení		[36]
<b>Rab3b</b>	gliom	zvýšení	regulace přes miR-200b	[37]
	karcinom prsu	zvýšení	regulace přes miR-200b	[38]
<b>Rab5a</b>	karcinom prsu	snížení	regulace přes miR-130a	[39]
	karcinom prsu	zvýšení	metastáze	[40,41]
<b>Rab6</b>	karcinom plic	snížení	regulace přes miR-5100	[42]
<b>Rab7</b>	melanom	snížení	metastáze	[43]
	karcinom plic	zvýšení		[44]
<b>Rab11a</b>	karcinom prsu	zvýšení		[45]
<b>Rab17</b>	hepatocelulární karcinom	snížení		[46,47]
<b>Rab 18</b>	nemalobuněčný karcinom plic	zvýšení	regulace přes miR-30b/c	[48]
	gliom	zvýšení	regulace přes miR-200b	[37]
	karcinom prsu	zvýšení	regulace přes miR-200b	[38]
<b>Rab21</b>	gliom	zvýšení	regulace přes miR-200b	[37]
	karcinom prsu	zvýšení	regulace přes miR-200b	[38]
<b>Rab23</b>	gliom	zvýšení		[37]
	karcinom žaludku	zvýšení	regulace přes miR-200b	[49]
	karcinom prsu	snížení	difuzní karcinom žaludku	[38]
	karcinom močového měchýře	zvýšení	regulace přes miR-200b	[50]
	hepatocelulární karcinom	zvýšení		[51]
<b>Rab25</b>	hepatocelulární karcinom	zvýšení		[52]
	nádory hlavy a krku	snížení		[53]
	nemalobuněčný karcinom plic	zvýšení		[54]
	karcinom ledvin	zvýšení	metastáze	[55]
	karcinom žaludku	zvýšení	metastáze	[56]
	karcinom vaječníku	snížení	marker dobré prognózy a celkového přežití	[57]
	karcinom prsu	zvýšení	metastáze v lymfatických uzlinách	[58]
	karcinom vaječníku	zvýšení		[59]
<b>Rab27b</b>	karcinom slinivky	zvýšení	špatná prognóza	[60]
<b>Rab31</b>	hepatocelulární karcinom	zvýšení	špatná prognóza	[61]
	karcinom prsu	zvýšení		[62]
<b>Rab32</b>	karcinom prsu	zvýšení	regulace přes miR-30e	[45]
	karcinom žaludku	snížení	hypermetylace	[63]
	karcinom tlustého střeva	snížení	hypermetylace	[64]
<b>Rab34</b>	gliom	zvýšení	špatná prognóza	[65]
<b>Rab37</b>	karcinom plic	snížení	metastazování	[66]
<b>Rab38</b>	gliom	zvýšení	vysoký grade	[67]
<b>Rab40b</b>	karcinom žaludku	zvýšení	metastáze, špatná prognóza	[68]

u jednoho typu nádorového onemocnění zvýšena, zatímco u jiného typu snížena. Příkladem je protein Rab3, který patří do podrodiny Rab5 a je lokalizován

především do TGN, kde reguluje membránový přenos z TGN do raných endozomů [77]. Rab31 je silně produkován u karcinomu prsu a je považován za

potenciální marker metastáz [62]. Zvýšená exprese Rab31 byla identifikována také u nádorů mozku, kůže, slinných žláz, pankreatu, ledvin či hlavy a krku,

nicméně u buněk nádoru plic a střeva a u leukemií byla nalezena výrazně snížená hladina Rab31 [76].

### Regulace přenosu integrinu a migrace buněk

Základní charakteristikou metastazujících buněk je jejich schopnost migrace, vniknutí do ECM a formování metastáz ve vzdálených orgánech. Proteiny podrodiny Rab11 (Rab11a, Rab11b, Rab25) a jejich efekторы hrají klíčovou úlohu v migraci buněk prostřednictvím regulace transportu a recyklace integrinů.

Nejlépe charakterizovaný je protein Rab25, který je spojován s nádory epiteliálního původu. Vysoká hladina Rab25 byla identifikována u agresivních forem karcinomu prsu a vaječníku [78]. Zvýšená hladina Rab25 v nádorových buňkách (A2780 a HEY) podporuje růst xenograftů v myších [79], naopak snížení hladiny Rab25 pomocí RNA interference (RNAi) vede k potlačení růstu nádoru [80]. Zvýšení hladiny Rab25 u buněk odvozených od karcinomu prsu a vaječníků podporuje růst buněk bez závislosti na ukotvení k povrchu, zvyšuje jejich viabilitu, snižuje expresi proapoptického genu *BAX* a zvedá fosforylaci proteinu Akt. Při odstranění Rab25 pomocí RNAi dochází k opačnému efektu – k nárůstu apoptózy vyvolané hladověním buněk nebo působením UV záření [79]. Vysoká hladina Rab25 u buněk A2780 odvozených od karcinomu vaječníku podporuje recyklaci integrinu  $\alpha 5\beta 1$  prostřednictvím vazby s podjednotkou  $\beta 1$ , zvyšuje invazi buněk v 3D matrix, a tím potenciálně ovlivňuje metastazování nádorů [81]. Nadměrná exprese Rab25 u buněk SKOV-3 (odvozených od karcinomu vaječníku) podporuje signalizaci PI3K/Akt a zvyšuje odolnost buněk vůči cisplatině [82].

Vysoká hladina Rab25 je spojena i s dalšími typy nádorů, jako je testikulární karcinom [83], Wilmsův karcinom [84], karcinom močového měchýře nebo hepatocelulární karcinom [70,85]. Naopak ztráta exprese Rab25 byla zaznamenána u triple negativních karcinomů prsu [86] nebo adenokarcinomů tlustého střeva, kde je spojena se špatnou prognózou onemocnění [87].

Rab25 je úzce příbuzný s Rab11 a může se vázat s jeho efektořem (Rab11FIP1/RCP) [88], který řídí recyklaci integrinu  $\alpha 5\beta 1$  a EGFR a ovlivňuje tak buněčnou migraci [89]. V této souvislosti byla popsána úloha Rab11 v recyklaci integrinu  $\alpha 6\beta 4$  a invazivitě buněk karcinomu prsu vyvolané hypoxií [90].

I další proteiny Rab jako Rab5 a Rab21 regulují transport integrinů. Rab5 a Rab21 jsou lokalizovány především v raných endozomech a plazmatické membráně, kde podporují endocytózu a recyklaci integrinů  $\beta 1$ , které ovlivňují adhezi a migraci buněk karcinomu prsu a prostaty (MDA-MB-231 a PC3) [91,92]. Další studie ukázaly, že snížení Rab5 a Rab21 u fibroblastů asociovaných s nádory vede k poklesu hladiny integrinů  $\alpha 5$  v plazmatické membráně a k inhibici remodelace ECM, která je nezbytná pro invazi buněk karcinomu dlaždicového epitelu [93]. Navíc se Rab5 a Rab21 vážou s dalším efektořem APPL1, který zprostředkovává EGF signalizaci a buněčnou proliferaci [94]. Zvýšená exprese Rab5 byla popsána u adenokarcinomů plic a hepatocelulárního karcinomu [95,96].

### Sekrece proteolytických enzymů a invaze buněk do ECM

Nádorové buňky sekretují mnoho typů proteáz, vč. matrix-metaloproteináz (MMP), které pomáhají buňkám proniknout bazální membránou a ECM a migrovat do vzdálených orgánů. Některé z proteinů Rab ovlivňují sekreci a aktivaci MMP. Příkladem je Rab8, který podporuje sekreci MT1-MMP (membrane-type 1 MMP) a podílí se na invazi a migraci buněk karcinomu prsu [97,98]. Podobně utváří mikroprostředí nádoru Rab4, který kontroluje sekreci prokatepsinu-L. Vysoká hladina Rab4 byla nalezena u melanomů [99]. Naopak Rab7, který snižuje sekreci katepsinu B a ovlivňuje degradaci a recyklaci receptoru c-Met, byl popsán jako negativní regulátor růstu a invazivity buněk karcinomu prostaty [100].

### Buněčný cyklus

Aberantní exprese Rab také ovlivňuje průběh buněčného cyklu. Příkladem je Rab27b, který podporuje progresi buněčného cyklu a proliferaci u MCF-7 bu-

něk [101], nebo Rab6c lokalizovaný na centrozomech buňky, jehož nadměrná exprese vede k zástavě v G1 fázi buněčného cyklu a naopak odstranění způsobuje vznik tetraploidních buněk [102]. Podobně snížená exprese Rab21 podporuje vznik mnohojaderných buněk a genomovou nestabilitu [103].

### Mnohočetná léková rezistence

Změna hladin proteinů Rab může iniciovat vznik mnohočetné lékové rezistence nádorových buněk. Rab4 reguluje hladinu P-gp, glykoproteinu lokalizovaného v membráně, který funguje jako transportér cizorodých látek a může tak snižovat koncentraci a toxicitu protinádorových léčiv v buňce a zvyšovat odolnost nádorových buněk vůči terapii. Hladina Rab4 bývá u rezistentních buněk snížena, stejně jako hladina Rab6c [104]. Naopak nadměrná exprese Rab8 podporuje odolnost buněk vůči působení cisplatinu zvýšením sekrece TMEM205 (cisplatin-resistance associated transmembrane protein 205) [105].

### Regulační proteiny GAP/GEF u nádorových buněk

Podobně jako hladiny proteinů Rab mohou být u nádorových buněk pozměněny i hladiny jejich regulačních molekul GAP a GEF. Vysoká hladina PRC17 (GAP pro Rab5) je spojena s karcinomem prostaty a transformací NIH 3T3 fibroblastů [106], TBC1D7, GAP pro Rab17, podporuje růst nádorových buněk a je asociována se špatnou prognózou u karcinomu plic [107]. Narušení funkce p85 $\alpha$  (další GAP pro Rab5) způsobuje deregulaci transportu a recyklace PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), což vede k zesílení signalizace přes Akt, ztrátě kontaktní inhibice a nádorové transformaci buněk, která se projevuje např. jejich schopností tvořit nádory u „nude“ myší [108].

### Závěr

Mutace genů *RAB* nebo jejich regulatorů byly nalezeny především u vzácných genetických poruch s autozomálně recesivní dědičností [109], nicméně je stále častěji popisován význam deregulace proteinů Rab u nádorových onemocnění. Funkční vnitrobuněčný trans-

port proteinů je nezbytný pro správnou koordinaci signálních drah řídicích proliferaci, migraci a invazi buněk a proteiny Rab jsou nezbytné pro komunikaci nádorových a stromálních buněk a formování mikroprostředí nádorů. Proto jsou proteiny Rab slibným terapeutickým cílem, které by v budoucnosti mohly být využívány při léčbě nádorových či jiných onemocnění.

## Literatura

- Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* 2011; 91(1): 119–149. doi: 10.1152/physrev.00059.2009.
- Mitra S, Cheng KW, Mills GB. Rab GTPases implicated in inherited and acquired disorders. *Semin Cell Dev Biol* 2011; 22(1): 57–68. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.12.005.
- Brighouse A, Dacks JB, Field MC. Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(20): 3449–3465. doi: 10.1007/s00018-010-0436-1.
- Scita G, Di Fiore PP. The endocytic matrix. *Nature* 2010; 463(7280): 464–473. doi: 10.1038/nature08910.
- Cottam NP, Ungar D. Retrograde vesicle transport in the Golgi. *Protoplasma* 2012; 249(4): 943–955.
- Beck R, Rawet M, Wieland FT et al. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett* 2009; 583(17): 2701–2709. doi: 10.1016/j.febslet.2009.07.032.
- Nakano A, Luini A. Passage through the Golgi. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(4): 471–478. doi: 10.1016/j.cob.2010.05.003.
- Ng EL, Gan BQ, Ng F et al. Rab GTPases regulating receptor trafficking at the late endosome-lysosome membranes. *Cell Biochem Funct* 2012; 30(6): 515–523. doi: 10.1002/cbf.2827.
- Zhang J, Fonovic M, Suyama K et al. Rab35 controls actin bundling by recruiting fascin as an effector protein. *Science* 2009; 325(5945): 1250–1254. doi: 10.1126/science.1174921.
- Seabra MC, Mules EH, Hume AN. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med* 2002; 8(1): 23–30.
- Pereira-Leal JB, Seabra MC. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J Mol Biol* 2000; 301(4): 1077–1087.
- Bhuin T, Roy JK. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp Cell Res* 2014; 328(1): 1–19. doi: 10.1016/j.jyexcr.2014.07.027.
- Li F, Yi L, Zhao L et al. The role of the hypervariable C-terminal domain in Rab GTPases membrane targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(7): 2572–2577. doi: 10.1073/pnas.1313655111.
- Gomes AQ, Ali BR, Ramalho JS et al. Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif. *Mol Biol Cell* 2003; 14(5): 1882–1899.
- Wu YW, Tan KT, Waldmann H et al. Interaction analysis of prenylated Rab GTPase with Rab escort protein and GDP dissociation inhibitor explains the need for both regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(30): 12294–12299.
- Barr F, Lambright DG. Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(4): 461–470. doi: 10.1016/j.cob.2010.04.007.
- Dumas JJ, Zhu Z, Connolly JL et al. Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure* 1999; 7(4): 413–423.
- Pan X, Eathiraj S, Munson M et al. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* 2006; 442(7100): 303–306.
- Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(8): 513–525. doi: 10.1038/nrm2728.
- Epp N, Rethmeier R, Kramer L et al. Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles–Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs. *Eur J Cell Biol* 2011; 90(9): 779–785. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.04.007.
- Dirac-Svejstrup AB, Sumizawa T, Pfeffer SR. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J* 1997; 16(3): 465–472.
- Kawasaki M, Nakayama K, Wakatsuki S. Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. *Curr Opin Struct Biol* 2005; 15(6): 681–689.
- Sztul E, Lupashin V. Role of tethering factors in secretory membrane traffic. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(1): C11–C26.
- Chia PZ, Gleeson PA. Membrane tethering. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 74. doi: 10.12703/P6-74.
- Brocker C, Engelbrecht-Vandre S, Ungermann C. Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Curr Biol* 2010; 20(21): R943–R952. doi: 10.1016/j.cub.2010.09.015.
- Yu IM, Hughson FM. Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010; 26: 137–156. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113327.
- Jahn R, Lang T, Sudhof TC. Membrane fusion. *Cell* 2003; 112(4): 519–533.
- Ortiz Sandoval C, Simmen T. Rab proteins of the endoplasmic reticulum: functions and interactors. *Biochem Soc Trans* 2012; 40(6): 1426–1432. doi: 10.1042/BST20120158.
- Gillingham AK, Sinka R, Torres IL et al. Toward a comprehensive map of the effectors of Rab GTPases. *Dev Cell* 2014; 31(3): 358–373. doi: 10.1016/j.devcel.2014.10.007.
- Recchi C, Seabra MC. Novel functions for Rab GTPases in multiple aspects of tumour progression. *Biochem Soc Trans* 2012; 40(6): 1398–1403. doi: 10.1042/BST20120199.
- Shimada K, Uzawa K, Kato M et al. Aberrant expression of RAB1A in human tongue cancer. *Br J Cancer* 2005; 92(10): 1915–1921.
- Thomas JD, Zhang YJ, Wei YH et al. Rab1A is an mTORC1 activator and a colorectal oncogene. *Cancer Cell* 2014; 26(5): 754–769. doi: 10.1016/j.ccr.2014.09.008.
- Sun T, Wang X, He HH et al. MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A. *Oncogene* 2014; 33(21): 2790–2800. doi: 10.1038/ncr.2013.230.
- Jiang HL, Sun HF, Gao SP et al. Loss of RAB1B promotes triple-negative breast cancer metastasis by activating TGF-beta/SMAD signaling. *Oncotarget* 2015; 6(18): 16352–16365.
- Zhai H, Song B, Xu X et al. Inhibition of autophagy and tumor growth in colon cancer by miR-502. *Oncogene* 2013; 32(12): 1570–1579. doi: 10.1038/ncr.2012.167.
- Kim JK, Lee SY, Park CW et al. Rab3a promotes brain tumor initiation and progression. *Mol Biol Rep* 2014; 41(9): 5903–5911. doi: 10.1007/s11033-014-3465-2.
- Liu Q, Tang H, Liu X et al. miR-200b as a prognostic factor targets multiple members of RAB family in glioma. *Med Oncol* 2014; 31(3): 859. doi: 10.1007/s12032-014-0859-x.
- Ye F, Tang H, Liu Q et al. miR-200b as a prognostic factor in breast cancer targets multiple members of RAB family. *J Transl Med* 2014; 12: 17. doi: 10.1186/1479-5876-12-17.
- Pan Y, Wang R, Zhang F et al. MicroRNA-130a inhibits cell proliferation, invasion and migration in human breast cancer by targeting the RAB5A. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(1): 384–393.
- Yang PS, Yin PH, Tseng LM et al. Rab5A is associated with axillary lymph node metastasis in breast cancer patients. *Cancer Sci* 2011; 102(12): 2172–2178. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02089.x.
- Chen Q, Liu WY, Zhao Z et al. Expression and significance of Rab5a and APPL1 in breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2012; 34(11): 838–841. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2012.11.009.
- Huang H, Jiang Y, Wang Y et al. miR-5100 promotes tumor growth in lung cancer by targeting Rab6. *Cancer Lett* 2015; 362(1): 15–24. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.004.
- Alonso-Curbelo D, Osterloh L, Canon E et al. RAB7 counteracts PI3K-driven macropinocytosis activated at early stages of melanoma development. *Oncotarget* 2015; 6(14): 11848–11862.
- Nakano T, Shimizu K, Kawashima O et al. Establishment of a human lung cancer cell line with high metastatic potential to multiple organs: gene expression associated with metastatic potential in human lung cancer. *Oncol Rep* 2012; 28(5): 1727–1735. doi: 10.3892/or.2012.1972.
- Lin Z, Li JW, Wang Y et al. Abnormal miRNA-30e expression is associated with breast cancer progression. *Clin Lab* 2016; 62(1–2): 121–128.
- Qi J, Zhao P, Li F et al. Down-regulation of Rab17 promotes tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells via Erk pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(5): 4963–4971.
- Wang K, Mao Z, Liu L et al. Rab17 inhibits the tumorigenic properties of hepatocellular carcinomas via the Erk pathway. *Tumour Biol* 2015; 36(8): 5815–5824. doi: 10.1007/s13277-015-3251-3.
- Zhong K, Chen K, Han L et al. MicroRNA-30b/c inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting Rab18. *BMC Cancer* 2014; 14: 703. doi: 10.1186/1471-2407-14-703.
- Hou Q, Wu YH, Grabsch H et al. Integrative genomics identifies RAB23 as an invasion mediator gene in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res* 2008; 68(12): 4623–4630. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5870.
- Jiang Y, Han Y, Sun C et al. Rab23 is overexpressed in human bladder cancer and promotes cancer cell proliferation and invasion. *Tumour Biol* 2015; 37(6): 8131–8138. doi: 10.1007/s13277-015-4590-9.
- Liu YJ, Wang Q, Li W et al. Rab23 is a potential biological target for treating hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13(7): 1010–1017.
- Geng D, Zhao W, Feng Y et al. Overexpression of Rab25 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion. *Tumour Biol* 2015; 37(6): 7713–7718. doi: 10.1007/s13277-015-4606-5.
- Amornphimoltham P, Rechache K, Thompson J et al. Rab25 regulates invasion and metastasis in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19(6): 1375–1388. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2858.
- Ma YF, Yang B, Li J et al. Expression of Ras-related protein 25 predicts chemotherapy resistance and prognosis in advanced non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res* 2015; 14(4): 13998–14008.
- Li Y, Jia Q, Zhang Q et al. Rab25 upregulation correlates with the proliferation, migration, and invasion of renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 458(4): 745–750. doi: 10.4238/2015.
- Liu L, Ding G. Rab25 expression predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Exp Ther Med* 2014; 8(4): 1055–1058.
- No JH, Kim K, Park KH et al. Cell-free DNA level as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* 2012; 32(8): 3467–3471.
- Yin YX, Shen F, Pei H et al. Increased expression of Rab25 in breast cancer correlates with lymphatic metastasis. *Tumour Biol* 2012; 33(5): 1581–1587. doi: 10.1007/s13277-012-0412-5.
- Gomez-Roman N, Sahasrabudhe NM, McGregor F et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha is required for the tumorigenic and aggressive phenotype associated with

- Rab25 expression in ovarian cancer. *Oncotarget* 2016; 7(16): 22650–22664. doi: 10.18632/oncotarget.7998.
60. Zhao H, Wang Q, Wang X et al. Correlation between RAB27B and p53 expression and overall survival in pancreatic cancer. *Pancreas* 2016; 45(2): 204–210. doi: 10.1097/MPA.0000000000000453.
61. Sui Y, Zheng X, Zhao D. Rab31 promoted hepatocellular carcinoma (HCC) progression via inhibition of cell apoptosis induced by PI3K/AKT/Bcl-2/BAX pathway. *Tumour Biol* 2015; 36(11): 8661–8670. doi: 10.1007/s13277-015-3626-5.
62. Kotsch M, Sieuwerts AM, Grosser M et al. Urokinase receptor splice variant uPAR-del4/5-associated gene expression in breast cancer: identification of rab31 as an independent prognostic factor. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 111(2): 229–240.
63. Shibata D, Mori Y, Cai K et al. RAB32 hypermethylation and microsatellite instability in gastric and endometrial adenocarcinomas. *Int J Cancer* 2006; 119(4): 801–806.
64. Mori Y, Yin J, Sato F et al. Identification of genes uniquely involved in frequent microsatellite instability colon carcinogenesis by expression profiling combined with epigenetic scanning. *Cancer Res* 2004; 64(7): 2434–2438.
65. Wang HJ, Gao Y, Chen L et al. RAB34 was a progression- and prognosis-associated biomarker in gliomas. *Tumour Biol* 2015; 36(3): 1573–1578. doi: 10.1007/s13277-014-2732-0.
66. Wu CY, Tseng RC, Hsu HS et al. Frequent down-regulation of hRAB37 in metastatic tumor by genetic and epigenetic mechanisms in lung cancer. *Lung Cancer* 2009; 63(3): 360–367. doi: 10.1016/j.lungcan.2008.06.014.
67. Wang H, Jiang C. RAB38 confers a poor prognosis, associated with malignant progression and subtype preference in glioma. *Oncol Rep* 2013; 30(5): 2350–2356. doi: 10.3892/or.2013.2730.
68. Li Y, Jia Q, Wang Y et al. Rab40b upregulation correlates with the prognosis of gastric cancer by promoting migration, invasion, and metastasis. *Med Oncol* 2015; 32(4): 126. doi: 10.1007/s12032-015-0562-6.
69. Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V et al. Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia* 2007; 9(2): 166–180.
70. He H, Dai F, Yu L et al. Identification and characterization of nine novel human small GTPases showing variable expressions in liver cancer tissues. *Gene Expr* 2002; 10(5–6): 231–242.
71. Amillet JM, Ferbus D, Real FX et al. Characterization of human Rab20 overexpressed in exocrine pancreatic carcinoma. *Hum Pathol* 2006; 37(3): 256–263.
72. Turner N, Lambros MB, Horlings HM et al. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene* 2010; 29(14): 2013–2023. doi: 10.1038/onc.2009.489.
73. Luo H, Zhang H, Zhang Z et al. Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 82. doi: 10.1186/1756-9966-28-82.
74. Yang Q, Jie Z, Cao H et al. Low-level expression of let-7a in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting RAB40C. *Carcinogenesis* 2011; 32(5): 713–722. doi: 10.1093/carcin/bgr035.
75. Tanaka T, Arai M, Wu S et al. Epigenetic silencing of microRNA-373 plays an important role in regulating cell proliferation in colon cancer. *Oncol Rep* 2011; 26(5): 1329–1335. doi: 10.3892/or.2011.1401.
76. Li G. Rab GTPases, membrane trafficking and diseases. *Curr Drug Targets* 2011; 12(8): 1188–1193.
77. Rodriguez-Gabin AG, Cammer M, Almazan G et al. Role of rRAB22b, an oligodendrocyte protein, in regulation of transport of vesicles from trans Golgi to endocytic compartments. *J Neurosci Res* 2001; 66(6): 1149–1160.
78. Cheng KW, Lahad JP, Gray JW et al. Emerging role of RAB GTPases in cancer and human disease. *Cancer Res* 2005; 65(7): 2516–2519.
79. Cheng KW, Lahad JP, Kuo WL et al. The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat Med* 2004; 10(11): 1251–1256.
80. Fan Y, Xin XY, Chen BL et al. Knockdown of RAB25 expression by RNAi inhibits growth of human epithelial ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Pathology* 2006; 38(6): 561–567.
81. Caswell PT, Spence HJ, Parsons M et al. Rab25 associates with alpha5beta1 integrin to promote invasive migration in 3D microenvironments. *Dev Cell* 2007; 13(4): 496–510.
82. Fan Y, Wang L, Han X et al. Rab25 is responsible for phosphoinositide 3-kinase/AKT-mediated cisplatin resistance in human epithelial ovarian cancer cells. *Mol Med Rep* 2015; 11(3): 2173–2178. doi: 10.3892/mmr.2014.2963.
83. Korkola JE, Heck S, Olshen AB et al. In vivo differentiation and genomic evolution in adult male germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47(1): 43–55.
84. Agarwal R, Jurisica I, Mills GB et al. The emerging role of the RAB25 small GTPase in cancer. *Traffic* 2009; 10(11): 1561–1568. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00969.x.
85. Mor O, Nativ O, Stein A et al. Molecular analysis of transitional cell carcinoma using cDNA microarray. *Oncogene* 2003; 22(48): 7702–7710.
86. Cheng JM, Ding M, Aribi A et al. Loss of RAB25 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 118(12): 2957–2964.
87. Nam KT, Lee HJ, Smith JJ et al. Loss of Rab25 promotes the development of intestinal neoplasia in mice and is associated with human colorectal adenocarcinomas. *J Clin Invest* 2010; 120(3): 840–849. doi: 10.1172/JCI40728.
88. Hales CM, Griner R, Hobby-Henderson KC et al. Identification and characterization of a family of Rab11-interacting proteins. *J Biol Chem* 2001; 276(42): 39067–39075.
89. Caswell PT, Chan M, Lindsay AJ et al. Rab-coupling protein coordinates recycling of alpha5beta1 integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments. *J Cell Biol* 2008; 183(1): 143–155. doi: 10.1083/jcb.200804140.
90. Yoon SO, Shin S, Mercurio AM. Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the alpha6beta4 integrin. *Cancer Res* 2005; 65(7): 2761–2769.
91. Pellinen T, Arjonen A, Vuoriluoto K et al. Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *J Cell Biol* 2006; 173(5): 767–780.
92. Mendoza P, Diaz J, Silva P et al. Rab5 activation as a tumor cell migration switch. *Small GTPases* 2014; 5(1).
93. Hooper S, Gaggioli C, Sahai E. A chemical biology screen reveals a role for Rab21-mediated control of actomyosin contractility in fibroblast-driven cancer invasion. *Br J Cancer* 2010; 102(2): 392–402. doi: 10.1038/sj.bjc.6605469.
94. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y et al. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 2005; 122(5): 735–749.
95. Li Y, Meng X, Feng H et al. Over-expression of the RAB5 gene in human lung adenocarcinoma cells with high metastatic potential. *Chin Med Sci J* 1999; 14(2): 96–101.
96. Fukui K, Tamura S, Wada A et al. Expression of Rab5a in hepatocellular carcinoma: possible involvement in epidermal growth factor signaling. *Hepatol Res* 2007; 37(11): 957–965.
97. Bravo-Cordero JJ, Marrero-Diaz R, Megias D et al. MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *EMBO J* 2007; 26(6): 1499–1510.
98. Williams KC, Coppolino MG. Phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and its vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7)-dependent trafficking facilitate cell invasion and migration. *J Biol Chem* 2011; 286(50): 43405–43416. doi: 10.1074/jbc.M111.297069.
99. Barbarin A, Frade R. Procathepsin L secretion, which triggers tumour progression, is regulated by Rab4a in human melanoma cells. *Biochem J* 2011; 437(1): 97–107. doi: 10.1042/BJ20110361.
100. Steffan JJ, Dykes SS, Coleman DT et al. Supporting a role for the GTPase Rab7 in prostate cancer progression. *PLoS One* 2014; 9(2): e87882. doi: 10.1371/journal.pone.0087882.
101. Hendrix A, Braems G, Bracke M et al. The secretory small GTPase Rab27B as a marker for breast cancer progression. *Oncotarget* 2010; 1(4): 304–308.
102. Young J, Menetrey J, Goud B. RAB6C is a retrogene that encodes a centrosomal protein involved in cell cycle progression. *J Mol Biol* 2010; 397(1): 69–88. doi: 10.1016/j.jmb.2010.01.009.
103. Pellinen T, Tuomi S, Arjonen A et al. Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. *Dev Cell* 2008; 15(3): 371–385. doi: 10.1016/j.devcel.2008.08.001.
104. Ferrandiz-Huertás C, Fernandez-Carvajal A, Ferrer-Montiel A. Rab4 interacts with the human P-glycoprotein and modulates its surface expression in multidrug resistant K562 cells. *Int J Cancer* 2011; 128(1): 192–205. doi: 10.1002/ijc.25310.
105. Shen DW, Gottesman MM. RAB8 enhances TMEM205-mediated cisplatin resistance. *Pharm Res* 2012; 29(3): 643–650. doi: 10.1007/s11095-011-0562-y.
106. Pei L, Peng Y, Yang Y et al. PRC17, a novel oncogene encoding a Rab GTPase-activating protein, is amplified in prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62(19): 5420–5424.
107. Sato N, Koinuma J, Ito T et al. Activation of an oncogenic TBC1D7 (TBC1 domain family, member 7) protein in pulmonary carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49(4): 353–367. doi: 10.1002/gcc.20747.
108. Chamberlain MD, Chan T, Oberg JC et al. Disrupted RabGAP function of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase results in cell transformation. *J Biol Chem* 2008; 283(23): 15861–15868. doi: 10.1074/jbc.M800941200.
109. Jenkins D, Seelow D, Jehue FS et al. RAB23 mutations in Carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signaling in cranial-suture development and obesity. *Am J Hum Genet* 2007; 80(6): 1162–1170.

# Vplyv inhibície HSP90 na viabilitu a bunkový cyklus v závislosti od stavu p53

## Impact of HSP90 Inhibition on Viability and Cell Cycle in Relation to p53 Status

Pastorek M., Müller P., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Súhrn

**Východiská:** Inhibícia chaperónového systému je sľubnou protinádorovou stratégiou, ktorá využíva zvýšené metabolické nároky neoplastických buniek potrebné pre ich rýchlu proliferáciu a kompenzáciu vysokej miery proteotoxického stresu. V súčasnosti sa v klinických štúdiách nachádza niekoľko inhibítorov HSP90, chaperónu, ktorý hrá kľúčovú úlohu pri nadobudnutí správnej konformácie širokého spektra *de novo* syntetizovaných proteínov. Jedným z jeho klientov je aj tumor supresorový proteín p53, ktorého mutácia je spoločným znakom väčšiny nádorových ochorení. Cieľom tejto práce bolo preto porovnať efekt inhibície HSP90 pomocou inhibítora NVP-AUY922 na modeli bunkovej línie karcinómu prsníka s aktívnou formou p53 a z nej odvodenú líniu, kde bol p53 mutáciou inaktívovaný. **Metódy:** Prietoková cytometria bola použitá na analýzu viability pomocou fluoresceín diacetate (FDA) assay a na analýzu bunkového cyklu. Western blotting bol použitý na analýzu expresie proteínov p53 a p21. **Výsledky:** Analýza viability a bunkového cyklu ukázala vyššiu senzitivitu na inhibíciu HSP90 u línie s wild-type p53, ktorá sa na rozdiel od línie s mutovaným p53 prejavila nielen blokom v G2/M, ale aj v zníženej schopnosti proliferácie buniek. Po inhibícii HSP90 sme vo wild-type línii oproti línii s mutovaným p53 pozorovali tiež indukciu proteínu p21. **Záver:** V regulácii bunkového cyklu v podmienkach zvýšeného proteotoxického stresu spôsobeného inhibíciou HSP90 pravdepodobne hrá úlohu aj proteín p53, čo podporuje aj vo wild-type línii pozorované zvýšenie hladiny negatívneho regulátora bunkového cyklu p21, ktorého expresia je priamo kontrolovaná aktivitou p53. Naše výsledky naznačujú, že status mutácie p53 v nádoroch prsníka môže ovplyvniť liečbu pomocou inhibítorov chaperónu HSP90.

### Kľúčové slová

karcinóm prsníka – bunkový cyklus – chaperon – HSP90 – TP53 – p21 – p53 – NVP-AUY922

### Summary

**Background:** Chaperone system inhibition is a recent promising strategy for cancer treatment that exploits increased metabolic needs required for rapid proliferation as well as higher level of proteotoxic stress in neoplastic cells. Chaperone HSP90 plays a key role in proper folding of many *de novo* synthesized proteins, so-called clients, including tumor suppressor p53 which is commonly mutated in majority of cancers. Aim of this work was therefore to understand the impact of HSP90 inhibition by NVP-AUY922 on breast cancer cell lines with wild-type and mutated p53. **Methods:** Flow cytometry was used to analyze cell viability by fluorescein diacetate assay and changes in cell cycle. Western blotting was used to analyze expression of p53 and p21 proteins. **Results:** Analysis of cell viability after HSP90 inhibition revealed higher sensitivity of cell line with wild-type p53. Cell cycle analysis then showed that both cell lines undergo increase in G2/M block of the cell cycle, but wild-type cell line had also substantial decrease in proliferative capacity of treated cells. We also observed increased expression of negative cell cycle regulator p21 in cell line with wild-type p53. **Conclusions:** Since p21 is directly regulated by p53, our results suggest that mutation status of p53 can be important factor in treatment of breast cancer cells by HSP90 chaperone inhibition and that wild-type p53 can increase sensitivity to HSP90 inhibition.

### Key words

breast cancer – cell cycle – chaperone – HSP90 – TP53 – p21 – p53 – NVP-AUY922

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Michal Pastorek, Ph.D.  
Regionální centrum aplikované  
molekulární onkologie  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: michal.pastorek@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 6. 5. 2016

Přijato/Accepted: 17. 5. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164S40>



## Úvod

HSP90 je molekulárny chaperón s ATPázovou aktivitou, ktorý tvorí 2–3 % celkových proteínov v bunke a jeho primárnou úlohou je asistencia tzv. klientom k nadobudnutiu správnej konformácie a udržaniu ich stability. Nedávne štúdie ukazujú, že HSP90 je súčasťou mnohých chaperónových komplexov a v nich pomáha asistovať k dosiahnutiu funkčného stavu min. 10 % všetkých proteínov aspoň v niektorých fázach ich exprese [1–3]. Proteóm závislý na HSP90 sa zúčastňuje mnohých kľúčových procesov, ktoré sú spojené s vývojom a udržaním proteínovej homeostázy ako v normálnych, tak i v nádorových bunkách. V nádorových bunkách je HSP90 využívaný hlavne dvoma spôsobmi – na podporu aktivovaných alebo labilných foriem onkoproteínov, vrátane mnohých kináz a transkripčných faktorov, ktoré sú mutované, nadexprimované alebo translokované počas vzniku malignít [4] a na pufrovanie zvýšenej miery stresu, ktorá je spôsobená zmeneným metabolizmom nádorových buniek [5,6]. Vďaka zvýšeným metabolickým nárokom nádorovej bunky a faktu, že mnoho klientov HSP90 sú onkoproteíny, si nádorové bunky vytvárajú „závislosť“ na tomto chaperóne. Následkom vytvorenej závislosti je zvýšená potreba HSP90 v nádorových oproti normálnym bunkám [7]. Inhibícia aktivity HSP90 je potenciálnym terapeutickým cieľom a v súčasnosti sa viacero inhibítorov HSP90 nachádza v klinických skúškach [5,8]. Z toho vyplýva, že na inhibíciu HSP90 môžu veľmi silne odpovedať nádory, ktoré majú vysokú závislosť na onkoproteíne, ktorý je zároveň klientom HSP90. Zaujímavým príkladom u nádorov prsníka je tyrozínkinázový receptor HER2, ktorý bol identifikovaný ako klient HSP90, a oproti ostatným klientom je veľmi citlivý na inhibíciu chaperónov [9,10]. Senzitivita klientov proteínov k inhibícii HSP90 môže výrazne prispievať ku klinickej efektívnosti inhibítorov HSP90, no však iba v prípade, že je nádor na danom klientovi závislý. Medzi ďalšie klientske proteíny HSP90 patria kinázy regulujúce mitózu, ako napr. CDK, Plk, alebo Chk1 [11] a významným klientom HSP90 je aj tumor supresorový proteín p53, transkripčný

faktor regulujúci široké spektrum bunkových procesov od indukcie apoptózy po reguláciu opravy DNA. Zaujímavým faktom je, že väčšina mutantných bunkových línií derivovaných z nádorov má defektnú formu p53 neschopnú väzby na DNA, čo implikuje silný selektívny tlak na znefunkčnenie p53 počas procesu tumorigenézy [12]. To pravdepodobne súvisí s transaktivačnou schopnosťou p53 spustiť expresiu génov, ktoré riadia a spúšťajú proces apoptózy [13–17]. Jedným z dejov, ktoré môžu zároveň indukovať zastavenie bunkového delenia, ale aj p53 regulovanú apoptózu je aj zvýšená miera proteotoxického stresu. Keďže HSP90 kontroluje kvalitu veľkého množstva klientov a p53 reguluje široké spektrum bunkových procesov, je zrejme, že inaktivácia p53 môže mať po ovplyvnení inhibítormi HSP90 rozdielny výsledok v závislosti od použitého experimentálneho modelu, koncentrácie inhibítora alebo doby ovplyvnenia. Z tohto dôvodu sme si zvolili model bunkovej línie karcinómu prsníka MCF-7 a z nej derivovanej mutantnej línie MCF-7dd9, ktorá má inaktivovanú DNA väzobnú doménu p53 a ovplyvnenie inhibítorom NVP-AUY922 sme aplikovali po dobu viacerých dní v niekoľkých koncentráciách.

## Materiál a metódy

### Použité bunkové línie a kultivácia

V práci boli použité bunková línia karcinómu prsníka MCF-7 a bunková línia MCF-7dd9 derivovaná z parentálnej línie MCF-7 stabilnou transfekciou s pCMV-neoDDp53 plazmidom, ktorý kóduje dominantne negatívny skrátený myš proteín p53, s aminokyselinovými reziduami 1–14 a 302–390 pod kontrolou CMV (cytomegalovírus) promotora. Tento plazmid poskytol prof. D. P. Lane. Obe bunkové línie boli kultivované v D-MEM médiu s 10% FBS pri 37 °C a po založení na experiment ovplyvňované NVP-AUY922 (Selleckchem, USA) po 24hodinové kultivácii.

### Analýza bunkovej viability

Po skončení ovplyvnenia boli bunky trypsinizované, premyté v PBS a inkubované s 10 nM FDA (fluorescein diacetate; Sigma, USA) po dobu 20 min pri izbovej teplote a následne k nim bol pridaný PI (propidium iodide; Sigma, USA) v kon-

centracii 10 µg/ml. Vzorky boli analyzované na prietokovom cytometri BD FACSVerser™ (Beckton-Dickinson, USA), na excitáciu bol použitý 488 nm laser a fluorescenčný signál pre FDA bol zachytený 572/32 nm filtrom a pre PI 586/42 nm filtrom. Dáta boli spracované pomocou softwaru FCS Express 5 Flow Cytometry Software (De Novo Software, USA), pričom najprv bola pomocou FSC a SSC identifikovaná populácia buniek, z ktorej boli vybraté jednotlivé bunky pomocou analýzy pomeru FSC-A a FSC-H a podľa intenzity fluorescencie identifikované jednotlivé populácie na základe ich viability. Živá populácia bola charakterizovaná ako pozitívna na farbenie FDA, nekrotická ako pozitívna na farbenie PI a apoptická ako negatívna na obe farbenia.

### Analýza bunkového cyklu

Po skončení ovplyvnenia boli bunky trypsinizované, premyté v PBS a inkubované s 0,05% Tritonom X-100 v PBS pri 37 °C po dobu 30 min. Po skončení inkubácie bol k vzorkám pridaný PI v koncentrácii 100 µg/ml a RNáza v koncentrácii 10 µg/ml po dobu 5 min. Následne boli vzorky analyzované na prietokovom cytometri BD FACSVerser™ (Beckton-Dickinson, USA), na excitáciu bol použitý 488 nm laser a fluorescenčný signál pre bol zachytený PI 586/42 nm filtrom. Dáta boli spracované pomocou softwaru FCS Express 5 Flow Cytometry Software (De Novo Software, USA), pričom najprv bola pomocou FSC a SSC identifikovaná populácia buniek, z ktorej boli vybraté jednotlivé bunky na základe pomeru PE-A a PE-H a jednotlivé fázy bunkového cyklu boli identifikované pomocou modelu 6 multicycle plug-in pre De Novo Software.

### Analýza proliferácie buniek

Pre analýzu proliferácie buniek sme ku všetkým vzorkám pridal 5-etylnyl-2'-deoxyuridine (Santa Cruz, USA) o výslednej koncentrácii 10 µM 1 hod pred skončením ovplyvnenia a inkubovali pri 37 °C. Pri ďalšom spracovaní sme postupovali podobne ako pri analýze bunkového cyklu s rozdielom pridaním 2 µM Sulfo-Cyanine 5 azide (Lumiprobe, Germany) a inkubáciou po dobu 10 min. Vzorky sme následne analyzovali na

prietokovom cytometri BD FACSVers<sup>TM</sup> (Beckton-Dickinson, USA), na excitáciu a zachytenie fluorescenčného signálu pre PI boli použité 488 nm laser s 586/42 nm filtrom a pre Sulfo-Cyanine 5 azide bol použitý 635 nm laser s 660/10 nm. Dáta boli spracované pomocou softwaru FCS Express 5 Flow Cytometry Software (De Novo Software, USA), pričom najprv bola pomocou FSC a SSC identifikovaná populácia buniek, z ktorej boli vybrané jednotlivé bunky pomocou analýzy pomeru PE-A a PE-H a jednotlivé fázy bunkového cyklu boli identifikované podobne ako pri analýze bunkového cyklu, pričom proliferujúca populácia buniek bola identifikovaná ako pozitívna na farbenie Sulfo-Cyanine 5 azidom.

**Western blotting analýza**

Bunky sme po skončení ovplyvnenia lyzovali v RIPA pufrí s PMSF a proteázovými inhibítormi a získané proteíny sme separovali pomocou SDS-PAGE a následne preniesli na nitrocelulóзовú membránu. Nami sledované proteíny sme vizualizo-

**Tab. 1. Tabuľka znázorňuje hodnoty IC<sub>50</sub> po 24, 48 a 72 hod ovplyvnení NVP-AUY922. V kratších časových intervaloch má inaktivácia p53 protektívnu úlohu pri inhibícii HSP90.**

IC <sub>50</sub>	24 hod	48 hod	72 hod
MCF-7	1 118 nM	207 nM	43 nM
MCF-7dd9	5 712 nM	699 nM	93 nM

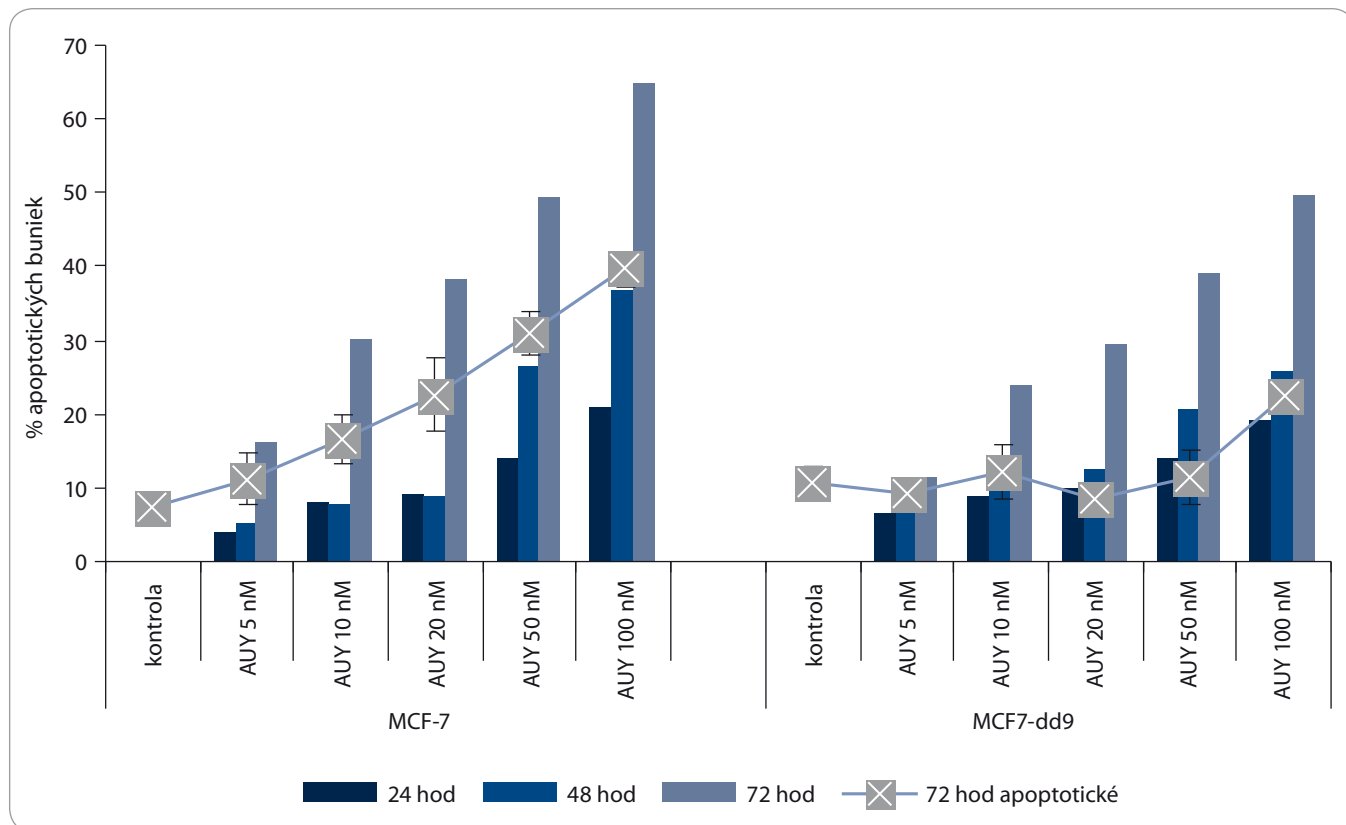
vali pomocou primárnych protilátok rieđených 1 : 1 000 proti p21 (ab118, Abcam UK), p53 (DO-1, Santa Cruz Biotechnology, USA) a aktínu (Santa Cruz Biotechnology, USA) a sekundárnej anti-mouse protilátky riedenej 1 : 2 000 (Santa Cruz Biotechnology, USA) konjugovanej s peroxidázou. Naviazané protilátky boli detekované chemiluminiscenčne.

**Výsledky**

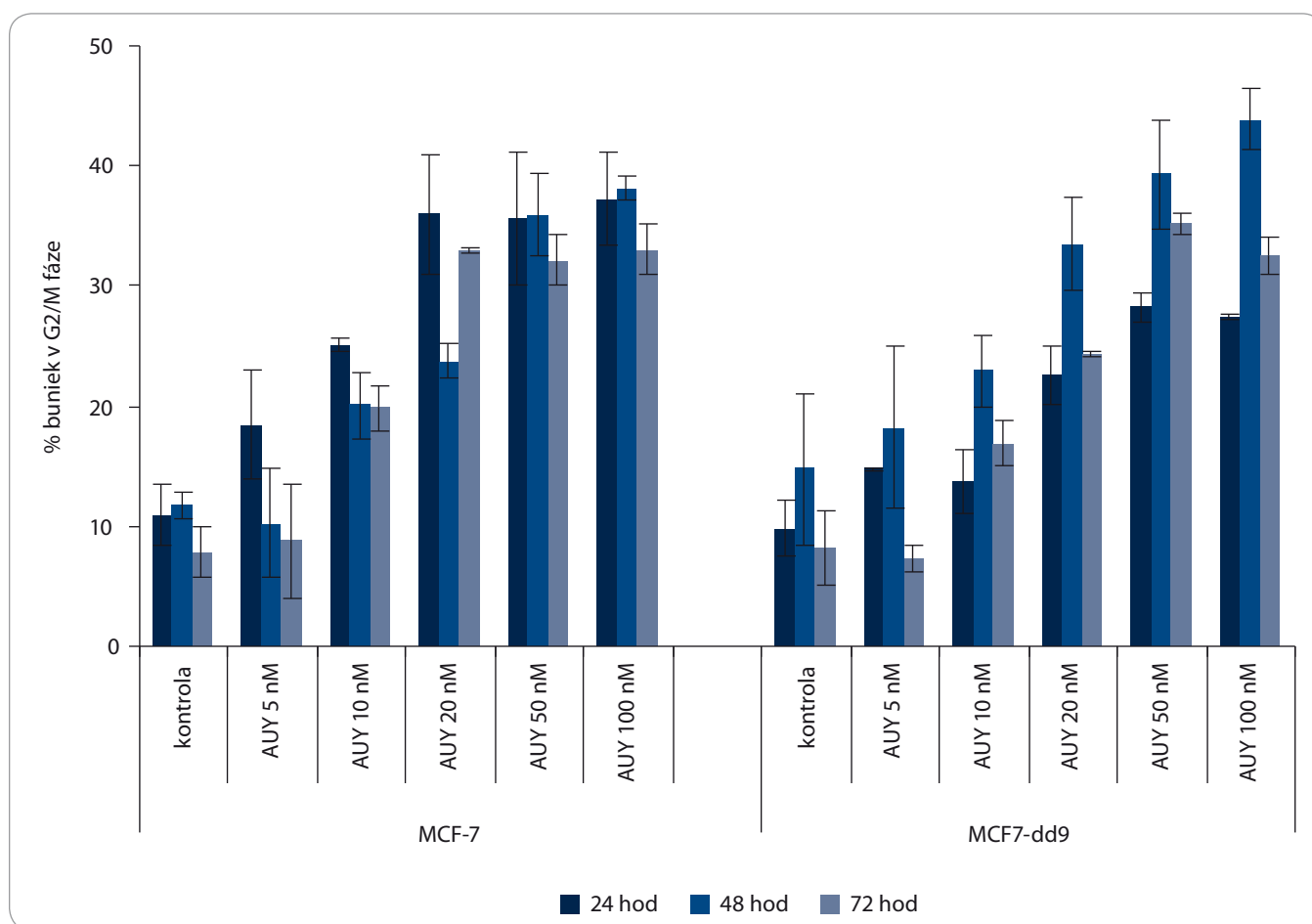
**Analýza viability**

Mutácia tumor-supresorového proteínu p53 je prítomná vo viac ako polovici nádorov a spôsobuje viaceré fenotypové a metabolické zmeny nádorových buniek, ako napr. spustenie apoptotic-

kého programu, indukciu senescencie či bloku v bunkovom cykle. IC<sub>50</sub> inhibítora NVP-AUY922 vypočítanej z miery prežívania a indukcie apoptózy sme u oboch línii stanovili pomocou prietokovej cytometrie s využitím FDA v kombinácii s PI. Princípom metódy je odštiepenie fluoresceínu od diacetátu esterázami metabolicky aktívnych buniek, ktoré sú následne vizualizované pomocou prietokového cytometra. V prípade straty metabolickej aktivity a negatívneho farbenia jadier na PI je populácia buniek nepriamo považovaná za apoptotickú, pri pozitívnom farbení PI za nekrotickú. Za výsledný efekt inhibície HSP90 sme pre účely stanovenia IC<sub>50</sub> považovali



**Graf 1. Efekt NVP-AUY922 v koncentráciách 5, 10, 20, 50 a 100 nM na viabilitu buniek po ovplyvnení na dobu 24, 48 a 72 hod a nárast apoptotickej populácie po 72 hod.**



**Graf 2. Efekt NVP-AUY922 v koncentráciách 5, 10, 20, 50 a 100 nM na zmenu G2/M fázy bunkového cyklu po ovplyvnení na dobu 24, 48 a 72 hod.**

Obe línie zaznamenali porovnateľný nárast hladiny G2/M fázy, jediný rozdiel bol pozorovaný vo vyššej miere G2/M bloku po 24 hod u línie MCF-7.

nárast apoptotickej a nekrotickej populácie oproti kontrole (tab. 1). Nami vybrané bunkové línie MCF-7 a MCF-7dd9 sme po dobu 24, 48 a 72 hod ovplyvňovali NVP-AUY922 v koncentráciách 5–100 nM. Z našich pozorovaní je zjavné, že inhibícia HSP90 má vo všetkých časoch silnejší efekt na zníženie viability buniek s wild-type p53, k čomu môže prispievať aj zvýšená miera apoptózy zrejme spôsobená indukciou down-stream mechanizmov p53 a to aj po 72 hod od ovplyvnenia (graf 1).

#### Analyza bunkového cyklu

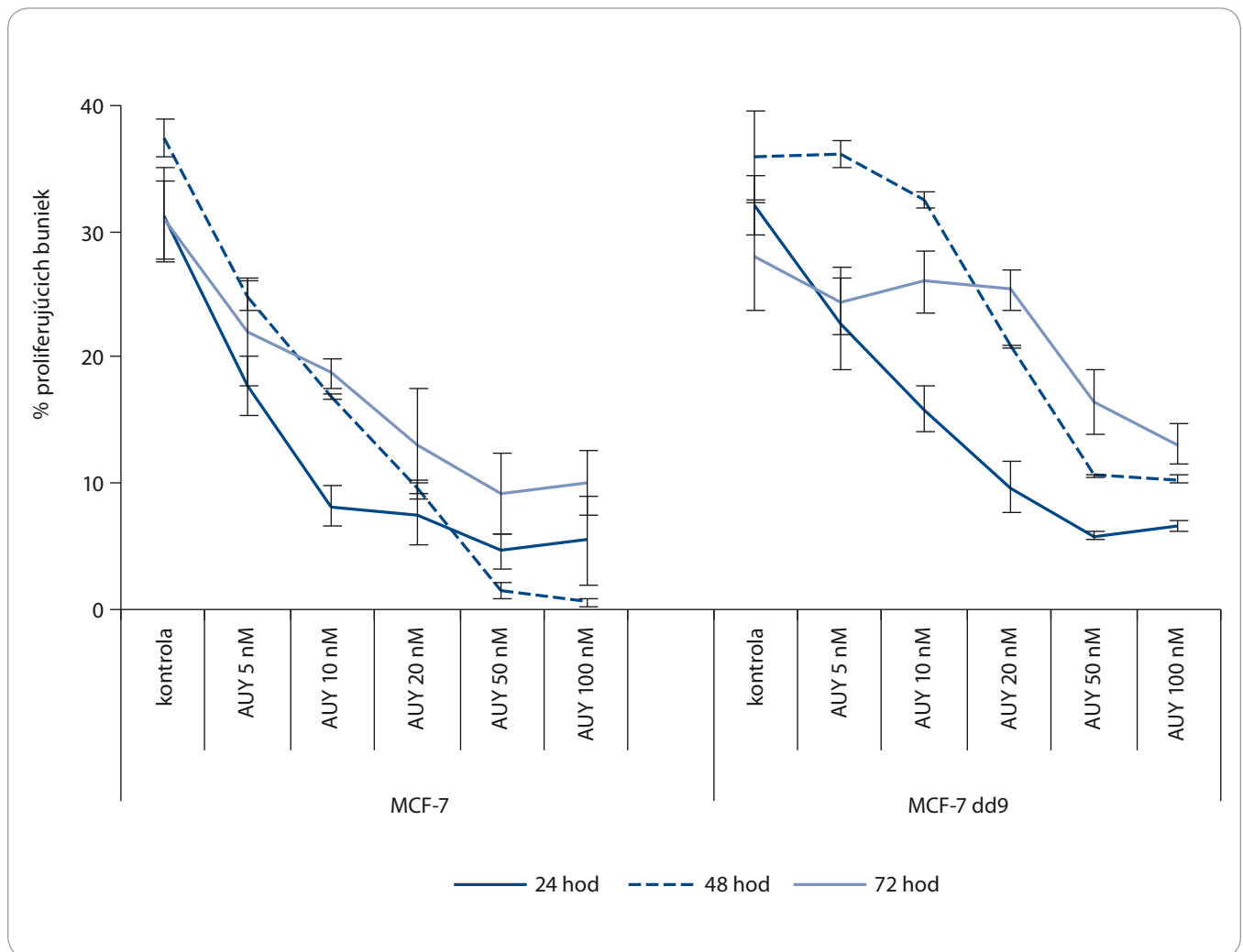
Pre analýzu bunkového cyklu sme pomocou prietokovej cytometrie vizualizovali jednotlivé fázy cyklu na základe fluorescenčného signálu PI, ktorý je priamo úmerný množstvu DNA. Obe bunkové línie MCF-7 a MCF-7dd9 sme opäť

ovplyvňovali NVP-AUY922 v koncentráciách 5–100 nM po dobu 24, 48 a 72 hod. Vo všetkých časových intervaloch sme u oboch línií pozorovali nárast G2/M bloku, ktorý rástol úmerne so zvyšujúcou sa koncentráciou NVP-AUY922. Najvýraznejší rozdiel medzi oboma líniami bol zistený po 24 hod, kedy dochádzalo k pozorovateľne vyššiemu nárastu G2/M bloku u parentálnej línie MCF-7 oproti línii MCF-7dd9 s mutovaným p53 (graf 2).

Analýza bunkového cyklu tiež ukázala mierny nárast v G1 fáze bunkového cyklu po inhibícii HSP90 a to najmä v prípade parentálnej línie MCF-7 s wild-type p53. Tento jav sme ďalej skúmali pomocou analýzy proliferácie, ktorej princípom je inkorporácia 5-etynyl-2'-deoxyuridinu do buniek, v ktorých práve prebieha replikácia DNA. Podobne ako v predchádzajúcich experimentoch sme bunky analyzovali v časoch 24, 48 a 72 hod a ovplyvňovali

koncentraciami NVP-AUY922 5–100 nM. V prípade línie MCF-7 s wild-type p53 dochádzalo k výraznejšiemu poklesu podielu proliferujúcich buniek a nárastu G1 fázy, čo môže byť spôsobené práve aktiváciou p53 závislých mechanizmov negatívne regulujúcich priebeh bunkového cyklu. Tento jav bol pozorovaný vo všetkých časových intervaloch, pričom významné rozdiely v proliferácii kontrolných vzoriek oboch bunkových línií pozorované neboli (graf 3).

Z výsledkov získaných z analýzy viability a najmä priebehu bunkového cyklu sú zjavné rozdiely v odpovedi oboch skúmaných línií na inhibíciu HSP90. Rýchlejšie zastavenie bunkového delenia a zvýšená miera apoptózy poukazuje na to, že rozdiel v odpovedi môže byť spôsobený práve stavom p53, ktorý nepriamo reguluje bunkový cyklus pomocou indukcie p21. Proteín p21 je silným inhi-



**Graf 3. Efekt NVP-AUY922 v koncentráciách 5, 10, 20, 50 a 100 nM na zmenu proliferáciu buniek vyjadrenú zmenou v S fáze bunkového cyklu po dobu 24, 48 a 72 hod.**

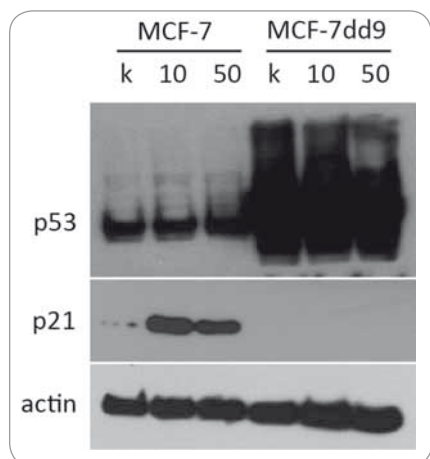
Obe línie zaznamenali zníženie proliferácie po inhibícii HSP90, no u parentálnej línie MCF-7 nastal v skoršom čase výraznejší pokles už po použití nižších koncentrácií NVP-AUY922 oproti mutantnej línii MCF-7dd9.

bítorom cyklín-dependentných kináz a inhibuje aktivitu komplexov CDK1, CDK2 a CDK4/6, vďaka čomu funguje ako regulátor prechodu G1 a S fázami bunkového cyklu. Keďže je p21 veľmi silne regulovaný transkripciou p53, rozhodli sme sa analyzovať zmeny v jeho hladine. Nakoľko zmeny v bunkovom cykle boli výrazné už po jednom dni, obe línie sme na 24 hod ovplyvnili 10 a 50 nM NVP-AUY922 a expresiu p21 sme porovnali pomocou Western blotting analýzy. Zo získaných výsledkov je evidentné, že inhibícia HSP90 spôsobuje nárast hladiny p21, ktorý je mediovaný p53, keďže k zvýšeniu hladiny p21 došlo len v prípade bunkovej línie MCF-7 a u línie MCF-7dd9 p21 pozorovaný nebol (obr. 1).

### Diskusia

Z našich experimentov vyplýva, že v prípade nádorov s wild-type p53 môže p53 následkom inhibície HSP90 a tým vzniknutého proteotoxického stresu indukovať apoptotický program. Rozdiely v mortalite buniek po inhibícii HSP90 u línie MCF-7 a MCF-7dd9 sú viditeľné vo všetkých časových intervaloch, no zaujímavé je zistenie, že rozdiel v koncentracii potrebnej na dosiahnutie dávky IC50 sa so stúpajúcim časom inhibície znižuje. Po 24 hod je IC50 pre NVP-AUY922 u parentálnej línie približne 5-krát nižšia, ako u línie MCF-7dd9, po 48 hod sa tento rozdiel zníži na približne 3,5-násobok a po 72 hod je potrebná už len 2-násobná dávka na dosiahnutie rov-

nakého efektu. Tento fenomén by mohol byť vysvetlený spustením apoptotického programu regulovaného p53 ako reakciu na vznik proteotoxického stresu po inhibícii HSP90. Avšak keďže p53 je klientom HSP90, je možné, že inhibícia tohto chaperónu počas dlhšieho časového obdobia má za následok destabilizáciu p53 a tým aj zníženie jej aktivity ako transkripcného faktora. Je totiž známe, že v prípade nesprávneho foldingu prichádza p53 ireverzibilne o schopnosť väzby na DNA [18–20], pretože HSP90 špecificky ovplyvňuje DNA väzbovú aktivitu a transkripcnú aktivitu p53 *in vivo* za bežných fyziologických podmienok [21] a väzba HSP90 na p53 je podmienená rozpoznávaním konformácie p53 [18]. Ako je



**Obr. 1. Indukcia p21 po ovplyvnení 10 a 50 nM NVP-AUY922 po dobu 24 hod.** U parentálnej línie MCF-7 bol po ovplyvnení NVP-AUY922 pozorovaný výrazný nárast hladiny p21 oproti kontrole, čo vysvetľuje indukciu G1 bloku po inhibícii HSP90. U línie MCF-7dd9 s mutovanou p53 nebol pozorovaný nárast expresie p21, čo naznačuje, že zmena jeho hladiny po inhibícii HSP90 je p53 závislá.

vidno z výsledkov merania fáz bunkového cyklu, u oboch bunkových línií dochádza ku vzniku G2/M bloku v závislosti od koncentrácie inhibítora HSP90. Ďalším možným mechanizmom účinku inhibície HSP90 tak môže byť aj smrť mitotickou katastrofou, čo podporuje fakt, že veľké množstvo proteínov zapojených do regulácie mitózy je klientmi HSP90 [22–25]. Na našom modeli bola však miera G2/M bloku podobná u oboch línií nezávisle na stave p53, čo znamená, že smrť mitotickou katastrofou neprispieva k pozorovaným rozdielom v cytotoxicite spôsobenej inhibíciou HSP90. Po inhibícii HSP90 sme tiež pozorovali výrazný pokles proliferujúcej časti populácie a to hlavne u línie s wild-type p53. Analýza expresie ukázala, že pravdepodobnou príčinou je p53 indukovaná expresia p21, ktorá spôsobí zástavu bunkového cyklu a blok v G1 fáze. Toto zistenie je prekvapujúce, keďže zástava buniek v G1 fáze cyklu by mohla mať protektívny účinok a ochrániť bunky pred smrťou mitotickou katastrofou. Sú známe prípady, kedy bolo po inhibícii HSP90 pozorované zvýšenie hladiny wild-type p53 či už na modeli chronickej lymfocytickej leukémie [26], alebo neuroblastómu [27]. Lin et al [26] navyše uvádzajú, že po inhibícii HSP90 dochádzalo

v prípade línie s mutovaným p53 odvodenej od chronickej lymfocytickej leukémie naopak k zníženiu hladiny mutovaného p53, no napriek tomu bol cytotoxický účinok inhibície HSP90 rovnaký bez ohľadu na status p53. V našom prípade sme po inhibícii HSP90 nepozorovali zmeny v expresii či už wild-type, alebo mutovaného p53. Na modeli bunkových línií karcinómu prsníka sme teda ukázali, že prítomnosť wild-type p53 má vplyv na zvýšenú mortalitu buniek po inhibícii HSP90, avšak mechanizmus, akým sa tak deje, si zasluhuje podrobnejšie skúmanie.

### Záver

Napriek intenzívnemu skúmaniu úlohy p53 pri vzniku a progresii nádorových ochorení nie je úplne známe, ako stav tohto proteínu ovplyvňuje citlivosť nádoru na nové liečebné modality indukujúce proteotoxický stres v nádorových bunkách. V našej práci sme sa preto zamerali na vplyv inhibície HSP90, ktorej účinok bol vyšší v prípade buniek s wild-type p53, napriek schopnosti p53 sprostredkovať zástavu v bunkovom cykle, ktorá by mala pre bunku pôsobiť protektívne. Možnou odpoveďou na pozorované rozdiely v toxicite inhibítora HSP90 na bunky s wild-type a mutovanou p53 by mohla byť indukcia apoptózy sprostredkovaná p53, avšak na potvrdenie tejto teórie sú potrebné ďalšie dôkazy. Nami pozorované zníženie proliferácie a vyššia mortalita buniek línie odvodenej z karcinómu prsníka s wild-type p53 teda ukazujú, že v prípade karcinómu prsníka by mohol mať stav proteínu p53 výrazné implikácie pre potenciálnu terapiu inhibítormi HSP90.

### Literatúra

- Nathan DF, Vos MH, Lindquist S. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *PNAS* 1997; 94(24): 12949–12956.
- Echeverria PC, Bernthaler A, Dupuis P et al. An interaction network predicted from public data as a discovery tool: Application to the Hsp90 molecular chaperone machine. *PLoS One* 2011; 6(10): e26044. doi: 10.1371/journal.pone.0026044.
- Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M et al. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* 2012; 150(5): 987–1001. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.047.
- Pearl LH, Prodromou C, Workman P. The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J* 2008; 410(3): 439–453. doi: 10.1042/BJ20071640.
- Workman P, Burrows F, Neckers L et al. Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic ex-

- ploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1113: 202–216.
- Trepel J, Mollapour M, Giaccone G et al. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(8): 537–549.
- Parimi S, Tsang RY. Hsp90 inhibitors in oncology: ready for prime time? *Curr Oncol* 2014; 21(5): e663–e667. doi: 10.3747/co.21.2163.
- Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Curr Pharm Des* 2013; 19(3): 347–365.
- Mimnaugh EG, Chavany C, Neckers L. Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin. *J Biol Chem* 1996; 271(37): 22796–22801.
- Chavany C, Mimnaugh E, Miller P et al. p185erbB2 binds to GRP94 in vivo. Dissociation of the p185erbB2/GRP94 heterocomplex by benzoquinone ansamycins precedes depletion of p185erbB2. *J Biol Chem* 1996; 271(9): 4974–4977.
- Vartholomaei E, Echeverria PC, Picard D. Unusual suspects in the twilight zone between the Hsp90 interactome and carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 2016; 129: 1–30. doi: 10.1016/bs.acr.2015.08.001.
- Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22(56): 9030–9040.
- Attardi LD, Lowe SW, Brugarolas J et al. Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO J* 1996; 15(14): 3693–3701.
- Chen X, Ko LJ, Jayaraman L et al. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 1996; 10(19): 2438–2451.
- el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 1998; 8(5): 345–357.
- Sax JK, el-Deiry WS. p53 downstream targets and chemosensitivity. *Cell Death Differ* 2003; 10(4): 413–417.
- Yu J, Zhang L, Hwang PM et al. Identification and classification of p53-regulated genes. *PNAS* 1999; 96(25): 14517–14522.
- Müller L, Schaupp A, Walerych D et al. Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures. *J Biol Chem* 2004; 279(47): 48846–48854.
- Bell S, Klein C, Müller L et al. p53 contains large unstructured regions in its native state. *J Mol Biol* 2002; 322(5): 917–927.
- Dawson R, Müller L, Dehner A et al. The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J Mol Biol* 2003; 332(5): 1131–1141.
- Walerych D, Kudla K, Gutkowska M et al. Hsp90 chaperones wild-type p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2004; 279(47): 48836–48845.
- Burrows F, Zhang H, Kamal A. Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 2004; 3(12): 1530–1536.
- Munoz MJ, Jimenez J. Genetic interactions between Hsp90 and the Cdc2 mitotic machinery in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 1999; 261(2): 242–250.
- Aligue R, Akhavan-Niak H, Russell P. A role for Hsp90 in cell cycle control: wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *EMBO J* 1994; 13(24): 6099–6106.
- Goes FS, Martin J. Hsp90 chaperone complexes are required for the activity and stability of yeast protein kinases Mik1, Wee1 and Swe1. *Eur J Biochem* 2001; 268(8): 2281–2288.
- Lin K, Rockliffe N, Johnson GG et al. Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53/ATM status in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene* 2008; 27(17): 2445–2455.
- Regan PL, Jacobs J, Wang G et al. Hsp90 inhibition increases p53 expression and destabilizes MYCN and MYC in neuroblastoma. *Int J Oncol* 2011; 38(1): 105–112.

# Molekulární podstata kancerogeneze epiteliálních ovariálních karcinomů

## Molecular Mechanisms of Carcinogenesis of Epithelial Ovarian Cancers

Müllerová Z.<sup>1</sup>, Müller T.<sup>1</sup>, Krivánková K.<sup>2</sup>, Vojtěšek B.<sup>2</sup>, Müller P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gynekologicko-porodnické oddělení, Nemocnice Nové Město na Moravě

<sup>2</sup> Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Epiteliální ovariální karcinomy jsou v české populaci jednou z nejčastějších příčin úmrtí na gynekologické malignity. Tato skupina nádorů je charakterizována značnou heterogenitou jak z hlediska její patogeneze, tak i odpovědí na terapii. Je otázkou, zda pokroky v objasnění molekulární patogeneze jednotlivých typů epiteliálních ovariálních karcinomů mohou v budoucnu přispět k aplikaci cílené personalizované léčby. **Cíle:** Tato práce se snaží shrnout současné poznatky o kancerogenezi a molekulární podstatě epiteliálních nádorů ovaria a ukázat na možné využití těchto poznatků v klinické praxi. Pro základní charakterizaci epiteliálních ovariálních karcinomů je využit dualistický model, který rozděluje tyto nádory do dvou skupin na základě odlišného původu a mechanismu kancerogeneze. Typ I zahrnuje low-grade serózní karcinomy, endometrioidní karcinomy, mucinózní karcinomy a Brennerův tumor, typ II pak high-grade serózní karcinomy. **Závěr:** Nově získané poznatky získané sekvenováním nové generace ukazují zásadní odlišnosti v genetických alteracích u obou skupin nádorů. Rozdíly v genetické nestabilitě mezi oběma skupinami nádorů určují způsob jejich kancerogeneze a poukazují na nové cesty pro aplikaci cílené terapie. Porucha homologní rekombinace a vysoká genetická nestabilita u nádorů typu II je hlavní příčinou jejich senzitivity k platinovým cytostatikům a inhibitorům PARP (poly-ADP ribose polymerase). Na druhou stranu kancerogeneze méně agresivních, ale často rezistentních nádorů typu I je závislá na aktivaci signálních drah PI3K/AKT a RAS/BRAF/MEK/ERK. Cílená inhibice těchto drah u nádorů typu I by tak v budoucnu mohla představovat efektivnější terapii s nižší toxicitou.

### Klíčová slova

nádor ovaria – high-grade serózní ovariální karcinom – low-grade serózní ovariální karcinom – endometrioidní karcinom – mucinózní karcinom – nádorová transformace – genetická nestabilita

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Petr Müller, Ph.D.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: muller@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 7. 8. 2016

Přijato/Accepted: 29. 8. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164546>

## Summary

**Background:** Epithelial ovarian carcinomas are one of the most common causes of death among gynecologic malignancies in the Czech population. This group of tumors is characterized by considerable heterogeneity in terms of its pathogenesis and response to therapy. It is questionable whether advances in the elucidation of molecular pathogenesis of various types of epithelial ovarian carcinomas can contribute to application of personalized targeted therapy. **Aims:** This work aims to summarize current knowledge on carcinogenesis and molecular basis of epithelial ovarian cancers and point out their potential applications in clinical practice. The characterization of the epithelial ovarian carcinomas is based on a dualistic model, which divides these tumors into two groups based on their different origins and mechanisms of carcinogenesis. Type I includes low-grade serous carcinomas, endometrioid carcinomas, mucinous carcinomas and Brenner tumor. Type II then comprises high-grade serous carcinomas. **Conclusion:** The new findings acquired by next generation sequencing revealed major differences in the genetic alterations in both groups of tumors. Differences in genetic instability between the two groups of tumors determine the mechanisms of their carcinogenesis and show new ways for application of targeted therapy. Deficient homologous recombination and high genetic instability in type II tumors is a prerequisite for efficient application of platinum cytostatics and PARP (poly-ADP ribose polymerase) inhibitors. On the other hand, carcinogenesis of the less aggressive, but often resistant type I tumour is dependent on the activation of signaling pathways PI3K/AKT and RAS/BRAF/MEK/ERK pathway. Targeted inhibition of these pathways could efficiently improve therapy of type I tumors and decrease serious adverse side effects.

## Key words

ovarian cancer – high-grade serous ovarian carcinoma – low-grade ovarian carcinoma – endometrioid carcinoma – mucinous carcinoma – malignant transformation – genetic instability

## Úvod

Gynekologické zhoubné nádory představují přibližně 15 % všech nádorových onemocnění ženské populace v ČR. Zhoubné novotvary vaječníků tvoří histopatologicky heterogenní skupinu nádorů, z nichž ovariální karcinomy jsou klinicky nejvýznamnější [1]. V současné době existuje celá řada studií zabývajících se molekulárními základy ovariální kancerogeneze a výsledky těchto prací významně napomáhají upřesnit klasifikaci ovariálních karcinomů, zlepšit prognostiku a v konečném důsledku individualizovat léčbu onemocnění. Cílem této práce je přehlednou formou shrnout nejnovější molekulárně genetické poznatky o nádorové transformaci epiteliálních ovariálních karcinomů.

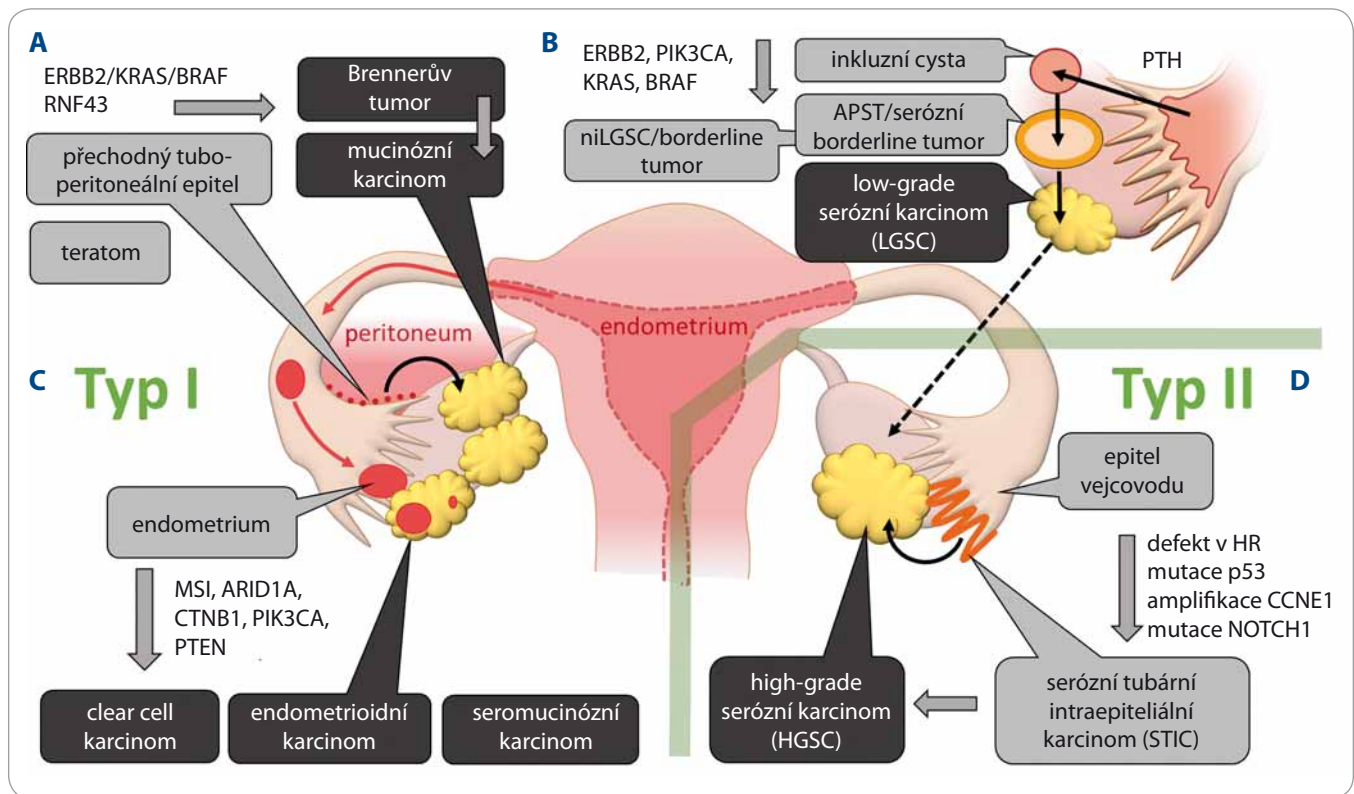
Ovariální karcinomy dlouhodobě zaujímají první místo v mortalitě na gynekologické malignity. I po absolvování adekvátního chirurgického výkonu a následné adjuvantní chemoterapii se časové rozpětí mediánu do progresu nemoci (progression-free survival – PFS) pohybuje mezi 16 a 22 měsíci, medián celkového přežití (overall survival – OS) pak mezi 2 a 4 roky a 5leté OS nedosahuje ani 30 %. V případě tzv. high-grade variant ovariálního karcinomu uvádějí některé práce progresi onemocnění po adekvátním chirurgickém výkonu a standardní adjuvantní chemoterapii s aplikací platinových derivátů v kombinaci s taxány zhruba u 25 % pacientek do šesti měsíců od zahájení léčby [2].

Hereditární výskyt onemocnění je popisován v 10–13 % případech ovariálního karcinomu a je zpravidla spojený se zárodečnou mutací v genech nádorových supresorů BRCA1 a BRCA2 [3]. V rámci klinické manifestace hereditárního ovariálního karcinomu rozlišujeme tři formy: 1. syndrom karcinomu prsu a ovaria, 2. „site-specific“ ovariální karcinom a 3. hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (hereditary non-polyposis colorectal cancer – HNPCC), tzv. Lynchův syndrom. První dvě formy charakterizují vrozené výše uvedené mutace genů BRCA1 a BRCA2, HNPCC je spojen s vrozenou mutací genů, tzv. mismatch repair systému (MMR). Celoživotní riziko vzniku karcinomu vaječníků se pohybuje pro nosičky mutací mezi 20 a 40 % a je přibližně 10–20krát vyšší než v běžné populaci. Průměrný věk vzniku dědičných forem karcinomu prsu i vaječníků je navíc snížen oproti sporadickým formám přibližně o 10 let [4].

### Klasifikace nádorů ovaria

Podle histopatologické klasifikace a buňčného původu můžeme nádory ovaria dělit do tří základních skupin: 1. nádory z povrchového epitelu, 2. stromální nádory a 3. nádory z germinálních buněk. Neepiteliální nádory ovaria jsou reprezentovány tumory z germinálních buněk (3 %) a nádory ze zárodečných pruhů a stromatu ovaria (7 %). Maligní epiteliální nádory ovaria z povrchového epitelu dále členíme na kar-

cinomy serózní, endometrioidní, mucinózní, clear cell karcinomy, Brennerův tumor a karcinomy nediferencované a smíšené [5]. V posledních letech došlo k výrazným změnám v chápání procesu tumorigeneze u ovariálního karcinomu. Skupina epiteliálních ovariálních karcinomů se skládá z různých nádorových typů, které se od sebe liší svojí molekulární patogenezi a rizikovými faktory. V souvislosti s výzkumem patogeneze a analýzami genetických alterací ovariálního karcinomu je obecně přijímáno dualistické dělení epiteliálních ovariálních karcinomů do dvou skupin. Typ I zastupuje low-grade serózní a endometrioidní karcinom, mucinózní karcinom, Brennerův tumor a clear cell karcinomy. Jsou charakteristické postupným vývojem od premaligních lézí v low-grade tumory a jejich typickým znakem je aktivace signálních drah zahrnujících protoonkogeny KRAS a BRAF. Jejich proliferace je pomalejší a 5leté OS se udává cca 55 % [6]. Typ II reprezentují nádory s výrazně horší prognózou. Naprostou většinu nádorů typu II tvoří high-grade serózní karcinomy (high-grade serous ovarian carcinoma – HGSC), zbylé patří mezi nediferencované karcinomy, karcinosarkomy a primární peritoneální karcinom. Někteří autoři přiřazují k nádorům typu II i high-grade endometrioidní karcinomy, které jsou typické přítomností mutovaného p53. Nicméně analýza mutací v těchto karcinomech ukazuje, že se v převážné většině případů



Obr. 1. Kancerogeneze epiteliálních nádorů ovaria z prekursorových lézí.

A. Vývoj mucinózního karcinomu z metaplastického epitelu v oblasti tubo-peritoneálního spojení. B. Vývoj low-grade serózních karcinomů z primární tubární hyperplazie přes kortikální inkluzní cystu (CIC) a atypický proliferativní tumor (APST). C. Na podkladě endometriózy dochází k vytváření clear cell karcinomů, endometrioidních karcinomů a seromucinózních karcinomů. D. Nádory typu II reprezentuje zejména high-grade serózní karcinom vznikající v epitelu fimbrií vejcovodu jako serózní tubární intraepiteliální karcinom (STIC).

jedná o vývojovou variantu HGSC [7,8]. Z tohoto důvodu je tento typ označován jako SET (serózní pseudoendometrioidní) varianta HGSC, která je charakterizována vyšší frekvencí mutací v genu *BRCA1* a přítomností infiltrujících lymfocytů [9]. Varianta SET rovněž vykazuje lepší odpověď na terapii. Heterogenita v rámci HGSC byla rovněž analyzována pomocí profilování genové exprese. Na základě klastrové analýzy bylo 300 vzorků HGSC rozděleno do čtyř skupin označených jako: 1. imunoreaktivní, 2. diferencovaná, 3. proliferativní a 4. mezenchymální [10,11]. Toto rozdělení rovněž koreluje s odpovědí na terapii a v případě imunoreaktivního typu podporuje hypotézu o pozitivním vlivu infiltrujících lymfocytů v odpovědi na terapii [12,13]. Mezi obecné molekulární charakteristiky HGSC odlišující tyto nádory od nádorů typu I patří: 1. přítomnost vysoké genetické nestability většinou způsobené poruchou v homolgní

rekombinaci, 2. časný výskyt mutací genu *TP53* a 3. velmi nízká frekvence mutací v genech *KRAS* a *BRAF* [11].

### Prekurzory epiteliálních nádorů ovaria

Rozdělení epiteliálních ovariálních karcinomů do dvou skupin je založeno zejména na odlišnosti v procesu jejich kancerogeneze a původu v prekursorových lézích. Nádory typu I jsou charakterizovány nižší genetickou nestabilitou a postupným přechodem z benigních a borderline tumorů k malignímu fenotypu. Přestože nádory typu I vycházejí z různých buněčných typů, je pro všechny subtypy charakteristická aktivace signálních drah zahrnující tyrozinkinázový receptor ERBB2, onkoproteiny PI3K, RAS a BRAF vedoucí k aktivaci MAP kináz MEK a ERK.

Předpokládaným primárním prekurzorem low-grade serózních karcinomů (low-grade serous ovarian carcinoma –

LGSC) je podobně jako u HGSC epitel vejcovodů. Nicméně vývoj LGSC je na rozdíl od HGSC založen na postupném přechodu z cystadenomů přes premaligní léze označované jako atypický proliferativní tumor (atypical proliferative tumor – APST) nebo též serózní borderline tumor. Domnělým primárním prekurzorem pro APST je pak papilární tubární hyperplazie, která v podobě kortikálních inkluzních cyst přechází na ovarium [14]. Další histologickou variantou premaligních lézí je neinvazivní niLGSC označovaný též jako mikropapilární serózní karcinom. Společným jmenovatelem prekurzorů LGSC je pak aktivace MAP kinázové signální dráhy nejčastěji v důsledku mutace *KRAS* u 33 % nebo *BRAF* u 25 % [15,16]. Přechod LGSC do high-grade tumorů je ojedinělý zejména z důvodu jejich odlišného průběhu kancerogeneze (obr. 1B).

Endometrioidní a clear cell karcinomy mají společné buněčné prekur-



zory, tj. epitel endometria. Pro endometriální původ obou karcinomů svědčí i molekulární znaky společné s endometriálním endometrioidním karcinomem. Základní charakteristikou těchto nádorů je aktivace PI3K kinázy, která je způsobena aktivační mutací v genu *PIK3CA* nebo inaktivační mutací fosfatázy *PTEN*. Frekvence mutací *PIK3CA* je však častější u clear cell karcinomů, zatímco k mutaci *PTEN* dochází častěji u karcinomů endometrioidních [17,18]. Další odlišností mezi oběma typy karcinomů je častější výskyt mikrosatelitní nestability (MSI) a aktivace dráhy Wnt  $\beta$ -catenin u endometrioidních karcinomů (obr. 1C).

Mucinózní karcinomy jsou ve většině případů dobře diferencované nádory, které však často vykazují značnou buněčnou heterogenitu a v určitých případech se mohou vyskytovat společně s teratomy. Vzhledem k tomu, že mucinózní karcinomy na rozdíl od ostatních epiteliálních nádorů nevykazují znaky mülleriánského původu (přítomnost estrogenových a progesteronových receptorů), není jejich buněčný původ přesně objasněn. Vedle teratomů, z nichž se mucinózní karcinomy vyvíjí spíše ojediněle, byl jako prekurzor mucinózních karcinomů určen Brennerův tumor. Jedná se obvykle o nádor menšího rozsahu a převážně benigního charakteru. Primárním prekurzorem tohoto nádoru pak byl označen metaplastický epitel v oblasti tubo-peritoneálního spojení označovaný jako Wathardova hnízda [19,20]. Imunohistochemické studie a *in situ* hybridizace ukázaly, že ztráta exprese nádorového supresoru p16 kódovaného genem *CDKN2A* je zodpovědná za zvýšenou atypickou proliferaci těchto nádorů a vývoj cystadenomu. Hypotéza o Brennerově tumoru jako prekurzoru mucinózních karcinomů je rovněž podporována nálezem společných klonálních znaků u nádorů obsahujících oba buněčné typy [21]. Typickým molekulárním znakem mucinózních karcinomů je aktivace signální dráhy ERBB2-KRAS-BRAF, která se objevuje u 90 % případů, přičemž aktivační mutace *KRAS* je při frekvenci 65 % nejčastější genetickou změnou. Oproti ostatním nádorům typu I se mucinózní karcinomy odlišují poměrně častým výskytem mutací v genu

*TP53*, které jsou přítomny až u 50 % případů (obr. 1A).

Objevení prekurzorů HGSC lze datovat do roku 2001, kdy byly histologicky vyšetřovány vzorky tkání pacientek, které preventivně podstoupily salpingo-ooforektomii z důvodu germinální mutace *BRCA1* a *BRCA2*. U 50 % z nich byly detekovány dysplastické léze vejcovodů, které morfologicky napodobují HGSC a které byly později označeny jako serózní tubární intraepiteliální karcinom (STIC) [21]. U většiny lézí pak byla rovněž detekována akumulace nádorového supresoru p53 v důsledku jeho mutace [22]. Pozdější studie vzorků pacientek nesoucích germinální mutaci v genech *BRCA1* a *BRCA2* rovněž potvrdily, že k mutaci v genu *TP53* dochází v tubárním epitelu, který je primárním prekurzorem STIC a posléze HGSC. Při důkladné analýze fimbrií byl STIC rovněž detekován jako prekurzorová léze u sporadických HGSC [23,24]. Sekvenování genomu HGSC potvrdilo, že mezi základní charakteristiky HGSC patří poruchy v homologní rekombinaci a mutace p53 (obr. 1D).

### Využití molekulární charakterizace pro cílenou léčbu ovariálních karcinomů

Všechny nádory vznikají v důsledku somatických mutací DNA, jejichž frekvence je závislá na přítomnosti genetické nestability. To však neznamená, že všechny mutace přítomné v nádorovém genomu jsou příčinou maligní transformace. Ve skutečnosti je díky novým sekvenčním technologiím detekována celá řada mutací, které k nádorovému fenotypu nemusí vůbec přispívat. Z tohoto důvodu byly zavedeny pojmy „driver“ (řídící) a „passenger“ (doprovodné) mutace [25]. Cílem tohoto konceptu je oddělit mutace, které se přímo podílejí na nádorové transformaci, od těch, které vzniknou pouze v důsledku zvýšené genetické nestability. Driver mutace na rozdíl od passenger mutací poskytují v průběhu maligní transformace buňkám výhodu a vedou ke klonálním expanzím buněk nesoucích právě tyto mutace. Rozlišení driver mutací od passenger mutací je pak klíčovým cílem pro aplikaci nových sekvenčních tech-

nologií v klinické praxi. Identifikace driver mutací zodpovědných za nádorovou transformaci by tak v blízké budoucnosti mohla přinést nejen zlepšení v diagnostice ovariálních karcinomů, ale zejména otevřít nové možnosti pro cílenou personalizovanou léčbu.

Geny, jejichž mutace mají zásadní vliv na vývoj epiteliálních ovariálních karcinomů, lze z hlediska jejich funkce rozdělit do tří základních skupin: 1. geny zodpovědné za opravu DNA a udržování integrity genomu, 2. protoonkogeny a 3. geny kódující nádorové supresory.

### Genetická nestabilita

Genetická nestabilita je jednou ze základních vlastností nádorových buněk, která katalyzuje sled genetických změn nutných pro maligní transformaci. Genetická nestabilita je charakterizována jako soubor poruch vedoucích k patologickému zmnožení genů nebo částí chromozomů, translokacím genů, aneuploidii nebo zvýšenému počtu mutací. U ovariálních karcinomů se na genetické nestabilitě podílejí zejména poruchy v mechanismech zodpovědných za opravu poškozené DNA. Jedním z nejdůležitějších opravných mechanismů je homologní rekombinace, která využívá sesterské chromatidy jako templát k opravě dvouvláknových zlomů DNA. Poškození homologní rekombinace u HGSC je pak příčinou vysoké genomové nestability a abnormálně vysoké frekvence mutací. Příčinou poruchy v homologní rekombinaci u high-grade karcinomů je nejčastěji mutace nebo metylace genů *BRCA1* a *BRCA2*, genu *CDK12*, *CHEK2* nebo *BRIP1*, přičemž změny genů *BRCA1* a *BRCA2* jsou nejčastější a z klinického hlediska nejvýznamnější [26].

Na rozdíl od HGSC vykazuje skupina nádorů označovaná jako typ I menší genetickou nestabilitu projevující se zejména menším počtem chromozomálních abnormalit. Klinicky nejvýznamnější poruchou v reparaci DNA ve skupině ovariálních karcinomů typu I je MSI. Tato porucha je způsobena mutacemi nebo metylacemi v genech zodpovědných za opravu chybného párování DNA, tzv. MMR. Ke vzniku MSI pak dochází přednostně u endometrioidních karcinomů.

**BRCA1 a BRCA2**

BRCA proteiny jsou součástí multiproteinových komplexů, které se účastní rozpoznávání a opravy poškozené DNA. Proteiny BRCA1 a BRCA2 se účastní homologní rekombinace, která využívá sesterské vlákno jako šablónu k bezchybné opravě dvouvláknového zlomu. V případě ztráty BRCA1 a BRCA2 je porušená DNA opravována alternativním mechanismem, který vede ke vzniku mutací. Vyšší výskyt dvouvláknových zlomů pak vede k aktivaci nádorového supresoru p53, který jako transkripční faktor spouští expresi řady proapoptotických genů. Kritická role p53 při kompenzaci ztracené funkce BRCA tak může vysvětlit velmi vysoký počet somatických mutací postihujících gen *TP53* u ovariálního karcinomu [27,28]. V případě high-grade ovariálních karcinomů jsou hereditární a somatické mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* popisovány ve 21 % případů, dalších 11 % případů je spojeno se ztrátou exprese *BRCA1* v důsledku hypermetylace promotorové oblasti genu [26].

Ztráta schopnosti reparace DNA pomocí homologní rekombinace vede ke zvýšené závislosti buněk na alternativních mechanismech opravujících vzniklé zlomy. To je pravděpodobně také jeden z důvodů primární citlivosti HGSC k platinovým cytostatikům. Jedním z klíčových proteinů zajišťujících alternativní způsob opravy poškozené DNA je protein poly-ADP ribose polymerase (PARP) a jeho ztráta je pro buňky s poruchou homologní rekombinace letální. Princip této tzv. syntetické letality se proto začal využívat i v terapii HGSC a od roku 2014 je pro tento typ léčby k dispozici specifický inhibitor PARP, olaparib. V současné době jsou v řadě klinických studií testovány nové inhibitory PARP, přičemž řada z nich jako např. niraparib, iniparib nebo talazoparib jsou již ve fázi III.

**Porucha opravy chybného párování MMR**

Proteiny kódované geny MMR se účastní rozpoznání a opravy určitých typů chyb v DNA, které vznikají během replikace v nově syntetizovaném vláknu DNA. Jde zejména o chyby typu krátkých in-

zerčních a delečních smyček v úseku krátkých mono- nebo dinukleotidových repetitivních sekvencí, které vznikají sklouznutím řetězce, nebo chybou v párování bází, a to zejména v případě G-T neshody vzniklé zařazením nesprávného nukleotidu. Tyto chyby jsou opravovány komplexem MMR proteinů (tzv. MMR), zahrnující proteiny MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1, PMS2. Důsledkem ztráty funkce tohoto opravného systému je vznik krátkých inzercí DNA v postižených buňkách, které mohou být v dceřiných buňkách dále prodlužovány. K těmto změnám dochází nejčastěji v místech nazývaných mikrosatelity, které jsou charakterizovány typickými repetitivními nukleotidy GT/CA, a díky nim je tento typ genetické nestability nazýván MSI. Pro samotný nádor je však porucha opravných mechanismů MMR důležitá zejména v souvislosti s mutacemi v kódujících oblastech genu. V důsledku MSI dochází k mutacím, které narušují čtecí rámec genu, tzv. frameshift mutacím. Důsledkem porušení čtecího rámce vznikají proteiny, jejichž sekvence je změněna ve všech aminokyselinách následujících za místem mutace. Přestože jsou takové proteiny nefunkční a jsou v buňkách degradovány, představují významný zdroj nových peptidů, které jsou rozpoznávány imunitním systémem, tzv. neoantigenů. V poslední době se ukazuje, že tvorbu neoantigenů lze velmi dobře využít při cílené imunoterapii nádorů. Přítomnost MSI je také významným prediktorem při terapii kolo- rektálních karcinomů pomocí checkpoint inhibitorů, terapeutických protilátek bloku- jících povrchové molekuly PD-1 a PD-L1 [29–31]. Vzhledem k tomu, že použití checkpoint inhibitorů přineslo v posledních letech významný posun v léčbě celé řady nádorových onemocnění, zvažuje se jejich využití i pro terapii ovariálních karcinomů [32,33]. Detekce poruch MMR a MSI by se tak v budoucnu mohla stát jedním z důležitých prediktivních markerů pro terapii využívající checkpoint inhibitory.

K diagnostice MSI se používá analýza pěti specifických míst genomu, která jsou charakterizována vznikem výše popsaných mutací (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 a D17S250). Vedle prů-

kazu MSI může být pro detekci poruchy v MMR použita i analýza jednotlivých genů kódujících proteiny podílející se na MMR (MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1, PMS2), a to detekce mutací v těchto genech, metylace jejich promotorů nebo snížení jejich exprese.

**ARID1A**

Mezi další geny, jejichž mutace přispívá ke genetické nestabilitě ovariálních karcinomů, je gen *ARID1A* (AT-rich interaction domain 1A). Kóduje protein, který je součástí komplexu SWI/SNF (switch/sucrose non-fermentable), který se podílí na formování nukleosomů, remodelaci chromatinu a regulaci genové exprese. Mutace genu *ARID1A* byly detekovány zejména u endometrioidních karcinomů dělohy, kolo- rektálních karcinomů, u endometrioidních a clear cell karcinomů ovaria [34,35]. Mutace v genu *ARID1A* je jednou z počátečních genetických změn u endometrioidních ovariálních karcinomů a poukazuje tak i na proces jejich karcinogeneze. Přítomnost mutace genu *ARID1A* byla prokázána v endometrioidním epitelu u endometriomů přiléhajících ke karcinomu, ale nikoli u endometriomů vzdálenějších. Význam mutace genu *ARID1A* pro tento typ ovariálních karcinomů potvrzují i myší modely. Inaktivace genů *ARID1A* a *PIK3CA* vedla k indukci clear cell karcinomů ovaria, zatímco inaktivace *PTEN* a *ARID1A* vedla k vytváření endometrioidních karcinomů [36,37]. Současné práce ukazují, že *ARID1A* může fungovat jako nádorový supresor i jako housekeeping gen. Mutace *ARID1A* vede k indukci exprese onkogenů *PI3K* a *AKT* a naopak ke snížení exprese genu kódujícího protein MLH1, který je zodpovědný za MMR. Přestože souvislost mezi mutací v genu *ARID1A* a *MSI* byla popsána u řady nádorů, není jasné, zda mutace *ARID1A* je příčinou nebo následkem MSI. Naopak výskyt mutací *ARID1A* negativně koreluje s přítomností mutace p53, což poukazuje na možnost jejich vzájemné spolupráce při potlačování nádorové transformace.

Kromě toho, že mutace v genu *ARID1A* může být v diagnostice využita pro upřesnění původu endometrioidních a clear cell ovariálních karcinomů, uvažuje se i o jejím využití při cílené tera-

pii. Na myších modelech bylo ukázáno, že nádory nesoucí mutace *ARID1A* jsou na rozdíl od normálních buněk a nádorů s nemutovaným *ARID1A* citlivé k inhibici EZH2 metyltransferázy. EZH2 je enzym zodpovědný za metylaci histonů a podobně jako *ARID1A* se podílí na regulaci chromatinu. Specifické inhibitory EZH2 jsou v současné době testovány v několika klinických zkouškách fáze II. Další terapeutické využití mutace v genu *ARID1A* představuje aplikace inhibitorů PARP. Inhibitory EZH2 jsou tak příslibem zejména pro léčbu clear cell ovariálních karcinomů, které nesou mutaci *ARID1A* v 50 % případů a u nichž je odpověď na standardní chemoterapii velmi nízká.

### Onkogenní signalizace

Pro přehlednost lze nejvýznamnější onkogeny ovariálních epiteliálních nádorů přiřadit k několika signalizačním drahám: 1. receptorové tyrozinkinázy, 2. PI3K/AKT a mTOR, 3. MAP kinázová dráha RAS/RAF/MEK/ERK, 4. Wnt signalizace a 5. kontrola buněčného cyklu cyklin dependentními kinázami. Z hlediska současných možností a dostupnosti specifických inhibitorů je možné efektivně cílit zejména na MAP kinázovou signalizaci, cyklin dependentní kinázy a receptorové tyrozinkinázy.

### Receptorové tyrozinkinázy EGFR1 a ERBB2

EGFR a ERBB2 jsou transmembránové proteiny, které patří do rodiny receptorových tyrozinkináz. Jejich ligandem jsou peptidové růstové faktory, které po vazbě na extracelulární část receptoru vedou k jeho stabilizaci umožňující vytvořit aktivní dimer. Vytváření dimerů následně vede k vzájemné fosforylaci interagujících intracelulárních domén receptoru a transdukci signálu. Fosforylace cytoplazmatické části receptoru umožňuje navázání specifických interakčních partnerů a propagaci signálu. Mezi nejdůležitější signalizační dráhy aktivované receptory EGFR a ERBB2 patří dráhy PI3K/AKT a RAS/BRAF/MEK/ERK. Přestože aktivace obou drah hraje klíčovou roli zejména u ovariálních nádorů typu I, nejsou genetické změny u ERBB2 a EGFR příliš časté. U mucinózních a LGSC nádorů se mutace ERBB2 vyskytuje asi v 5 % [38,39].

Počet nádorů exprimujících zvýšené hladiny EGFR nebo ERBB2 je však podstatně vyšší, což vedlo ke snaze využít tyto receptory jako terapeutické cíle. V klinických zkouškách byly testovány specifické inhibitory EGFR erlotinib, gefitinib a canertinib a terapeutická protilátka cetuximab. Jako inhibitory ERBB2 byly testovány lapatinib a terapeutická protilátka trastuzumab [40–42]. V žádné z těchto studií však nebylo dosaženo požadovaného terapeutického efektu a rovněž nebyla prokázána korelace mezi expresí receptorů a terapeutickým efektem. Tento negativní výsledek lze pravděpodobně vysvětlit tím, že většina ovariálních karcinomů není na těchto receptorech závislá, protože k aktivaci příslušných signálních drah dochází díky mutacím v genech *KRAS*, *BRAF* nebo *PIK3CA*. Dalším důvodem pro nízkou efektivitu inhibitorů EGFR a ERBB2 může být zvýšená exprese jiných receptorových tyrozinkináz, jako jsou např. receptory ERBB3, ERBB4 a MET [43]. Z těchto důvodů bude pro terapii ovariálních karcinomů vhodnější testovat nové inhibitory tyrozinkináz s širším spektrem účinku a selektovat pacienty v závislosti na mutacích *KRAS* a *BRAF*. V tomto směru proběhlo několik studií, které prokazují slibný účinek multikinázového inhibitoru sunitinibu u ovariálních clear cell karcinomů [44,45].

### KRAS/BRAF/MEK/ERK

Mezi klíčové události v kancerogenezi ovariálních nádorů typu I patří aktivace mitogen aktivovaných proteinkináz (MAP) prostřednictvím kináz *KRAS* a *BRAF*. Protein *KRAS* je GTPáza, která funguje jako molekulární přepínač signalizace mezi membránovými receptory a intercelulárními kinázovými kaskádami. Mutace genu *KRAS*, ke kterým dochází téměř výhradně v kodonech 12 a 13, vedou k jeho konstitutivní aktivaci, a tím k fosforylaci cílových signálních proteinů. Z hlediska patogeneze ovariálních karcinomů je pro *KRAS* nejdůležitější cílovou molekulou kináza *BRAF*, která stejně jako *KRAS* patří k nejčastěji mutovaným proteinům nádorů typu I. Přestože bylo identifikováno více než 30 onkogenních mutací *BRAF*, 90 % případů je způsobeno bodovou mutací V600E. Aktivace kinázy *BRAF* vede

ke konstitutivní aktivaci MAP kináz *MEK* a *ERK*, které jsou zodpovědné za aktivaci transkripčních faktorů, mezi něž patří protoonkogeny *MYC*, *CREB* nebo *FOS*.

Terapeutické možnosti ovlivnění této signalizační dráhy jsou v současné době omezeny na proteiny *BRAF* a *MEK*. Inhibitory *BRAF*, vemurafenib a dabrafenib, byly schváleny pro léčbu maligního melanomu nesoucí mutaci *BRAF V600E*. V klinických zkouškách byl vemurafenib testován u LGSC s mutací *BRAF V600E* s velmi dobrou odpovědí, která ukazuje na potenciální prospěšnost testování této mutace. V roce 2009 proběhla klinická studie fáze II testující účinek inhibitoru MAP kinázy *MEK1/2*, selumetinibu, na rekurentní LGSC. Selumetinib byl dobře snášen a vykazoval odpověď na léčbu u 15 % pacientek, u 65 % pak vedl ke stabilizaci onemocnění [46]. V současné době jsou schváleny dva inhibitory *MEK1/2* kinázy, trametinib a cobimetinib, které jsou testovány i na LGSC.

### Geny regulující buněčný cyklus RB1, CCNE1

Buněčný cyklus je v průběhu každé fáze regulován komplexem cyklin dependentních kináz (CDK) a cyklinů. Pro průchod z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu je klíčovou fosforylace nádorového supresoru RB1, který funguje jako negativní regulátor přechodu do S fáze. Nefosforylovaný RB1 váže protein E2F a blokuje jeho schopnost aktivovat expresi genů nutných pro zahájení S fáze. Komplex cyklin D-CDK4/6 fosforyluje protein RB1, což vede k uvolnění a aktivaci E2F, který jako transkripční faktor spouští expresi řady genů důležitých pro přechod do S fáze, vč. cyklinu E (*CCNE1*). Mezi další negativní regulátory přechodu z G1 do S fáze patří protein p16 (*CDKN2A*) a p21 (*CDKN1A*), které přímou interakcí inhibují aktivitu CDK.

U ovariálních karcinomů dochází nejčastěji k mutacím proteinu RB1 u nádorů typu II a mutacím *CDKN2A* u nádorů typu I. Amplifikace nebo aktivační mutace v genu *CCNE1* byla zaznamenána v 19 % high-grade ovariálních karcinomů, a to zpravidla v případech, kde nebyla nalezena alterace v genech *BRCA1* a *BRCA2*. *CCNE1* je protoonkoge-

nem, jehož produktem je cyklin E. Cyklin E je klíčovým proteinem buněčného cyklu zajišťujícím přechod z G1 do S fáze. Cyklin E v komplexu s cyklin dependentní kinázou CDK2 fosforyluje řadu cílových proteinů, mezi něž patří protein RB1, p27 nebo p21. Důsledkem zvýšené aktivity cyklinu E je pak masivní replikace DNA, které je charakterizována vyšším počtem replikačních počátků a poruchami replikace DNA. Tento replikační stres následně vede k poškození DNA a k aktivaci proteinu RAD51, který zajišťuje opravu poškozené DNA pomocí homologní rekombinace [47,48]. Sekvenováním genomu high-grade ovariálních karcinomů bylo zjištěno, že amplifikace cyklinu E se vylučuje s mutacemi v genech *BRCA* a poruchou v homologní rekombinaci. Toto zjištění rovněž koreluje s primární odpovědí high-grade ovariálních karcinomů k terapii. Zatímco nádory s mutací v genech *BRCA* a nebo jinou poruchou v homologní rekombinaci vykazují dobrou primární odpověď k platinovým derivátům, nádory s amplifikací genu *CCNE1* patří mezi rezistentní a refrakterní [26]. Stanovení amplifikace genu *CCNE1* by se tak v budoucnu mohlo stát užitečným markerem určujícím citlivost k platinovým derivátům a potenciálně otevřít cestu novým cílevým terapeutikům. Novou perspektivu v terapii nádorů nesoucích amplifikaci cyklinu E by tak v budoucnu mohla přinést cílená inhibice cyklin dependentních kináz. V současné době je jako specifický inhibitor CDK schválen palbociclib, který je primárně určen k terapii nádoru prsu. Probíhající klinické zkoušky ukazují, že palbociclib vykazuje slibné účinky i v terapii rezistentních HGSC. Tyto studie se rovněž zaměřují na korelaci mezi účinkem a genetickými změnami v *CDKN2A*, *RB1* a *CCNE1* [49,50].

## Závěr

Pochopení základních mechanismů molekulární patogeneze epiteliálních ovariálních karcinomů vedlo k vytvoření nové klasifikace, která lépe reflektuje buněčný původ nádoru i odlišnosti ve způsobu jejich nádorové transformace. Poznání klíčových genetických změn v patogenezi jednotlivých typů ovariálních karcinomů pak otevírá

cestu pro aplikaci nových cílených léčiv, která vykazují nižší toxicitu a jsou příslibem zejména pro léčbu nádorů primárně rezistentních ke klasické terapii. Pro správnou klasifikaci a potenciální aplikaci cílené terapie však bude v budoucnu nutné doplnit histopatologickou klasifikaci o cílenou genetickou analýzu. Z výše uvedeného souhrnu vyplývá, že nejhodnějšími kandidáty pro sekvenční analýzu jsou geny *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *ARID1A*, *PTEN*, *BRIP1*, *RB1*, *CDKN2A*, *CDK12*, *CHEK2*, *CTNNB1* a *ERBB2*. Další genetické analýzy by pak měly být zaměřeny na detekci amplifikace (*CCNE1*), detekci MSI nebo detekci poruch v homologní rekombinaci.

## Poděkování

Děkujeme Mgr. Evě Michalové za formální i věcnou editaci textu.

We would like to thank M.Sc. Eva Michalova for critical reading of the manuscript.

## Literatura

1. Uzis.cz [internetová stránka]. Novotvary 2011 ČR. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Česká republika; ČÚZIS ČR 2010–2016 [aktualizováno 2016; citováno 7. srpna 2016]. Dostupné z: [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz).
2. Miller DS, Blessing JA, Krasner CN et al. Phase II evaluation of pemetrexed in the treatment of recurrent or persistent platinum-resistant ovarian or primary peritoneal carcinoma: a study of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* 2009; 27(16): 2686–2691. doi: 10.1200/JCO.2008.19.2963.
3. Bast RC Jr, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(6): 415–428. doi: 10.1038/nrc2644.
4. Boyd J. Specific keynote: hereditary ovarian cancer: what we know. *Gynecol Oncol* 2003; 88(1 Pt 2): S8–S10.
5. Cobb LP, Gaillard S, Wang Y et al. Adenocarcinoma of Mullerian origin: review of pathogenesis, molecular biology, and emerging treatment paradigms. *Gynecol Oncol Res Pract* 2015; 2: 1. doi: 10.1186/s40661-015-0008-z.
6. Gershenson DM, Bodurka DC, Lu KH et al. Impact of age and primary disease site on outcome in women with low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: results of a large single-institution registry of a rare tumor. *J Clin Oncol* 2015; 33(24): 2675–2682. doi: 10.1200/JCO.2015.61.0873.
7. Howitt BE, Hanamornroongruang S, Lin DI et al. Evidence for a dualistic model of high-grade serous carcinoma: BRCA mutation status, histology, and tubal intraepithelial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2015; 39(3): 287–293. doi: 10.1097/PAS.0000000000000369.
8. Espinosa I, Catusus L, Canet B et al. Gene expression analysis identifies two groups of ovarian high-grade serous carcinomas with different prognosis. *Mod Pathol* 2011; 24(6): 846–854. doi: 10.1038/modpathol.2011.12.
9. Soslow RA, Han G, Park KJ et al. Morphologic patterns associated with BRCA1 and BRCA2 genotype in ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 2012; 25(4): 625–636. doi: 10.1038/modpathol.2011.183.
10. Tothill RW, Tinker AV, George J et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer

linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2008; 14(16): 5198–5208. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0196.

11. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474(7353): 609–615. doi: 10.1038/nature10166.
12. Helland A, Anglesio MS, George J et al. Deregulation of MYCN, LIN28B and LET7 in a molecular subtype of aggressive high-grade serous ovarian cancers. *PLoS One* 2011; 6(4): e18064. doi: 10.1371/journal.pone.0018064.
13. Konecny GE, Wang C, Hamidi H et al. Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(10): pii: dju249. doi: 10.1093/jnci/dju249.
14. Kurman RJ, Vang R, Junge J et al. Papillary tubal hyperplasia: the putative precursor of ovarian atypical proliferative (borderline) serous tumors, noninvasive implants, and endosalpingiosis. *Am J Surg Pathol* 2011; 35(11): 1605–1614. doi: 10.1097/PAS.0b013e318229449f.
15. Nakayama K, Nakayama N, Kurman RJ et al. Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(7): 779–785.
16. Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(6): 484–486.
17. Campbell IG, Russell SE, Choong DY et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7678–7681.
18. Kuo KT, Mao TL, Jones S et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 2009; 174(5): 1597–1601. doi: 10.2353/ajpath.2009.081000.
19. Auersperg N. The origin of ovarian carcinomas: a unifying hypothesis. *Int J Gynecol Pathol* 2011; 30(1): 12–21. doi: 10.1097/PGP.0b013e3181f45f3e.
20. Seidman JD, Khedmati F. Exploring the histogenesis of ovarian mucinous and transitional cell (Brenner) neoplasms and their relationship with Walthard cell nests: a study of 120 tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132(11): 1753–1760. doi: 10.1043/1543-2165-132.11.1753.
21. Wang Y, Wu RC, Schwartz LE et al. Clonality analysis of combined Brenner and mucinous tumours of the ovary reveals their monoclonal origin. *J Pathol* 2015; 237(2): 146–151. doi: 10.1002/path.4572.
22. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP et al. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol* 2001; 195(4): 451–456.
23. Medeiros F, Muto MG, Lee Y et al. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(2): 230–236.
24. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(2): 161–169.
25. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009; 458(7239): 719–724. doi: 10.1038/nature07943.
26. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* 2015; 521(7553): 489–494. doi: 10.1038/nature14410.
27. Hartman AR, Ford JM. BRCA1 and p53: compensatory roles in DNA repair. *J Mol Med (Berl)* 2003; 81(11): 700–707.
28. Zheng L, Li S, Boyer TG et al. Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene* 2000; 19(53): 6159–6175.
29. Lee V, Le DT. Efficacy of PD-1 blockade in tumors with MMR deficiency. *Immunotherapy* 2016; 8(1): 1–3. doi: 10.2217/imt.15.97.
30. Blocking PD-1 in tumors with faulty DNA repair. *Cancer Discov* 2016; 6(8): OF6. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-082.

31. Le DT, Uram JN, Wang H et al. PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372(26): 2509–2520. doi: 10.1056/NEJMoa1500596.
32. Budczies J, Bockmayr M, Denkert C et al. Pan-cancer analysis of copy number changes in programmed death-ligand 1 (PD-L1, CD274) – associations with gene expression, mutational load, and survival. *Genes Chromosomes Cancer* 2016; 55(8): 626–639. doi: 10.1002/gcc.22365.
33. Hamanishi J, Mandai M, Konishi I. Immune checkpoint inhibition in ovarian cancer. *Int Immunol* 2016; 28(7): 339–348. doi: 10.1093/intimm/dxw020.
34. Jones S, Wang TL, Shih Ie M et al. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* 2010; 330(6001): 228–231. doi: 10.1126/science.1196333.
35. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med* 2010; 363(16): 1532–1543. doi: 10.1056/NEJMoa1008433.
36. Guan B, Rahmanto YS, Wu RC et al. Roles of deletion of Arid1a, a tumor suppressor, in mouse ovarian tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(7): pii: dju146. doi: 10.1093/jnci/dju146.
37. Chandler RL, Damrauer JS, Raab JR et al. Coexistent ARID1A-PIK3CA mutations promote ovarian clear-cell tumorigenesis through pro-tumorigenic inflammatory cytokine signalling. *Nat Commun* 2015; 6: 6118. doi: 10.1038/ncomms7118.
38. Jones S, Wang TL, Kurman RJ et al. Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *J Pathol* 2012; 226(3): 413–420. doi: 10.1002/path.3967.
39. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(Database issue): D805–D811. doi: 10.1093/nar/gku1075.
40. Teplinsky E, Muggia F. Targeting HER2 in ovarian and uterine cancers: challenges and future directions. *Gynecol Oncol* 2014; 135(2): 364–370. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.09.003.
41. Makhija S, Amler LC, Glenn D et al. Clinical activity of gemcitabine plus pertuzumab in platinum-resistant ovarian cancer, fallopian tube cancer, or primary peritoneal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(7): 1215–1223. doi: 10.1200/JCO.2009.22.3354.
42. Teplinsky E, Muggia F. EGFR and HER2: is there a role in ovarian cancer? *Translational Cancer Research* 2015; 4(1): 107–117.
43. Davies S, Holmes A, Lomo L et al. High incidence of ErbB3, ErbB4, and MET expression in ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 2014; 33(4): 402–410. doi: 10.1097/PGP.0000000000000081.
44. Stany MP, Vathipadiekal V, Ozbun L et al. Identification of novel therapeutic targets in microdissected clear cell ovarian cancers. *PLoS One* 2011; 6(7): e21121. doi: 10.1371/journal.pone.0021121.
45. Anglesio MS, George J, Kulbe H et al. IL6-STAT3-HIF signaling and therapeutic response to the angiogenesis inhibitor sunitinib in ovarian clear cell cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(8): 2538–2548. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3314.
46. Farley J, Brady WE, Vathipadiekal V et al. Selumetinib in women with recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013; 14(2): 134–140. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70572-7.
47. Jones RM, Mortusewicz O, Afzal I et al. Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* 2013; 32(32): 3744–3753. doi: 10.1038/onc.2012.387.
48. Teixeira LK, Wang X, Li Y et al. Cyclin E deregulation promotes loss of specific genomic regions. *Curr Biol* 2015; 25(10): 1327–1333. doi: 10.1016/j.cub.2015.03.022.
49. Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2015; 14(2): 130–146. doi: 10.1038/nrd4504.
50. Konecny GE. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for women's cancer treatment. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2016; 28(1): 42–48. doi: 10.1097/GCO.0000000000000243.

# Tvorba hmotnostne spektrometrických spektrálnych knižníc nádorových bunčných línií

## Building Mass Spectrometry Spectral Libraries of Human Cancer Cell Lines

Faktor J., Bouchal P.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Súhrn

**Východiská:** Kvantifikácia proteínov v modelových nádorových bunčných líniách a v nádorových tkanivách je často predmetom onkologického výskumu. Metóda SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion spectra), novinka v kvantitatívnej onkoproteomike, získava čoraz väčšiu popularitu, pretože umožňuje kvantifikáciu všetkých proteínov zaznamenaných v spektrálnej knižnici. Spektrálna knižnica obsahuje fragmentačné informácie o každom detekovateľnom proteíne vo vzorke. Dôkladná príprava spektrálnej knižnice výrazne vylepší kvantifikáciu obzvlášť nízkoabundantných proteínov, ktoré často zohrávajú výnámnu úlohu v nádorových ochoreniach. **Ciel:** V tomto článku sa venujeme optimalizácii prípravy spektrálnej knižnice s cieľom maximalizovať počet kvantifikovateľných proteínov v modelovej bunčnej línii MCF-7 odvodennej od karcinómu prsníka. Experiment je zameraný na optimalizáciu postupu prípravy vzorky pred vstupom do hmotnostného spektrometru, kde bol skúmaný vplyv zloženia lyzačného pufru, vplyv postupu rozpúšťania peptidov a vplyv materiálu mikroskúmaviiek na počet proteínov v spektrálnej knižnici. V neposlednom rade boli optimalizované aj parametre merania na hmotnostnom spektrometri pre získavanie dát do spektrálnej knižnice. **Záver:** Dôslednou optimalizáciou postupu sa podarilo pripraviť spektrálnu knižnicu obsahujúcu fragmentačné informácie o 1 653 proteínoch (FDR < 1%) z 1 µg lyzátu MCF-7. Hlavným prínosom optimalizácie postupu prípravy spektrálnej knižnice je rozšírenie pokrytia proteómu vo SWATH digitálnych biobankách umožňujúcich kvantifikáciu ľubovoľného proteínu vo fyzicky už nedostupných vzorkách. Kvalitné spektrálne knižnice by mohli v budúcnosti zohrávať kľúčovú úlohu pri tvorbe digitálnych fingerprintov proteómu pacientov.

### Kľúčové slová

nádorové biomarkery – hmotnostná spektrometria – proteomika – digitálna biobanka – SWATH – kvantifikácia proteínov

### Summary

**Background:** Cancer research often focuses on protein quantification in model cancer cell lines and cancer tissues. SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion spectra), the state of the art method, enables the quantification of all proteins included in spectral library. Spectral library contains fragmentation patterns of each detectable protein in a sample. Thorough spectral library preparation will improve quantitation of low abundant proteins which usually play an important role in cancer. **Aim:** Our research is focused on the optimization of spectral library preparation aimed at maximizing the number of identified proteins in MCF-7 breast cancer cell line. First, we optimized the sample preparation prior entering the mass spectrometer. We examined the effects of lysis buffer composition, peptide dissolution protocol and the material of sample vial on the number of proteins identified in spectral library. Next, we optimized mass spectrometry (MS) method for spectral library data acquisition. **Conclusion:** Our thorough optimized protocol for spectral library building enabled the identification of 1,653 proteins (FDR < 1%) in 1 µg of MCF-7 lysate. This work contributed to the enhancement of protein coverage in SWATH digital biobanks which enable quantification of arbitrary protein from physically unavailable samples. In future, high quality spectral libraries could play a key role in preparing of patient proteome digital fingerprints.

### Key words

biomarker – mass spectrometry – proteomics – digital biobanking – SWATH – protein quantification

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



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

Obdrženo/Submitted: 7. 5. 2016

Přijato/Accepted: 9. 6. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164554>

## Úvod

Rakovina patrí v dnešnej dobe k veľmi častým ochoreniam a v roku 2012 bola celosvetovo príčinou 8,2 milióna úmrtí [1]. Rakovinové ochorenia sú spôsobované genómovými zmenami a aj zmenami v biochemických dráhach, ktoré vedú k nekontrolovanému deleniu buniek a v pokročilejších štádiách onemocnenia k metastázovaniu. Včasná diagnostika a cieľená liečba zameraná na charakteristické proteíny môže znížiť úmrtnosť spôsobenú dôsledkom rakovinových ochorení [2]. Preto sa onkologický výskum zameriava na hľadanie nových rakovinových biomarkerov a terapeutických cieľov a onkoproteomika, zaoberajúca sa výskumom proteínov zmenených v súvislosti s rakovinovými ochoreniami, sa stala jeho nezastupiteľným odvetvím [3]. Pre onkoproteomiku sú kľúčové metódy využívajúce techniky hmotnostnej spektrometrie (mass spectrometry – MS), ktoré popisujú zmeny v koncentračnom zastúpení proteínov v závislosti na vonkajších alebo vnútorných podmienkach. Novinkou v oblasti cieľenej onkoproteomiky je metóda SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion spectra), ktorá bola vyvinutá za účelom spoľahlivej kvantifikácie všetkých detekovateľných proteínov v jednej analýze [4]. Výhodou pre onkologický výskum je možnosť tvorby digitálnych spektrálnych biobáň biologického materiálu, ktoré môžu obsahovať súbory tkanív, ale aj bunečných línií. Digitálny spektrálny biobanking v princípe umožňuje kvantifikáciu vybraného proteínu aj niekoľko rokov po zmeraní dát a výmenu dát medzi laboratóriami, čo významne urýchľuje výskum [5]. Pre extrakciu SWATH kvantitatívnych dát je nevyhnutné použiť spektrálnu knižnicu obsahujúcu informácie o proteínoch/peptidoch zastúpených vo vzorke. Podmienkou je, aby v spektrálnej knižnici mal každý proteín reprezentujúci peptid priradený retenčný čas a fragmentačné spektrum produktových iónov s ich intenzitami [6]. Kvantifikácia proteínov, ktoré nie sú v spektrálnej knižnici, je nemožná napriek tomu, že ich spektrá môžu byť prítomné v SWATH dátach. Dôkladná optimalizácia prípravy spektrálnej knižnice

má teda zásadný význam pre množstvo kvantifikovateľných proteínov vo SWATH biobanke. Cieľom nášho výskumu bolo nájsť vhodné podmienky pre prípravu spektrálnej knižnice modelovej bunečnej línie MCF-7 odvodenej od karcinómu prsníka. Prvotnou úlohou bolo nájsť vhodné podmienky bunečnej lýzy, kde sa prihliadalo na kompatibilitu lyzačného pufru s MS. V ďalšom kroku boli optimalizované podmienky na rozpúšťanie peptidov pred MS analýzou a bola porovnaná adsorpcia peptidov na rôzne povrchy stien mikroskúmaviek. Najväčší vplyv na počet proteínov obsiahnutých v spektrálnej knižnici má správne nastavenie parametrov MS metódy. Preto sme sa zamerali na optimalizáciu minimálnej intenzity prekursorového peptidu vybraného na fragmentáciu a doby vylúčenia prekursorového peptidu. Ukázalo sa, že dôkladnou optimalizáciou postupu prípravy vzorky a MS metódy na hmotnostnom spektrometri TripleTOF 5600+ sa dá podstatne zvýšiť počet proteínov obsiahnutých v spektrálnej knižnici, čo nám rozširuje možnosti kvantifikácie proteínov zastúpených v nízkych koncentráciách. Tieto proteíny sú obzvlášť zaujímavé pre onkologický výskum.

## Materiál a metódy

### Príprava lyzátu bunečnej línie MCF-7 a proteolytické štiepenie proteínov

Bunky získané z MCF-7 bunečnej línie boli 30 min lyzované v lyzačnom puFRE zloženom z 8 M močoviny, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 a v puFRE zloženom z 0,05% dodecylsulfátu sodného (SDS) a 0,5 M triethylammonium bikarbonátu. Po skončení lýzy bol lyzáť centrifugovaný 30 min/14 000 g/5 °C. Metódou RC-DC (Bio-Rad, USA) bola zameraná koncentrácia proteínu v supernatante a 100 µg proteínového lyzátu bolo odobraných na proteolytické štiepenie. Proteolytické štiepenie a purifikácia peptidov z MCF-7 boli prevedené podľa Pernikářová et al [7].

### „Acetonitrilová extrakcia“ peptidov pred separáciou pomocou kvapalinovej chromatografie (LC) spojenej s MS detekciou (LC-MS)

K 15 µg peptidovej vzorky z MCF-7 lyzátu bolo pridaných 15 µl puFRE zloženého z 51% acetonitrilu (AcN), 0,05%

trifluoroctovej kyseliny (TFA) v H<sub>2</sub>O. Vzorka bola dôkladne premiešaná tak, aby sa rozpustili všetky peptidy na stenách skúmavky. Následne bola vzorka sonikovaná počas 5 min a opäť dôkladne premiešaná. Vzorka bola centrifugovaná 10 min/10 000 g/25 °C. Po prepipetovaní do novej skúmavky bol odparený acetonitril v Speed-Vacu tak, aby sme získali zmes peptidov v nanášacom puFRE zloženom z 2% AcN, a 0,05% TFA v H<sub>2</sub>O.

### Štandardné rozpúšťanie peptidovej vzorky pred LC-MS analýzou

K 15 µg peptidovej vzorky z MCF-7 lyzátu bolo pridaných 15 µl puFRE zloženého z 2% AcN, 0,05% TFA v H<sub>2</sub>O. Vzorka bola dôkladne premiešaná tak, aby sa rozpustili všetky peptidy na stenách skúmavky. Následne bola vzorka sonikovaná počas 5 min a opäť dôkladne premiešaná. Vzorka bola centrifugovaná 10 min/10 000 g/25 °C.

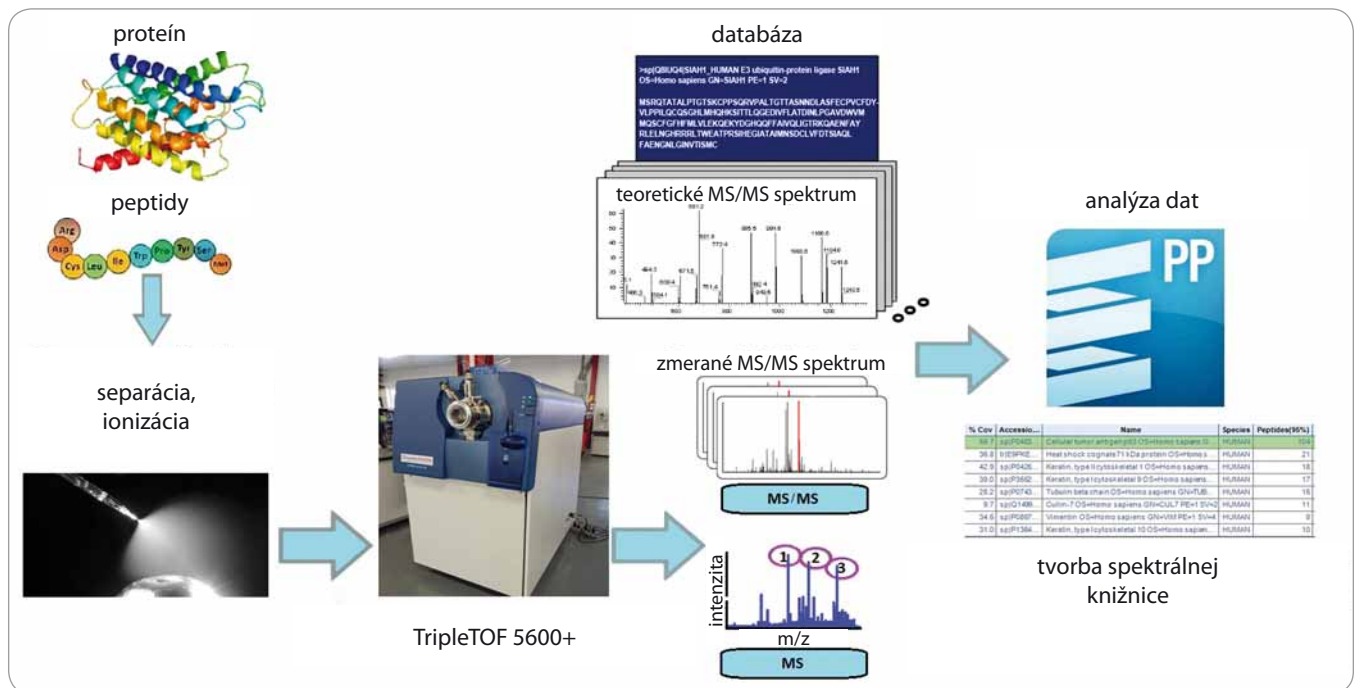
### Mikroskúmavky použité na porovnanie adsorpcie peptidov na povrch

Zriedený roztok peptidovej vzorky MCF-7 bol napipetovaný do štyroch mikroskúmaviek s rôznym povrchom tak, aby bolo možné nastrieknuť 0,05 µg peptidov na kolonu. Použité boli polypropylénové mikroskúmavky so silanizovaným povrchom kat. č. 910-00096 (Eksigent, USA), dve mikroskúmavky s polypropylénovým povrchom „Red“ kat. č. 548-3120 (WVR, USA), „Orange“ kat. č. 548-0120 (WVR, USA) a mikroskúmavka so skleneným inzeratom kat. č. 02-FIRVG (Thermo, USA). Mikroskúmavky so vzorkou boli umiestnené v autosampleri temperovanom na teplotu 8 °C.

### Parametre LC-MS analýzy pre tvorbu spektrálnej knižnice

Vzorky boli separované na chromatografe Eksigent Ekspert nanoLC 400 systém (SCIEX, USA), ktorý bol priamo spojený s hmotnostným spektrometrom TripleTOF 5600+ (SCIEX, Kanada).

Peptidy boli zachytené a odsolené na trap kolone µ-precolumn, 30 µm i.d., 5 mm dĺžka, C18 PepMap 100, 5 µm veľkosť častíc, 100 Å veľkosť pórov (Thermo Scientific, USA). Následne boli peptidy eluované na analytickú kolonu s náplňou 3C18-CL-120, 75 µm i.d., 150 mm



Obr. 1. Princíp tvorby spektrálnej knižnice.

V prvom kroku extrahujeme proteíny z biologického materiálu pomocou lyzačného pufru. Proteínový lyzát je proteolyticky štiepený na peptidy proteázou. Po odsolení sú peptidy rozpustené v nanášacom pufré a premiestnené do mikroskúmavky. Po separácii na LC systéme sa peptidy ionizujú a vstupujú do hmotnostného spektrometra, kde sú zmerané ich MS a MS/MS spektrá. Analýza dát a tvorba spektrálnej knižnice prebieha v programe ProteinPilot, kde sú porovnávané teoretické MS/MS spektrá peptidov s nameranými MS/MS spektrami. Peptid/proteín je zaradený do spektrálnej knižnice pokiaľ je nájdený prekryv medzi teoretickým a nameraným MS/MS spektrom.

MS – hmotnostná spektrometrie, LC – kvapalinová chromatografie

dĺžka, 5 µm veľkosť častíc, 120 Å veľkosť pórov (Eksigent, USA). Mobilná fáza A bola zložená z 0,1% (v/v) kyseliny mravčej (FA) v H<sub>2</sub>O a mobilná fáza B z 0,1% (v/v) FA v AcN.

### Nastavenie nano-kvapalinového chromatografu pre separáciu peptidov spektrálnej knižnice

Elúcia z analytickej kolony začínala na 2 % mobilnej fázy B počas 1 min. Percentuálny podiel mobilnej fázy lineárne stúpal na 12 % B počas 5 min, ďalších 114 min podiel B lineárne vzrástol na 35 % a v nasledujúcich 2 min vzrástol až na 80 % B, na hodnote 80 % B zostal počas 18 min a potom podiel mobilnej fázy B lineárne klesal na 2 % počas 2 min. Podiel mobilnej fázy B zostal na hodnote 2 % počas ďalších 38 min. Prietok mobilnej fázy bol 300 nl/min.

### Nastavenie MS metódy pre identifikáciu proteínov (MS/MS) v spektrálnej knižnici

Hmotnostný spektrometer TripleTOF 5600+ pracoval v dáta dependentnom

móde. V ionizačnom zdroji (nano-elektrospreji) bol dusík použitý ako zmlžovací plyn a teplota aj tok sušiacého plynu boli nastavené na hodnoty 150 °C a 12 °C. Ionizačné napätie bolo nastavené na hodnotu 2700 V. MS spektrum z analyzátoru doby prietoku (TOF-MS) bolo zmerané v každom cykle nasledované fragmentáciou 20 najintenzívnejších prekursorových iónov a zmeraním spektier ich produktových iónov. Minimálna intenzita prekursorového iónu bola optimalizovaná. Pri tejto optimalizácii boli použité hodnoty 50 impulzov za sekundu (cps), 100 cps a 250 cps. Predmetom optimalizácie bola aj hodnota času vylúčenia zmeraných prekursorových iónov, použité boli hodnoty 8 s, 12 s, 20 s, 30 s a 40 s. Akumulačný čas prekursorového iónu bol 100 ms.

### Analýza dát – tvorba spektrálnej knižnice

Dáta získané MS/MS metódou boli prehľadané pomocou programu ProteinPilot 4.5 (SCIEX, Kanada) proti ľud-

skej referenčnej databáze (Uniprot 2013\_09) [8]. Parametre prehľadávania boli nastavené nasledovne – tryp-sín (proteolytický enzým), karbamidometyl (fixná modifikácia), FDR analýza bola prevedená proti obrátenej databáze (Uniprot 2013\_09) [8].

### Výsledky a diskusia

Optimalizáciu podmienok prípravy spektrálnej knižnice bunečnej línie MCF-7 (obr. 1) môžeme významne zlepšiť pokrytie kvantifikovaného proteómu a zvýšiť tak kvalitu spektrálnej knižnice (tab. 1–3) a aj kvantitatívnych dát extrahovaných zo SWATH datasetov. Prvým krokom pri príprave spektrálnej knižnice je extrakcia proteínov z bunečnej línie pomocou lyzačného pufru. Pri extrakcii proteínov je nutné použiť lyzačné pufrý kompatibilné s MS, prípadne pred MS analýzou odstrániť interferujúce látky použité pri lýze [9]. Metóda štiepenia proteínov na filtri (filter aided sample preparation – FASP) [10] umožňuje použitie detergentu SDS, prí-



**Tab. 1. Počet identifikovaných proteínov v spektrálnej knižnici v závislosti na postupe rozpúšťania.**

Pred MS analýzou bol rozpustený 1 µg peptidovej vzorky z bunečnej línie MCF-7 v nanášacom pufré (2% AcN, 98% H<sub>2</sub>O, 0,05% TFA). Peptidové vzorky boli každým postupom rozpustené v duplikáte a meranie bolo zopakované 3-krát. Pre každý postup bola určená smerodajná odchýlka a priemerný počet identifikovaných proteínov. Výsledky dokazujú, že medzi porovnávanými postupmi nie je podstatný rozdiel v počte identifikovaných proteínov, počet identifikácií sa mierne zvyšuje pri použití acetonitrilovej extrakcie peptidov.

**Počet proteínov v spektrálnej knižnici v závislosti na postupe rozpúšťania 1 µg peptidovej vzorky MCF-7**

Replikát	Počet identifikovaných proteínov (FDR < 1%)	
	acetonitrilová extrakcia peptidov	štandardný postup rozpúšťania peptidov
1	681	686
	705	672
	724	700
2	722	712
	693	713
	723	695
priemer	708	696
smerodajná odchýlka	18,1	15,7

MS – hmotnostná spektrometrie

**Tab. 2. Počet identifikovaných proteínov v spektrálnej knižnici v závislosti na povrchu mikroskúmvky v autosampleri.**

Napipetovaných bolo 0,05 µg peptidovej vzorky z MCF-7 do mikroskúmviek v duplikáte a meranie bolo zopakované 2-krát. Pre každý typ mikroskúmvky bola určená smerodajná odchýlka a priemerný počet identifikovaných proteínov. Výsledky dokazujú, že počet identifikácií medzi porovnávanými mikroskúmvkami nie je podstatný. Mikroskúmvka so skleneným inzertom má vyššiu smerodajnú odchýlku a počet identifikovaných proteínov je nižší v porovnaní s ostatnými mikroskúmvkami.

Typ mikroskúmvky	Počet identifikovaných proteínov (FDR < 1%)			
	replikát 1	replikát 2	priemer	smerodajná odchýlka
thermo (sklenený inzert)	117	181	128	42,2
	79	133		
eksigent (silanizovaný povrch)	200	108	153	41,1
	173	132		
VWR „orange“ (polypropylén)	172	155	154	23,6
	120	168		
VWR „red“ (polypropylén)	105	155	144	27,3
	148	168		

padne močoviny v lyzačnom pufré. Po pridaní lyzátu filter zabezpečí výmenu do MS kompatibilného pufru. Ukázalo

sa, že lyzát pripravený v lyzačnom pufré zloženom z 8 M močoviny 0,5 M Tris/HCl, pH 8,5 poskytuje vyšší signál celkového

iónového prúdu a aj viac identifikovaných proteínov v porovnaní s lyzátom pripraveným v 0,05% SDS. Vyšší počet identifikácií a celkový MS signál z lyzátu pripraveného v močovinovom lyzačnom pufré môže byť výsledkom vyššej lyzačnej a solubilizačnej efektivity. Nižší signál u MCF-7 v SDS lyzačnom pufré zrejme spôsobuje SDS zachytené na stenách filtra, ktoré po vymytí do vzorky môže negatívne interferovať počas LC-MS analýzy [11]. Po lýze, FASP proteolytickom štiepení, odsolení a zakonzentrování biologickej vzorky sa získava koncentrát obsahujúci zmes peptidov, ktorý sa pred analýzou rozpúšťa v nanášacom pufré (2% AcN + 0,05% TFA v H<sub>2</sub>O). Nanášací pufer musí rozpúšťať celé spektrum peptidov, efektívita závisí od postupu rozpúšťania peptidov a od zloženia nanášacieho pufru [12]. Porovnaný bol klasický postup rozpúšťania peptidovej vzorky z MCF-7, kde sa k lyzátu pridáva nanášací pufer s následným miešaním a postup acetonitrilovej extrakcie peptidov. Acetonitrilová extrakcia peptidov mierne zvýšila počet identifikácií v spektrálnej knižnici na 716 (FDR < 1%) oproti klasickému postupu (tab. 1). Postup acetonitrilovej extrakcie peptidov umožňuje efektívnejšie uvoľnenie hydrofóbných peptidov zo stien skúmvky dôsledkom použitia vyššieho podielu organickej fázy (50% AcN) v porovnaní s klasickou metódou rozpúšťania v 2% AcN. Roztok peptidov v nanášacom pufré je následne premiestnený do LC-MS systému v mikroskúmvkách. Nežiaducim efektom je adsorbcia peptidov na steny mikroskúmvky, kde sa na nepolárne plastické povrchy počas státia v autosampleri adsorbujú najmä hydrofóbné peptidy [13]. Na trhu sú k dispozícii mikroskúmvky vyrobené z rôznych materiálov, ktoré by mali minimalizovať adsorbciu peptidov. V súčasnosti sa často používajú sklenené mikroskúmvky, mikroskúmvky so silanizovaným povrchom, prípadne s povrchom potiahnutým polypropylénom alebo polyetylénom [14]. Porovnaním mikroskúmviek sme dospeli k záveru, že použitý materiál nemá zásadný vplyv na signál a počet identifikovaných proteínov v spektrálnej knižnici (tab. 2). Ukázalo sa, že optimalizácia parametrov metódy na ovládanie LC-MS prístroja má

naopak podstatný vplyv na rozsah a kvalitu spektrálnej knižnice. V rámci optimalizácie MS/MS metódy sme hľadali najlepšie nastavenie minimálnej intenzity peptidového (prekurzorového) iónu použitého na fragmentáciu a dobu jeho vylúčenia (tab. 3). Optimalizáciou minimálnej intenzity prekurzorového píku sme zamedzili fragmentáciu prekurzorov na úrovni šumu a zároveň sme zamedzili vylúčenie prekurzorov pochádzajúcich z proteínov zastúpených v nízkych koncentráciách, ktoré sú často predmetom onkologického výskumu. Optimálna doba vylúčenia prekurzorového iónu ďalej rozšírila počet identifikovaných proteínov. Vylúčenie fragmentovaných prekurzorových iónov zabráňuje opakovanej fragmentácii prekurzorového iónu s rovnakým m/z, a umožňuje tak fragmentáciu menej zastúpených prekurzorov. Po optimalizácii prípravy peptidovej vzorky z bunečnej línie MCF-7 a parametrov MS metódy bola vytvorená spektrálna knižnica obsahujúca 1 653 (FDR < 1%) proteínov z 1 µg lyzátu MCF-7 bunečnej línie, čo predstavuje 8,1 % zo všetkých 20 197 recenzovaných proteínov obsiahnutých v ľudskej databáze proteínov Swiss-Prot [15].

## Záver

S využitím rôznych lyzačných podmienok, výberom vhodných mikroskúmaiev ako aj optimalizáciou MS metódy sme dosiahli vyšší počet identifikovaných proteínov a vytvorili sme kompletnejšiu spektrálnu knižnicu pre nádorovú bunečnú líniu MCF-7. Nový postup tvorby spektrálnej knižnice bude ďalej aplikovaný pri SWATH kvantifikácii proteínov v biologických vzorkách, kde významne ovplyvní kvalitu vyextrahovaných kvantitatívnych dát a pokrytie celkového proteómu. Rozšírenie spektrálnej knižnice umožní kompletnejší náhľad na reguláciu proteínov zastúpených v nízkych koncentráciách, ktoré sú obvyčajne najzaujímavejšie pre onkologický výskum, a tým zjednoduší hľadanie nových biomarkerov a terapeutických cieľov. Kompletnejšie spektrálne knižnice prispievajú k rozšíreniu a prehĺbeniu poznatkov v onkologickom výskume.

**Tab. 3. Počet identifikovaných proteínov v závislosti na parametroch MS/MS metódy pre tvorbu spektrálnej knižnice.**

V tabuľke sú zhrnuté výsledky z optimalizácie času vylúčenia prekurzorového peptidu a optimalizácie minimálnej prekurzorovej intenzity. Najvyšší počet identifikácií získame nastavením 12 s doby vylúčenia zameraných prekurzorových peptidov, nastavením minimálnej intenzity prekurzorového peptidu na hodnotu 50 impulzov za sekundu (cps) a využitím 120 min nelineárneho LC gradientu.

čas (s)	počet identifikovaných proteínov (FDR < 1%)	Minimálna intenzita prekurzorového peptidu	
		intenzita (CPS)	počet identifikovaných proteínov (FDR < 1%)
8	1 653	50	1 302
12	1 684	100	1 197
20	1 642	250	932
30	1 528		
40	1 399		

MS – hmotnostná spektrometrie, LC – kvapalinová chromatografie

## Literatúra

- Torre LA, Bray F, Siegel RL et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
- Weigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(8): 591–602.
- Cho WC, Cheng CH. Oncoproteomics: current trends and future perspectives. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4(3): 401–410.
- Gillet LC, Navarro P, Tate S et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(6): O111.016717. doi: 10.1074/mcp.O111.016717.
- Faktor J, Michalova E, Bouchal P. pSRM, SWATH and HRM – targeted proteomics approaches on TripleTOF 5600+ mass spectrometer and their applications in oncology research. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S110–S115. doi: 10.14735/amko201415110.
- Schubert OT, Gillet LC, Collins BC et al. Building high-quality assay libraries for targeted analysis of SWATH MS data. *Nat Protoc* 2015; 10(3): 426–441. doi: 10.1038/nprot.2015.015.
- Pernikářová V, Sedláček V, Potěšil D et al. Proteomic responses to a methyl viologen-induced oxidative stress in the wild type and FerB mutant strains of *Paracoccus denitrificans*. *J Proteomics* 2015; 125: 68–75. doi: 10.1016/j.jprot.2015.05.002.
- ftp.uniprot.org [homepage on the Internet]. European Bioinformatics Institute (EBI), United Kingdom, c2002–2015 [updated 2015 March 14; cited June 9]. Available from: ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/previous\_releases/release-2013\_09/.
- Gundry RL, White MY, Murray CI et al. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr Protoc Mol Biol* 2009; Chapter 10: Unit 10.25. doi: 10.1002/0471142727.mb1025s88.
- Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 2009; 6(5): 359–362. doi: 10.1038/nmeth.1322.
- Pellerin D, Gagnon H, Dubé J et al. Amicon-adapted enhanced FASP: an in-solution digestion-based alternative sample preparation method to FASP. *F1000Research* 2015; 4: 140. doi: 10.12688/f1000research.6529.1.
- Peterson A, Hohmann L, Huang L et al. Analysis of RP-HPLC loading conditions for maximizing peptide identifications in shotgun proteomics. *J Proteome Res* 2009; 8(8): 4161–4168. doi: 10.1021/pr9001417.
- Duncan MR, Lee JM, Warchol MP. Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene. *Int J Pharm* 1995; 120(2): 179–188.
- Stejskal K, Potěšil D, Zdráhal Z. Suppression of peptide sample losses in autosampler vials. *J Proteome Res* 2013; 12(6): 3057–3062. doi: 10.1021/pr400183v.
- UniProt.org [homepage on the Internet]. European Bioinformatics Institute (EBI), United Kingdom, c2002–2015 [updated 2015 March 14; cited 2016 Aug 2]. Available from: http://www.uniprot.org/uniprot/?query=\*%&fil=reviewed%3Ayes+AND+organism%3A-%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22.

# Využití metody vodík/deuteriové výměny v biofarmaceutickém průmyslu

## Utilization of Hydrogen/Deuterium Exchange in Biopharmaceutical Industry

Coufalová D., Vojtěšek B., Hernychová L.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Vývoj biofarmaceutik je nejrychleji se rozvíjející oblastí dnešního farmaceutického průmyslu. Analýza proteinových terapeutik je však velice náročný úkol kvůli jejich velikosti a komplexnosti prostorové struktury. Jakékoliv změny v primární, sekundární, terciální či kvartérní struktuře proteinů mohou mít výrazný vliv na jejich funkci, účinnost a v neposlední řadě i toxicitu. Hmotnostní spektrometrie se v minulosti osvědčila jako kvalitní nástroj pro analýzu primární struktury proteinů (aminokyselinové sekvence) a v posledních letech je díky rozvoji nových metod schopná analyzovat i vyšší proteinové struktury. Jednou z těchto nových metod je vodík/deuteriová výměna (HDX). HDX je založena na výměně amidových vodíků aminokyselinového řetězce za deuteria z okolního roztoku. Vodíky nacházející se na povrchu proteinu jsou za deuteria vyměňovány mnohem rychleji než vodíky schované uvnitř proteinu. Získané výsledky z HDX metody mohou poskytnout informace o prostorové struktuře proteinu a také o protein-proteinových a protein-ligandových interakcích. Navíc analýzou výměny deuterií v různých časových intervalech může tato metoda poskytnout informace i o dynamických změnách proteinové struktury a dynamice proteinových interakcí. Vzhledem k možnostem, které tato metoda nabízí, se HDX stala atraktivní metodou pro charakterizaci proteinových biofarmaceutik. **Cíl:** Cílem tohoto přehledového článku je poukázat na možnosti využití hmotnostní spektrometrie v biofarmaceutickém průmyslu se zaměřením na metodu HDX a její aplikace.

### Klíčová slova

hmotnostní spektrometrie – proteomika – konformace proteinů – objevování léků – farmaceutický průmysl – vodík/deuteriová výměna

### Summary

**Background:** The development of biopharmaceuticals is the fastest growing segment of the present pharmaceutical industry. The analysis of proteins therapeutics is a challenging task due to their large size and complexity of spatial structure. Any changes in the primary, secondary, tertiary or quaternary protein structure can have huge impact on their function, efficiency and toxicity. Mass spectrometry proved itself to be a powerful tool for analysis of primary protein structure (amino acid sequence) and thanks to the development of new techniques in last years it is able to analyse higher order protein structures. One of these new techniques is hydrogen/deuterium exchange (HDX). HDX is based on exchange of amid protons with deuterium from solution on the protein backbone chain. Protons on the surface of protein are exchanging with deuterium much faster than protons buried inside of protein. HDX results could provide information about spatial protein structure and also about protein-protein interactions and protein-ligand interactions. Furthermore, by analysing of deuterium exchange in different time points this method could give information about dynamic changes of protein structure and dynamics of proteins interactions. Because of possibilities of this method, HDX become attractive method for characterization of protein biopharmaceuticals. **Aims:** This review article is focused on the utilization of mass spectrometry in biopharmaceutical industry and mainly on HDX method and its applications.

### Key words

mass spectrometry – proteomics – protein conformation – drug discovery – drug industry – hydrogen/deuterium exchange

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

The work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



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

Obdrženo/Submitted: 23. 5. 2016

Přijato/Accepted: 10. 6. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164559>

## Úvod

Vývoj biofarmaceutik, z nichž největší část představují protilátky a rekombinantní proteiny, je jednou z nejvíce dynamicky se rozvíjejících oblastí farmaceutického průmyslu. Biofarmaceutika však nejsou žádným nováčkem mezi používanými léčivy a např. rekombinantní protein inzulin je k léčbě diabetu úspěšně užíván již několik desítek let. Proteinová léčiva se od standardních nízkomolekulárních léčiv liší nejen svoji velikostí dosahující až stovky kDa, ale i svou vysokou komplexitou. Kvůli ní vyžaduje navrhování nových biofarmaceutik zcela odlišný přístup. Prostorové uspořádání a funkce nízkomolekulárních léčiv jsou přímo závislé na jejich struktuře. U proteinů je situace složitější, neboť protein se stává funkčním až po sbalení do nativní konformace, obvykle za účasti dalších proteinů (chaperonů). Nesprávně složené proteiny podléhají agregaci *in vivo* i *in vitro* a stávají se cílem proteáz. Navíc kromě ztráty funkce může agregace proteinů spouštět nežádoucí imunitní odpověď. Přes všechny obtíže, které přináší analýza biofarmaceutických produktů, nabízejí proteinová léčiva unikátní vlastnosti a funkce, které nelze zastoupit malými syntetickými molekulami. Mezi jejich velké výhody patří vysoká specifita, bezpečnost, méně negativních vedlejších efektů a dlouhá životnost v organismu.

Nepostradatelným nástrojem pro charakterizaci proteinových léčiv se stala hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry – MS), která umožňuje analyzovat nejen kovalentní strukturu, ale i konformaci proteinů, její dynamické změny a interakce s dalšími proteiny či jinými ligandy [1,2]. V současné době je MS nejvíce využívána pro charakterizaci kovalentní struktury proteinů, tedy jejich aminokyselinové sekvence, a posttranslačních modifikací (PTM) [3,4].

## Metody analýzy proteinové konformace

Mezi klasické metody studia proteinových konformací patří rentgenová krystalografie a nukleární magnetická rezonance (NMR). Obě metody se v minulosti ukázaly jako velice přínosné pro detailní charakterizaci proteinové struktury

a proteinových komplexů. Avšak vzhledem k jejich limitujícím faktorům nejsou v řadě případů nejvhodnější volbou pro analýzu biofarmaceutik.

Rentgenová krystalografie je jedinečnou metodou pro určení absolutní prostorové struktury proteinů vč. polohy všech atomů a vazeb mezi nimi. Jak již vyplývá z názvu, tato metoda vyžaduje krystalizaci proteinu, což ovšem znemožňuje analýzu proteinů za fyziologických podmínek. Navíc částečně sbalené proteiny je obtížnější krystalizovat, proto při analýze roztoku se směsí složených a částečně složených proteinů není možné určit poměr obou forem. Příbuzná metoda „X-ray scattering“, která umožňuje analýzu proteinů přímo v roztoku, je limitována nízkým rozlišením [5].

Oproti rentgenové krystalografii je vysokorozlišovací NMR schopná odhalit detaily vyšších struktur vč. jejich dynamických změn. Metoda je však omezena maximální velikostí molekul (~30 kDa), čímž je pro většinu biofarmaceutických produktů nevyužitelná. Není tedy překvapením, že rutinní analýzy konformace a stability proteinových léčiv jsou stále závislé na klasických biofyzikálních metodách, jako jsou metody spektroskopické (cirkulární dichroismus, fluorescence, UV absorpce, FTIR spektroskopie), kalorimetrie, analytická ultracentrifugace a gelová chromatografie [6]. Metody umožňují analyzovat protein za fyziologických podmínek, jejich nevýhodou je však nízké rozlišení a neschopnost detekce dynamických změn proteinové konformace.

## MS a analýza konformace proteinů

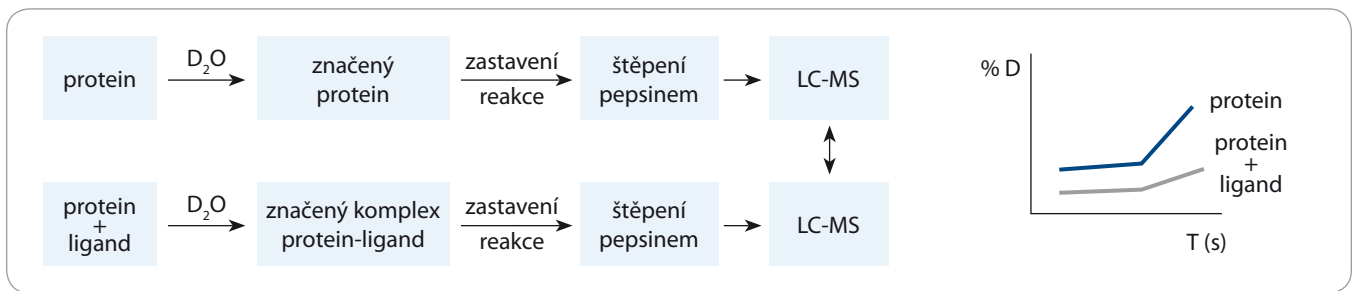
MS je další účinnou metodou pro analýzu struktury biopolymerů, avšak bez spojení s jinými technikami umožňuje pouze charakterizaci aminokyselinové sekvence proteinů a PTM. Teprve až s rozvojem nových metod během posledních dvou desetiletí došlo k výraznému rozšíření použitelnosti MS i pro studium vyšších proteinových struktur, jejich dynamických změn a interakcí s proteiny či nízkomolekulárními ligandy. Přesto však většina aplikací zůstává i nadále pouze doménou akademických pracovišť, a to zejména kvůli

obtížné automatizaci celého postupu. Příkladem je chemické zesítení, které je vhodné pro studium proteinových struktur i protein-proteinových interakcí, ale poskytuje nízké výtěžky, a není tudíž zcela vyhovující pro specifické požadavky biofarmaceutického průmyslu, který vyžaduje vysoké výtěžky, automatizaci přípravy vzorků i vyhodnocení dat [7]. Naproti tomu metody přímé ionizace v elektrospreji (ESI) a vodík/deuteriová výměna (HDX) ve spojení s MS si cestu do biofarmaceutických laboratoří již našly.

## Přímá ESI-MS

Přímá ESI-MS využívá šetrné ionizace proteinů v ESI, která umožňuje transfer proteinů z kapalně fáze do plynné, aniž by došlo ke změně jejich konformace nebo narušení nekovalentních vazeb. Přímá ESI-MS je v biofarmaceutickém průmyslu nejčastěji používána ke studiu rozložení nábojových stavů a ke studiu protein-proteinových a protein-ligandových interakcí [8,9]. Schopnost proteinu přijímat více nábojů během ionizace přímo souvisí s jeho konformací, díky tomu je možné sledováním nábojových stavů a zejména jejich změn detekovat výrazné strukturální změny proteinů, a to např. jejich denaturaci [10]. Proteiny sbalené v nativní formě mají kompaktní strukturu, která je schopná přijmout relativně malé množství nábojů. Naopak denaturované proteiny, ale i proteiny s navázanými ligandy a proteinové oligomery, které mají mnohem větší strukturu, dokážou přijmout mnohem větší počet nábojů. Z hmotnostních spekter lze následně porovnáním populace píků s nízkým počtem nábojů a vysokým počtem nábojů určit zastoupení jednotlivých forem proteinu.

Hlavními výhodami metody jsou její jednoduchost (nevyžaduje žádné značení ani imobilizaci proteinů), rychlost, nízká spotřeba vzorku a specifita (umožňuje přímo měřit vazebnou stechiometrii a analyzovat směsné vzorky). Mezi nevýhody přímé ESI-MS patří nutnost měření proteinu v roztoku vhodném pro ionizaci, což v řadě případů vylučuje možnost použití pufru optimálního pro protein, a také nízké rozlišení, které sice dovoluje detekci strukturálních



**Schéma 1. Schéma HDX-MS experimentu.**

Protein je nejprve inkubován samostatně a s ligandem po dobu potřebnou k vytvoření protein-ligandové interakce. Následně je přidáním pufru s  $D_2O$  zahájena reakce výměny deuterií, která je v požadovaných časových intervalech zastavena okyselením vzorku na pH 2,5 a zamražením v tekutém dusíku. V dalším kroku je vzorek rychle rozmražen a dávkován na pepsinovou kolonu, kde dochází ke štěpení proteinu. Vzniklé peptidy jsou separovány na analytické koloně a měřeny hmotnostním spektrometrem. Výsledná data pro protein a protein s ligandem jsou porovnávána speciálním softwarem a výsledky jsou nejčastěji prezentovány formou grafů zobrazujících závislost procenta deuterace na délce deuterace.

MS – hmotnostní spektrometrie, LC – kapalinová chromatografie

změn proteinů, ale je již nedostačující pro lokalizaci změn v rámci aminokyselinové sekvence.

#### HDX-MS

HDX-MS je spolehlivá, robustní a dostatečně senzitivní metoda pro analýzu proteinové konformace, protein-proteinových interakcí, protein-ligandových interakcí a agregace proteinů [11,12]. Na rozdíl od výše zmiňovaných metod dokáže nejen detekovat globální změny ve struktuře proteinu, ale je schopná je lokalizovat na aminokyselinové úrovni. Experimenty je navíc možné provádět v pufrách za fyziologických podmínek, pH a přítomnosti solí [13].

Základním principem metody HDX-MS je schopnost proteinů vyměňovat své vodíky za vodíky přítomné v okolním prostředí. Výměna se sice týká všech vodíků v primární struktuře, ale pouze výměna amidových vodíků hlavního řetězce je touto metodou detekovatelná [14]. Vodíky vázané v postranních řetězcích aminokyselin podléhají velice rychlé výměně, která je téměř neměřitelná, zatímco vodíky vázané na uhlících hlavního řetězce jsou vyměňovány pomalu, což neumožňuje sledování konformačních změn proteinu v žádaných časových intervalech. Rychlost výměny amidových vodíků je závislá na přítomnosti vodíkových můstků a lokalizaci vodíků v rámci prostorové struktury. Amidové vodíky vystavené na povrchu proteinu jsou vyměňovány za vodíky

z okolí rychleji než vodíky tvořící vodíkové můstky nebo méně přístupné vodíky uprostřed proteinové struktury. Princip metody byl popsán již v 50. letech 20. století při sledování výměny vodíků za deuteria u inzulínu [15]. K detekci vodíků vyměněných za deuteria byla dříve využívána zejména NMR [16] a infračervená spektroskopie [17], ale širšího využití se tato metoda dočkala až po jejím spojení s MS [18]. Vlivem výměny jednoho atomu vodíku za jeden atom deuteria vzroste molekulová hmotnost proteinu o jednotku a tuto změnu je možné přesně detekovat právě hmotnostním spektrometrem.

Základní schéma HDX-MS experimentu je znázorněno na schématu 1. V prvním kroku je protein inkubován za požadovaných podmínek s ligandem a bez ligandu. Výměnná reakce vodíků je zahájena přidáním pufru s  $D_2O$  a ve stanovených časových intervalech je reakce zastavena okyselením na pH 2,5 a zamražením v tekutém dusíku. Před měřením jsou vzorky rychle rozmrazeny a naneseny na pepsinovou kolonu, v níž dochází ke štěpení proteinů. Vzniklé peptidy jsou separovány na analytické koloně a analyzovány v hmotnostním spektrometru. Hmotnostní spektra peptidů jsou zpracována softwarem, který porovnává molekulové hmotnosti totožných deuterovaných a nedeuterovaných peptidů a vypočítává procenta deuterace. Výsledkem jsou grafy pro jednotlivé peptidy srovnávající protein s ligan-

dem a bez ligandu, kde na ose x je doba inkubace a na ose y procento deuterace.

HDX-MS si rychle nachází cestu z akademických pracovišť do biofarmaceutických laboratoří, a to díky možnosti automatizace celého procesu od přípravy vzorků, přes jejich analýzu až po vyhodnocování dat [19,20]. Mezi její nejčastější použití v biofarmaceutickém průmyslu patří epitopové mapování, studium vlivu PTM na strukturu biofarmaceutik, srovnávací studie biofarmaceutik z různých produkcí a v neposlední řadě i analýza protein-ligandových interakcí, kterou lze využít ke screeningu potenciálních nízkomolekulárních léčiv [12,21].

#### HDX-MS a srovnávací studie

Při výrobě biofarmaceutik je nutné zajistit srovnatelnost výsledných produktů mezi jednotlivými produkovanými šaržemi. Proteiny v nesprávné konformaci podléhají v organismu agregaci a následné degradaci a navíc mohou spouštět odpověď imunitního systému. Změny v primární struktuře proteinů je možné snadno detekovat klasickou či tandemovou MS, ale nemusí vypovídat nic o změnách vyšších struktur. HDX-MS se ukázala být velice vhodnou ortogonální metodou ke standardně používaným metodám pro analýzu proteinových konformací, jako jsou cirkulární dichroismus, kalorimetrie a gelová chromatografie. HDX-MS navíc od těchto metod dokáže konformační změny lokalizovat v rámci aminokyselinové sekvence.

HDX-MS byla použita pro srovnání tožné monoklonální protilátky vyrobené ve třech různých výrobních procesech [22]. Pro analýzu vzorků byla použita globální i lokální analýza a automatizovaný systém pro přípravu i měření vzorků. Výsledky ukázaly, že mezi vzorky nebyly změny na globální proteinové úrovni ani na lokální peptidové úrovni. Analýza stejných vzorků protilátek byla pro srovnání provedena i v jiné laboratoři vybavené stejným hmotnostním spektrometrem, ale bez automatizovaného systému přípravy vzorků. Výsledná data též potvrdila, že mezi analyzovanými protilátkami není rozdíl v proteinové struktuře.

#### **HDX-MS a epitopové mapování**

Epitopové mapování je přístup sloužící k popisu specifické interakce mezi paratopem protilátky a epitopem antigenu. Vzniklý komplex protilátka-antigen může aktivovat imunitní odpověď organismu nebo inaktivovat antigen. Epitopy se dělí na lineární a konformační. Lineární epitopy jsou definované aminokyselinovou sekvencí a denaturace neovlivňuje jejich funkčnost. U konformačních epitopů je funkce úzce spjatá s jejich prostorovou strukturou a denaturací se ztrácí. Zejména charakterizace konformačních epitopů je náročná, jelikož je nutné antigeny i protilátky analyzovat za nativních podmínek. Identifikace a charakterizace epitopů je zásadní pro vývoj nových protilátek i ochranu duševního vlastnictví v biofarmaceutickém průmyslu [23,24].

HDX-MS je vhodná metoda pro identifikace lineárních i konformačních epitopů, jak ukazuje následující příklad. Zhang et al analyzovali epitop u alergenu (Ana o 2) z kešu oříšků v komplexu s dvěma protilátkami (2B5 a 1F5) [25]. Výsledek odhalil, že protilátka 2B5 interaguje s lineárním epitopem, zatímco protilátka 1F5 pro vazbu potřebuje epitop konformační. HDX-MS v tomto případě umožnila přesně lokalizovat epitop, a to s vynaložením menšího úsilí, než vyžadují konvenční metody epitopového mapování. V některých případech je však vhodné kombinovat více metod, jako tomu bylo u epitopového mapování meningokového lipoproteinu fHbp (faktor H vázající protein) [26]. V tomto pří-

padě byla použita HDX-MS i rentgenová krystalografie. Nalezený epitop byl konformační povahy, což vysvětlilo, proč se v předchozích experimentech využívajících klasické metody epitopového mapování (např. fágový display) nepodařilo epitop dostatečně charakterizovat. Popsaný epitop slouží k přípravě syntetické peptidové vakcíny obsahující imunodominantní epitop navržený dle výsledků z epitopového mapování.

#### **HDX-MS a vliv posttranslační modifikace na strukturu proteinů**

Posttranslační modifikace proteinových biofarmaceutik mohou vznikat přirozeně (glykosylace, fosforylace, metylace...) nebo uměle (PEGylace, konjugace s léky) v závislosti na výrobním procesu a požadavcích. Kromě detekce a identifikace PTM je u biofarmaceutik nutné ověřit, zdali přítomnost dané PTM ovlivňuje strukturu proteinu a tím i jeho funkčnost. Například u glykosylací, které patří mezi nejčastější PTM, byl prokázán vliv na skládání proteinu, vazby s interakčními partnery i na imunitní odpověď organismu [27].

Houde et al ve své studii pomocí HDX-MS srovnávali účinek glykosylace na konformaci monoklonálních IgG1 protilátek [28]. Výsledky ukázaly, že oxidace a galaktosylace methioninu ovlivnila strukturu IgG1, zatímco fukosylace na ni neměla žádný vliv. Z uměle vytvořených modifikací jsou velice zajímavé konjugáty protilátky s lékem (antibody-drug conjugate – ADC) tvořené specifickou tumor rozpoznávající protilátkou s navázaným chemoterapeutikem, které je takto zacíleno přímo do nádorové buňky. Nezbytným krokem ve vývoji nových ADC je ověření, zdali vazba léku s protilátkou nezpůsobuje změny ve struktuře protilátky, k čemuž je možné využít právě metodu HDX-MS [29].

#### **HDX-MS a protein-ligandové interakce**

Kromě charakterizace samotných proteinových léčiv je možné metodu HDX-MS využít i ke sledování účinku nízkomolekulárních léčiv na cílové proteiny. Takto lze pozorovat, zdali léčivo interaguje s předpokládanou oblastí či zdali dokáže změnit konformaci proteinu na aktivní či neaktivní formu.

HDX-MS byla např. použita pro ověření interakce mezi navrženým nízkomolekulárním ligandem a onkoproteinem Reptin [30]. Analýza potvrdila protein-ligandovou interakci a navíc s přesností na peptidy určila interakční místo. Obdobně i v případě proteinu MDM2 HDX-MS potvrdila interakci s nízkomolekulárním ligandem Nutlin-3 [31].

#### **Závěr**

Vzrůstající poptávka po nových biofarmaceutikách vytváří tlak na vývoj analytických metod schopných léčiva kompletně analyzovat s vysokou reprodukcibilitou a ve velkých množstvích. Metoda MS si již našla své stabilní místo pro analýzu primární struktury proteinů a propojením s novými technikami se pomalu stává nepostradatelnou i pro charakterizaci proteinových konformací a vazeb s interakčními partnery. Zejména spojení s HDX je zajímavé pro biofarmaceutický průmysl, jelikož dokáže snadno odpovědět na otázky týkající se komplexní struktury biofarmaceutik, jejich dynamických změn a interakcí a navíc umožňuje proces od přípravy vzorků až po vyhodnocování dat z velké části automatizovat.

#### **Literatura**

1. Kaltashov IA, Eyles SJ. Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2002; 21(1): 37–71.
2. Dvořáková P, Hernychová L, Vojtěšek B. Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S104–S109. doi: 10.14735/amko2014S104.
3. Zhang Z, Pan H, Chen X. Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. *Mass Spectrom Rev* 2009; 28(1): 147–176. doi: 10.1002/mas.20190.
4. Srebalus Barnes CA, Lim A. Applications of mass spectrometry for the structural characterization of recombinant protein pharmaceuticals. *Mass Spectrom Rev* 2007; 26(3): 370–388.
5. Petoukhov MV, Svergun DI. Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions. *Curr Opin Struct Biol* 2007; 17(5): 562–571.
6. Capelle MA, Gurny R, Arvinte T. High throughput screening of protein formulation stability: practical considerations. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 65(2): 131–148.
7. Back JW, de Jong L, Muijsers AO et al. Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling. *J Mol Biol* 2003; 331(2): 303–313.
8. Griffith WP, Kaltashov IA. Highly asymmetric interactions between globin chains during hemoglobin assembly revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* 2003; 42(33): 10024–10033.
9. Van den Bremer ET, Jiskoot W, James R et al. Probing metal ion binding and conformational properties of the colicin E9 endonuclease by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci* 2002; 11(7): 1738–1752.

10. Loo JA, Loo RR, Udseth HR et al. Solvent-induced conformational changes of polypeptides probed by electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1991; 5(3): 101–105.
11. Coufalová D, Vojtěšek B, Hernychová L. Co může přinést studium oligomerizace proteinů v procesu onkogeneze? *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 2): 2S6–2S10. doi: 10.14735/amko20152S6.
12. Huang RY, Chen G. Higher order structure characterization of protein therapeutics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406(26): 6541–6558. doi: 10.1007/s00216-014-7924-3.
13. Hamuro Y, Coales SJ, Southern MR et al. Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Biomol Tech* 2003; 14(3): 171–182.
14. Hvidt A, Nielsen SO. Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem* 1966; 21: 287–386.
15. Hvidt A, Linderstrom-Lang K. The kinetics of the deuterium exchange of insulin with D<sub>2</sub>O; an amendment. *Biochim Biophys Acta* 1955; 16(1): 168–169.
16. Englander SW, Mayne L. Protein folding studied using hydrogen-exchange labeling and two-dimensional NMR. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992; 21: 243–265.
17. Haris PI, Chapman D. The conformational analysis of peptides using Fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 1995; 37(4): 251–263.
18. Katta V, Chait BT. Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1991; 5(4): 214–217.
19. Chalmers MJ, Busby SA, Pascal BD et al. Probing protein ligand interactions by automated hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem* 2006; 78(4): 1005–1014.
20. Kaltashov IA, Bobst CE, Abzalimov RR et al. Conformation and dynamics of biopharmaceuticals: transition of mass spectrometry-based tools from academe to industry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010; 21(3): 323–337. doi: 10.1016/j.jasms.2009.10.013.
21. Marciano DP, Dharmarajan V, Griffin PR. HDX-MS guided drug discovery: small molecules and biopharmaceuticals. *Curr Opin Struct Biol* 2014; 28: 105–111. doi: 10.1016/j.sbi.2014.08.007.
22. Wei H, Mo J, Tao L et al. Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications. *Drug Discov Today* 2014; 19(1): 95–102. doi: 10.1016/j.drudis.2013.07.019.
23. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D et al. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* 2013; 85(2): 715–736. doi: 10.1021/ac3032355.
24. Li Pira G, Ivaldi F, Moretti P et al. High throughput T epitope mapping and vaccine development. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 325720. doi: 10.1155/2010/325720.
25. Zhang Q, Willison LN, Tripathi P et al. Epitope mapping of a 95 kDa antigen in complex with antibody by solution-phase amide backbone hydrogen/deuterium exchange monitored by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem* 2011; 83(18): 7129–7136. doi: 10.1021/ac201501z.
26. Malito E, Faleri A, Lo Surdo P et al. Defining a protective epitope on factor H binding protein, a key meningococcal virulence factor and vaccine antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(9): 3304–3309. doi: 10.1073/pnas.1222845110.
27. Muthana SM, Campbell CT, Gildersleeve JC. Modifications of glycans: biological significance and therapeutic opportunities. *ACS Chem Biol* 2012; 7(1): 31–43. doi: 10.1021/cb2004466.
28. Houde D, Peng Y, Berkowitz SA et al. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9(8): 1716–1728. doi: 10.1074/mcp.M900540-MCP200.
29. Pan LY, Salas-Solano O, Valliere-Douglass JF. Conformation and dynamics of interchain cysteine-linked antibody-drug conjugates as revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem* 2014; 86(5): 2657–2664. doi: 10.1021/ac404003q.
30. Healy AR, Houston DR, Remnant L et al. Discovery of a novel ligand that modulates the protein-protein interactions of the AAA+ superfamily oncoprotein reptin. *Chem Sci* 2015; 6(5): 3109–3116. doi: 10.1039/C4SC03885A.
31. Hernychova L, Man P, Verma C et al. Identification of a second Nutlin-3 responsive interaction site in the N-terminal domain of MDM2 using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Proteomics* 2013; 13(16): 2512–2525. doi: 10.1002/pmic.201300029.

# Nové metody studia metylace DNA – MS-HRM analýza a elektrochemie

## Novel Approaches in DNA Methylation Studies – MS-HRM Analysis and Electrochemistry

Bartošík M., Ondroušková E.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

Metylace cytozinů v DNA je jedním z epigenetických mechanismů regulujících expresi genů, a hraje tak důležitou roli v diferenciaci nebo proliferaci buněk. V nádorových buňkách často dochází ke změnám v metylaci DNA, kupříkladu nadměrnou metylací (hypermetylací) promotorů tumor supresorových genů. Proto jsou vyvíjeny nové metody analýzy, které by byly schopny určit rozsah metylace konkrétní sekvence DNA. K těmto metodám se řadí i relativně levné a rychlé techniky MS-HRM (methylation-specific high resolution melting) a elektrochemie. Ve srovnání s jinými používanými metodami jsou vhodné pro screening většího počtu vzorků či více cílových oblastí DNA. MS-HRM svou citlivostí a relativní nenáročností konkuruje ostatním zavedeným metodám, jako jsou metylačně-specifická PCR nebo přímá bisulfitová sekvenace. Elektrochemie nabízí nenáročnou přístrojovou vybavení a při použití vhodných elektroaktivních molekul a elektrodových povrchů i několik zajímavých strategií rozlišení cytozinů a metylcytozinů. Obě techniky byly již úspěšně použity při stanovení metylace DNA promotorů důležitých tumor supresorových genů a mohly by tak v budoucnu přispět ke zpřesnění diagnostiky a prognostiky onkologických onemocnění. Aberantní metylace promotorů byla popsána již u stovek genů se vztahem k nádorovým onemocněním a s rozvojem metod, jež by umožňovaly jejich detekci i v klinické praxi, by se řada z nich mohla stát novými důležitými biomarkery.

### Klíčová slova

DNA metylace – 5-methylcytozin – HRM analýza – teplota tání – DNA duplex – elektrochemie – hybridizace nukleových kyselin

### Summary

Cytosine methylation in DNA is an epigenetic mechanism regulating gene expression and plays a vital role in cell differentiation or proliferation. Tumor cells often exhibit aberrant DNA methylation, e.g. hypermethylation of tumor suppressor gene promoters. New methods, capable of determining methylation status of specific DNA sequences, are thus being developed. Among them, MS-HRM (methylation-specific high resolution melting) and electrochemistry offer relatively inexpensive instrumentation, fast assay times and possibility of screening multiple samples/DNA regions simultaneously. MS-HRM is due to its sensitivity and simplicity an interesting alternative to already established techniques, including methylation-specific PCR or bisulfite sequencing. Electrochemistry, when combined with suitable electroactive labels and electrode surfaces, has been applied in several unique strategies for discrimination of cytosines and methylcytosines. Both techniques were successfully tested in analysis of DNA methylation within promoters of important tumor suppressor genes and could thus help in achieving more precise diagnostics and prognostics of cancer. Aberrant methylation of promoters has already been described in hundreds of genes associated with tumorigenesis and could serve as important biomarker if new methods applicable into clinical practice are sufficiently advanced.

### Key words

DNA methylation – 5-methylcytosine – HRM analysis – melting temperature – DNA duplex – electrochemistry – nucleic acid hybridization

Práce byla podpořena grantem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Martin Bartošík, Ph.D.

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

Obdrženo/Submitted: 6. 5. 2016

Přijato/Accepted: 16. 5. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164S64>



## Úvod

Epigenetické mechanismy hrají klíčovou roli v normálním vývoji jedince i při vzniku různých onemocnění. Regulují expresi genů reverzibilní kovalentní modifikací DNA, RNA nebo proteinů (bez změny pořadí nukleotidů anebo aminokyselin), které jsou ovšem dědičné, a ovlivňují tak fenotyp, aniž by měnily genotyp. Epigenetické mechanismy se uplatňují na celé řadě úrovní (před transkripční, post-transkripční i post-translační), a jsou tak důležité např. v morfogenezi, při diferenciaci buněk anebo při jejich proliferaci. Mezi epigenetické mechanismy se řadí např. metylace DNA, acetylace histonů nebo fosforylace, sumoylace či ubiquitinace různých proteinů.

V případě metylace DNA zde máme na mysli reakci katalyzovanou DNA metyltransferázou (DNMT), která přenáší metylovou skupinu ( $-CH_3$ ) ze substrátu S-adenozyl-methioninu (SAM) na uhlík cytozinu v pozici 5', nacházejícího se v dinukleotidu CpG, za vzniku 5-metylcytosinu (obr. 1). Metylace cytozinů v DNA „tlumí“ expresi genů, přičemž se předpokládají dva hlavní mechanismy – přímá interference vazby transkripčních faktorů na DNA a aktivace histonových deacetyláz (které snižují expresi genů ovlivněním kompaktnosti DNA).

Distribuce CpG dinukleotidů je v rámci genomu značně asymetrická, jsou obvykle seskupeny do krátkých úseků, tzv. CpG „ostrůvků“, nacházejících se nejčastěji v promotorech genů. Ve většině případů jsou tyto cytoziny nemetylované, výjimky tvoří plně metylované ostrůvky např. v některých genech v ženských chromozomu X nebo u imprintovaných genů na jedné parentální alele [1].

Abnormální metylace DNA byla detekována i v nádorových buňkách. Ty paradoxně vykazují jednak zvýšenou metylaci (hypermetylací) promotorů tumor supresorových genů [1] blokující expresi proteinů důležitých např. při opravě poškození DNA nebo apoptóze, na druhé straně však i globálně sníženou metylaci (hypometylací) genomu vedoucí k vyšší expresi původně utlumených, potenciálně nebezpečných genů (např. virových nebo imprintovaných genů, repetitivních sekvencí atd.) [2], popřípadě k chromozomální destabilizaci [3]. Hypermetylace promotorů byla prokázána např. v genu kódujícím protein p16 u různých typů nádorů (karcinom mléčné žlázy, žaludku, plic atd.) [4], BRCA1 (karcinom mléčné žlázy a vaječníků) [5], v genu kódujícím O6-metylguanin DNA metyltransferázu (MGMT) v glioblastomech [6], glutation-S-transferázu [7] nebo VHL (karcinom ledvin) [8].

Objevují se důkazy, že metylace DNA ovlivňuje i expresi mikroRNA, důležitých posttranskripčních regulátorů genové exprese [9].

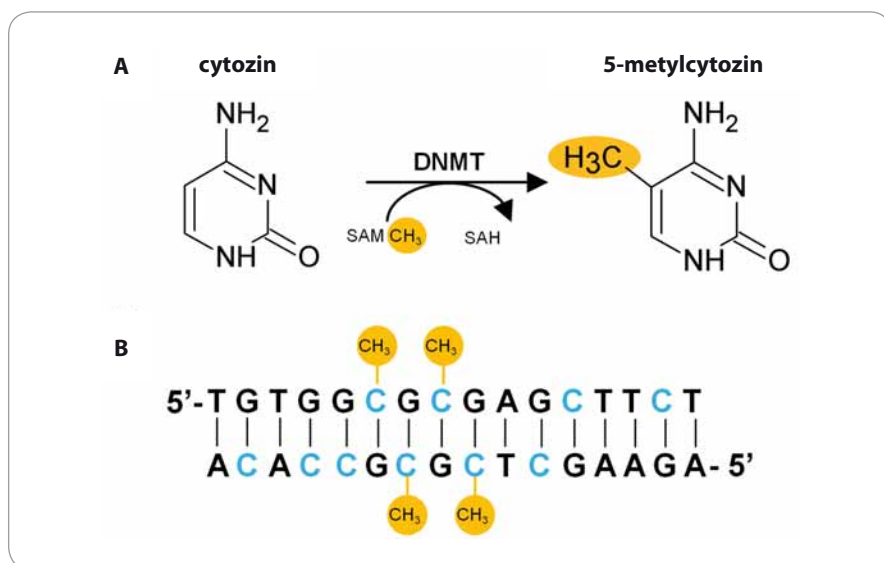
Globální hypometylace DNA byla naopak nalezena např. u nádorů prostaty, hepatocelulárních karcinomů nebo karcinomu děložního hrdla [10]. Snížená metylace nebo až demetylace může postihnout i promotory onkogenů. Naše skupina prokázala, že demetylace onkogenů E6 v genomu lidského papilomaviru 16 (HPV-16) způsobujícího rakovinu děložního hrdla vede k jeho zvýšené expresi, a může tak sloužit jako prediktivní biomarker transformace prekancerózních lézí na karcinom [11]. Analýza metylace DNA proto skýtá obrovský potenciál využitelný např. pro včasnou diagnostiku nádorů a případné určení jejich invazivity, progresu, metastatického potenciálu nebo chemosenzitivity [12].

## Současné metody studia metylace DNA

Existují metody, které sice dokážou kvantifikovat globální metylaci DNA, např. HPLC [13], ovšem neposkytují informace o konkrétních metylovaných pozicích v rámci genomu, a nejsou tak vhodné pro funkční analýzy. Budeme se proto věnovat pouze těm přístupům, které umožňují určit míru metylace konkrétního místa v DNA, tj. obvykle sekvence genu nebo jeho promotoru. Velká většina z těchto metod je založena na 1. použití metyl senzitivních restričních endonukleáz, 2. reakci DNA s hydrogensulfidem sodným (tzv. bisulfitové konverzi) anebo 3. chromatinové imunoprecipitaci s využitím protilátek vůči metylycytozinu. Všechny tyto přístupy byly vyvinuty v 70. a 80. letech 20. století a od té doby zaznamenaly značný rozvoj.

### Restriční analýza

Metyl senzitivní restriční endonukleázy (restriktázy) jsou speciální enzymy, které rozeznávají a štěpí konkrétní restriční místa v DNA v závislosti na přítomnosti metylycytozinu. Obvykle jde o enzymy štěpící pouze nemetylovanou DNA, např. *HpaII* (rozeznávající a štěpící sekvenci CCGG), *BstI* (CGCG) nebo *HhaI* (GCGC), přičemž přítomnost me-



Obr. 1. Metylace cytozinu.

A. DNA metyltransferáza (DNMT) katalyzuje přeměnu cytozinu na 5-metylycytozin. Zdroj metylových skupin je S-adenozyl-methionin (SAM), který je konvertován na S-adenozyl-homocystein (SAH). B. Metylace cytozinu nastává pouze u CpG dinukleotidů.

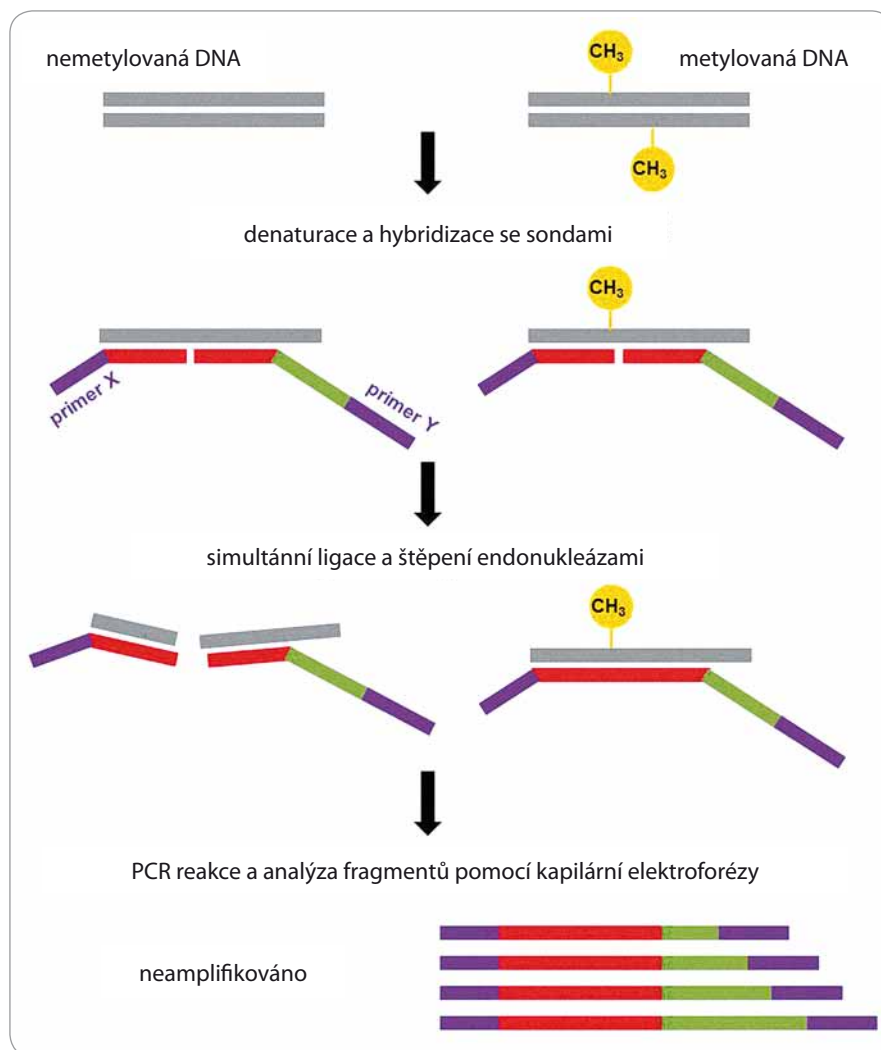
tylcytozinu v rozeznávané sekvenci štěpení DNA blokuje. Naproti tomu existují i endonukleázy, které naopak štěpí pouze metylovanou DNA, např. *McrBC* rozeznávající a štěpící dvě (G/A)<sup>m</sup>C místa vzdálená od sebe až 3 kb [11,14]. Zřejmě nevýhodou restričních analýz je nutná přítomnost daného restričního místa v analyzovaném genu nebo promotoru. Původní časově i materiálně náročnější Southernovu analýzu štěpených fragmentů [15] nahradila restriční analýza v kombinaci s kvantitativní PCR (qPCR). DNA je nejdříve štěpena vhodnou endonukleázou a následně pouze nefragmentovaná DNA (tudíž pouze metylovaná anebo nemetylovaná DNA, v závislosti na použité restriktáze) je amplifikována a současně kvantifikována pomocí qPCR [16].

Další metodou je tzv. MS-MLPA (methylation-sensitive multiplex ligation-dependent probe amplification) čili kombinace restrikce, ligace a amplifikace [17]. MLPA test je založen na aplikaci dvou oligonukleotidů, které hybridizují k přilehlým cílovým sekvencím ve zkoumané DNA a pomocí ligázy jsou spojeny do jedné sondy. Současně se přidává i restriktáza, která štěpí nemetylovanou ligovanou DNA. V průběhu následné PCR reakce jsou amplifikovány pouze neštěpené sondy (obsahující primer sekvence), které hybridizovaly s metylovanou DNA. Metoda je sice semi-kvantitativní, ale umožňuje analýzu až 60 různých fragmentů DNA v jediné multiplexní PCR reakci pomocí následné kapilární elektroforézy, a to na základě různých délek oligonukleotidů (obr. 2).

### Bisulfitová konverze

Hydrogensířičitan sodný (sodium bisulfite) deaminuje v sérii kroků cytozin na uracil, zatímco metylcytozin je chemicky chráněn a zůstává nezměněn. Takto modifikovaná DNA je následně použita jako templát pro PCR reakci, přičemž uracil je amplifikován jako thymin a metylcytozin jako cytozin (obr. 3). Tím jsou získány dvě různé sekvence DNA v závislosti na původní metylaci. Tato specifická konverze je základem mnoha technik analýzy DNA metylace.

Mezi nejpožívanější patří metylačně-specifická PCR (MSP) [18], která ampli-



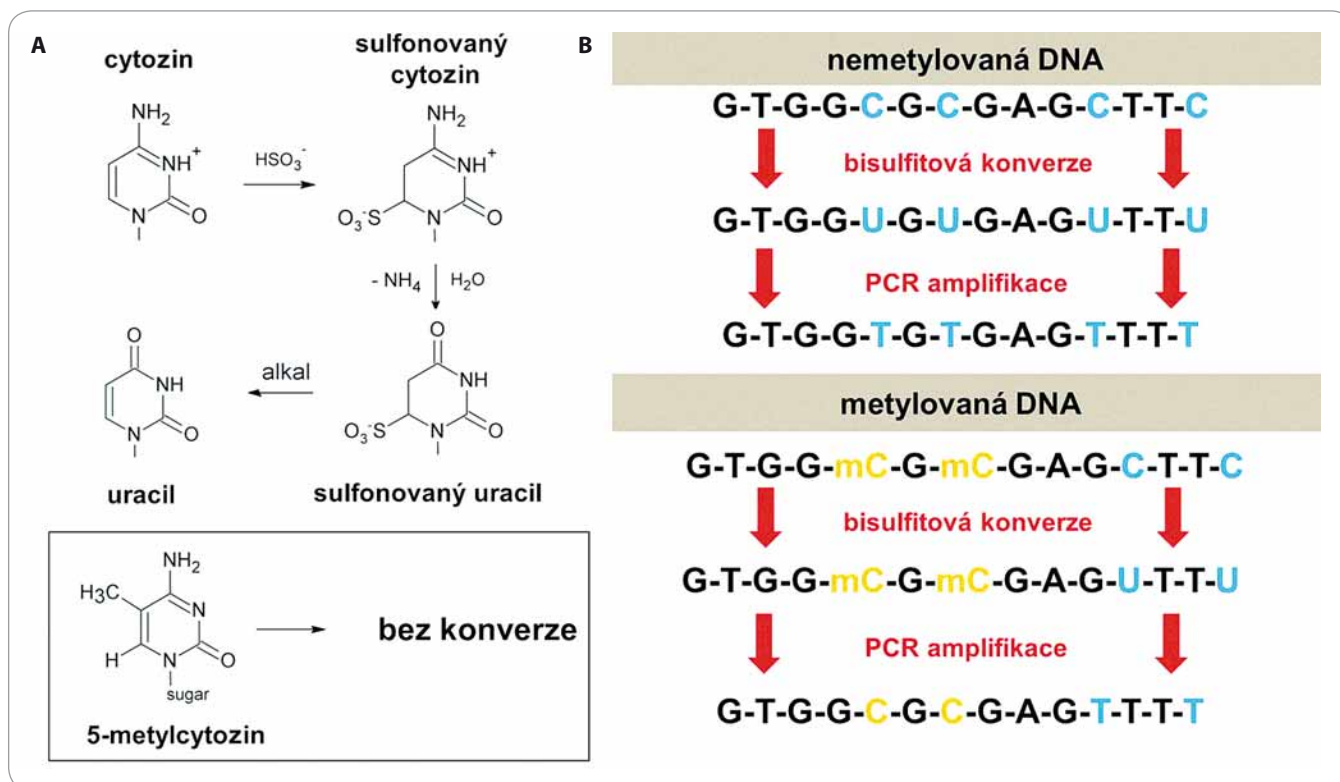
**Obr. 2. Schéma MS-MLPA.**

Stanovení metylace restričního místa kombinací ligace, štěpení, PCR reakce a kapilární elektroforézy. Základem je vhodný design DNA sond, z níž jedna obsahuje primer X a druhá primer Y. U metylované DNA po ligaci proběhne PCR reakce, generující amplikony o různých délkách v závislosti na délce původní DNA sondy, které jsou rozlišeny kapilární elektroforézou. Nemetylovaná DNA je po ligaci štěpena a amplifikace neprobíhá.

DNA sondy: fialové – sekvence primerů, červeně – sekvence hybridizující s cílovou DNA, zeleně – nehybridizující sekvence o různých délkách pro usnadnění analýzy kapilární elektroforézou

fikuje bisulfitem konvertovanou DNA pomocí metyl-specifických primerů, přičemž tyto primery jsou navrženy zvláště pro konvertovanou nemetylovanou DNA (která obsahuje uracily, a proto má primer více adeninů) a zvláště pro konvertovanou metylovanou DNA (primer obsahuje více guaninů). Amplikony jsou následně vizualizovány pomocí gelové elektroforézy. Jedná se o rychlou a citlivou metodu bez nutnosti speciálního příslušenství, není však dostatečně kvantitativní. Tou je naopak metoda Me-

thyLight [19] kombinující MSP (tj. konverzi bisulfitem s následnou amplifikací pomocí metyl-specifických primerů) a fluorescenční detekci pomocí Taqman sondy (DNA oligonukleotid značený na jednom konci fluoroforem a na druhém konci zhášedlem). Během PCR Taqman sonda hybridizuje s templátovou DNA v rámci amplifikované sekvence, přičemž DNA polymeráza během replikace sondy rozštěpí, fluorofor je tím od zhášedla oddělen, což vede k nárůstu fluorescence. I když se jedná o metodu



Obr. 3. Základy bisulfitové konverze.

A. Cytozin je při reakci s bisulfitem (hydrogensulfitem sodným) sulfonován, deaminován, a nakonec při zvýšeném pH desulfonován až na uracil, zatímco metylcytozin je nezměněn. B. Stejná primární sekvence DNA se po bisulfitové konverzi a PCR amplifikaci liší v závislosti na tom, zda byla původně metylována či nikoliv. Metylcytozin se amplifikuje jako cytozin, zatímco uracil jako thymin.

dražší, Taqman sondy zabezpečují vyšší specifitu amplifikace.

Bisulfitové pyrosekvencování poskytuje relativně přesná data o metylaci jednotlivých cytozinů, i když pouze u krátkých sekvencí do délky cca 250 bází. Po bisulfitové konverzi DNA následuje PCR, u které je jeden z primerů biotinylován, a může tak být imobilizován na streptavidinových kuličkách. Do reakční směsi jsou postupně přidávány jednotlivé deoxynukleotidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), přičemž v reakční směsi je v daný okamžik přítomen pouze jeden z těchto nukleotidů. Po inkorporaci komplementárního nukleotidu se uvolní pyrofosfát (PPi), který je enzymem ATP sulfurylázou konvertován na ATP. ATP je následně využito luciferázou k oxidaci luciferinu na oxyluciferin, čímž dochází k uvolnění světla, které je snímáno kamerou. Nespotebované nukleotidy jsou na závěr degradovány apyrázou a z kuliček odmyty, aby do reakční směsi mohly vstoupit jiné nukleotidy [20].

Kombinaci bisulfitové konverze s restriktivními endonukleázami představuje

tzv. COBRA analýza (combined bisulfite restriction analysis). Po bisulfitové konverzi a PCR amplifikaci jsou amplikony štěpeny restriktázou, která specificky štěpí restriktivní místo ovlivněné konverzí. Elektroforézou v denaturujícím gelu lze z poměru štěpených a neštěpených PCR produktů zjistit stupeň metylace [21].

#### Proteiny vázající metylcytozin

Metylcytoziny v DNA mohou být specificky zachyceny pomocí protilátek vůči metylcytozinu, popřípadě s využitím proteinů vázajících metylovou skupinu (methyl-binding proteins). V obou případech se v podstatě jedná o obohacení vzorku o metylovanou DNA a její následnou analýzu pomocí různých metod. Imunoprecipitace metylované DNA (methylated DNA immunoprecipitation – MeDIP) představuje metodu globální analýzy metylace. DNA je fragmentována ultrazvukem, po denuraci inkubována s protilátkou proti metylcytozinu a následně se sekundární protilátkou navázanou na magnetickou kuličku.

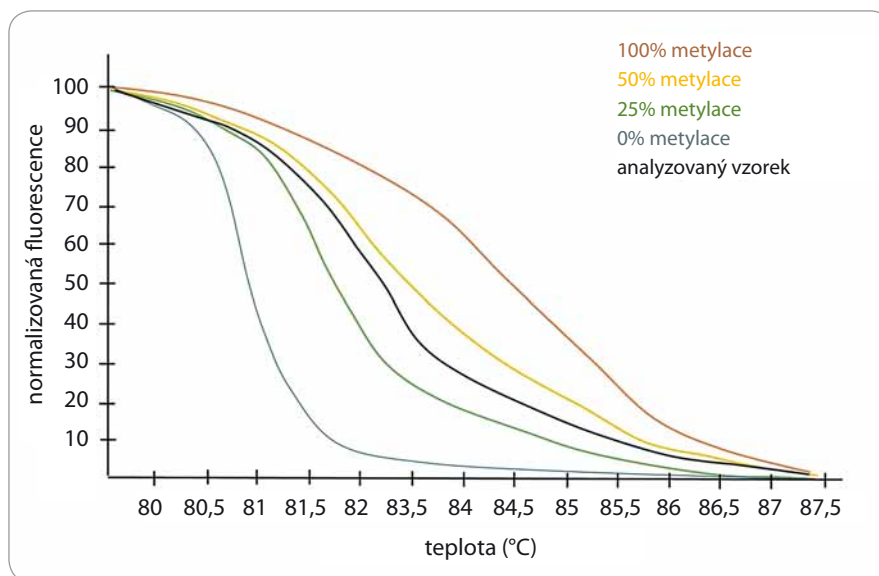
Metylovaná DNA je tak zachycena a nemetylovaná DNA je následně odmyta. Získaná DNA je sekvenována nebo analyzována pomocí DNA microarrays [22].

#### HRM analýza

Jednou z poměrně citlivých a nepřiliš nákladných metod analýzy metylace DNA je MS-HRM (methylation-specific high resolution melting) využívající rozdílných teplot tání dvouřetězcových DNA v závislosti na jejich sekvenci. Podíl párů cytozin-guanin (C-G) a thymin-adenin (T-A) obecně určuje pevnost vazby mezi dvěma řetězci DNA. Pár C-G je spojen třemi vodíkovými vazbami, zatímco T-A jen dvěma. Čím vyšší je tedy podíl C-G párů v analyzovaném řetězci, tím je vazba dvouřetězce silnější a tím vyšší je teplota tání,  $T_m$ , které je potřeba dosáhnout, aby dvouřetězcová DNA disociovala na jednotlivé řetězce. Pokud je k detekci DNA použito fluorescenční interkalační barvivo, pak je možné srovnat  $T_m$  jednotlivých dvouřetězců stanovením teploty, při které dochází k poklesu fluorescence

danému rozpadem dvouřetězce a uvolněním interkalačního barviva.

Vývoj interkalačních barviv, která neinhibují průběh PCR, a přístrojů s dostatečnou citlivostí zachycujících i jemné změny fluorescence vedl k využití metody HRM pro detekci jednonukleotidových polymorfizmů v genotypizačních studiích [23,24]. Stejný princip lze využít i pro rozlišení mezi metylovanou a nemetylovanou alelou, přičemž MS-HRM poprvé využili k detekci metylace *MGMT* promotoru Wojdacz et al [25]. V této variantě metody HRM je DNA nejprve podrobena bisulfidové konverzi a poté je v přítomnosti fluorescenčního interkalačního barviva amplifikován analyzovaný úsek. Po ukončení amplifikace je sledován pokles fluorescence jednotlivých vzorků při zvyšující se teplotě. Ke stanovení procenta metylace vzorku je vždy jako standard použita plně metylovaná a plně demetylovaná DNA, které jsou smíchány v určitých poměrech a od nichž lze stupeň metylace vzorku odečíst (obr. 4). Výhodou MS-HRM jsou poměrně nízké náklady a dostatečná citlivost pro detekci 0,1% metylace templátu. Nevýhodou je, že touto metodou lze zjistit pouze procento metylace dané sekvence, ale nikoliv, které konkrétní CpG dinukleotidy jsou metylované a které ne. Dále, stejně jako u ostatních metod založených na PCR dochází k nerovnoměrné efektivitě amplifikace metylované a nemetylované DNA sekvence, kdy nemetylovaná DNA je obecně amplifikována s vyšší účinností. Tento problém je řešitelný upraveným designem primerů tak, aby obsahovaly jeden až dva CpG dinukleotidy u 5'-konce, čímž se stanou o něco specifitější pro metylovanou alelu. Takto navržené primery spolu s optimalizací teploty renaturace pak umožní vyrovnání účinnosti PCR u metylované a nemetylované DNA [26]. MS-HRM lze nejlépe využít pro kvantifikaci metylace u DNA sekvencí bohatých na CpG dinukleotidy, které tvoří pouze homoduplexy, a mohou tak být srovnány s plně metylovanou/demetylovanou DNA. V případě sekvencí s nízkým obsahem CpG (méně než tři) se mohou tvořit i heteroduplexy a křivky tání jsou potom komplexnější a obtížněji interpretovatelné. Přesnější stanovení počtu



**Obr. 4. Typický normalizovaný výsledek MS-HRM.**

Fluorescenční profily, získané při zvyšující se teplotě, se liší v závislosti na původním stupni metylace amplifikovaného úseku DNA. Křivky tání kontrolních vzorků (metylovaná a demetylovaná DNA smíchané v různých poměrech) umožní určit stupeň metylace analyzovaného vzorku.

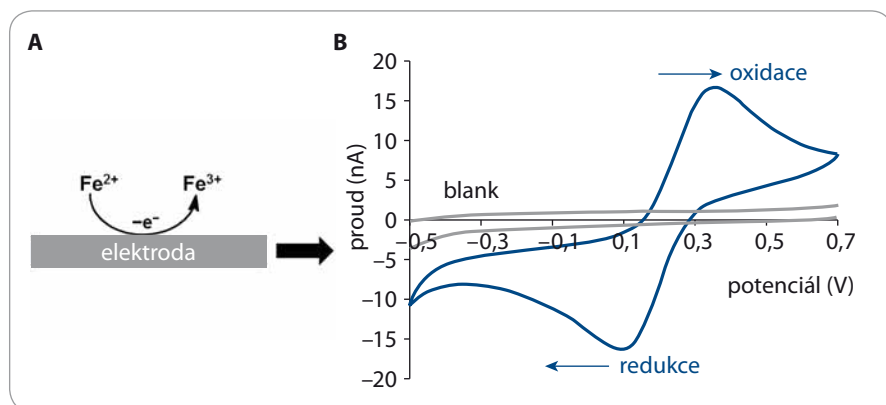
metylovaných/nemetylovaných alel i ve vzorku s nízkým obsahem CpG umožňuje modifikace MS-HRM využívající digitální PCR (dMS-HRM), při níž je vzorek před amplifikací naředěn tak, že je následně amplifikována vždy jen jedna molekula DNA. Tím se zároveň vyřeší i nerovnoměrná efektivita amplifikace metylovaných vs. nemetylovaných DNA sekvencí [27].

Od dob těchto pilotních studií se využití metodiky MS-HRM postupně rozšiřuje a přibývá prací, ve kterých byla úspěšně aplikována na detekci metylace promotorů genů spojených většinou s nádorovými onemocněními. Konkrétně byla takto popsána metylace promotoru genu *AKAP12* u karcinomu prostaty [28], u pacientek s karcinomem prsu pak byla touto metodou detekována např. metylace promotoru genu *CST6* [29] nebo *SOX17* [30]. Yang et al provedli MS-HRM analýzu metylace promotorů několika genů s funkcí nádorových supresorů, přičemž získali zajímavé výsledky, které by mohly být využity při včasné detekci karcinomů nosohltanu [31]. Citlivost metody potvrzuje i její využití u pacientů s kolorektálním karcinomem při analýze metylací cirkulující nádorové DNA v periferní krvi [32] nebo ze stolice [33]. U pacientek s rakovinou děložního hrdla

pak byla využita k detekci metylovaného virového genu *L1* u HPV-16, čímž by mohla přispět k přesnější prognostice tohoto onemocnění [34,35]. dMS-HRM byla využita při detailní analýze metylace promotoru genu kódujícího *BRCA1* nebo *CDKN2B* [27,36].

## Elektrochemie

Elektrochemie se na rozdíl od výše popsaných optických metod zabývá přenosem elektronů mezi studovanou látkou a elektrodou, a to v prostředí elektrolytu (tj. vodivého roztoku). Studovaná látka může elektrodě elektrony odevzdávat (oxidovat se), nebo od elektrody elektrony přijímat (redukovat se), přičemž se tento přenos elektronů projeví změnou sledovaného signálu (obr. 5). Výhodou elektrochemie je jednoduchá a relativně levná instrumentace, rychlé měření a možnost miniaturizace systému s paralelní detekcí vzorků. I proto je čím dál častěji aplikována v oblasti molekulární onkologie, kde se obvykle používá při detekci různých biomarkerů (proteinů [37], DNA [38,39] nebo mikroRNA [40]), studiu interakcí DNA s proteiny [41] a poškození DNA nízkomolekulárními látkami [38], ale i při testování potenciálních protinádorových léčiv [42].



**Obr. 5. Elektroodový děj.**

Příklad elektroodového děje, znázorňující elektrooxidaci železnatého kationtu na povrchu elektrody (A). Pomocí cyklické voltametrie (B) se dá sledovat nejenom oxidace (horní pík), ale i zpětná redukce třímocného kationtu na dvoumocný (dolní pík). Šipky ukazují směr změny potenciálu v čase, monitoruje se proudová odezva. Z velikosti píků se dá stanovit koncentrace studované molekuly, např. DNA nebo proteinu.

Bylo rovněž publikováno několik strategií využívajících elektrochemickou analýzu metylace DNA. Nejjednodušší je přímé rozlišení cytozinu a metylcytozinu na povrchu určitých elektrod na bázi uhlíku, a to díky rozdílnému potenciálu jejich oxidace [43]. Výsledná voltametrická křivka (křivka závislosti proudu na potenciálu) pak obsahuje dva oddělené píky, jeden od cytozinu a druhý od metylcytozinu. Tento přístup, který jako jeden z mála nevyžaduje hybridizaci s komplementární DNA, ovšem vyžaduje vysoké vstupní koncentrace DNA a neumožňuje lokalizaci CpG dinukleotidů v rámci analyzované sekvence.

Velice častou strategií je elektrochemické sledování aktivity a inhibice metyltransferáz [44–50]. Povrch elektrody, popřípadě magnetických kuliček je modifikován nemetylovaným duplexem DNA obsahujícím restriční místo pro vybranou restriktázu, přičemž jedno z vláken DNA je obvykle elektrochemicky značeno. V přítomnosti DNMT nastává metylace cytozinů v CpG místech a následná inkubace s restriktázou vede k tomu, že nemetylovaný duplex je štěpen, zatímco metylovaný ne. Promytím elektrody/kuliček je odstraněna značená část nemetylované DNA, což vede v porovnání s metylovaným vzorkem k poklesu signálu. Jednotlivé práce se pak liší typem studovaného genu, zvolené restriktázy nebo použité elektroche-

mické značky. Skupina J. Bartonové aplikovala popsanou strategii pro studium hyperaktivity DNMT1 přímo v buněčných lyzátech kolorektálního karcinomu, přičemž zjistili výrazně vyšší aktivitu DNMT1 v nádorové tkáni oproti přilehlé zdravé tkáni [45]. qPCR ani Western blotting analýza ovšem tuto hyperaktivitu nepotvrdily, což autoři vysvětlují vyšší senzitivitou elektrochemické metody.

eMethylsorb je nedávno navržený test pro rozlišení metylované a nemetylované DNA na základě jejich rozdílných adsorpčních vlastností. Obě DNA jsou modifikovány bisulfitem a následně amplifikovány asymetrickou PCR, která vygeneruje jednořetězcové amplikony obohacené buď o guanin (pro metylovanou DNA), anebo adenin (pro nemetylovanou DNA). Rozdílné afinity těchto amplikonů ke zlatému povrchu elektrody vedou k větší adsorpci „adeninových“ amplikonů (od nemetylované DNA), a tudíž k větší elektrostatické repulzi se záporně nabitou elektroaktivní značkou (tj. k poklesu signálu). Prozatím byla metoda testována na DNA z nádorových buněk MCF-7, u které rozlišila 0%, 10%, 25%, 50%, 75% a 100% stupeň metylace [51,52].

Bisulfitová konverze byla použita i pro analýzu metylace genu *TP53* [53], a to bez použití PCR amplifikace. Autoři nepoužili DNA sondu, ale její strukturní analog složený z peptidové kostry a DNA nukleotidů, tzv. PNA (peptide

nucleic acid) sondu. Tato PNA sonda byla komplementární k metylované DNA po konverzi bisulfitem (naopak nemetylovaná DNA se po konverzi lišila ve dvou nukleotidech, a tudíž nebyla plně komplementární k PNA sondě). Následně aplikovali kladně nabitou elektroaktivní značku, která se elektrostaticky vázala na záporně nabitou metylovanou DNA daleko více než na nemetylovanou DNA (ta s PNA sondou totiž hybridizovala v mnohem menší míře). Výhodou PNA sondy je její elektroneutralita – proto se na ni kladně nabitá značka nevázala, což vedlo ke snížení falešně negativních výsledků. Metoda ovšem nebyla testována na biologických vzorcích, a proto zůstává otázkou, jestli bude efektivní nejenom u nádorových linií, ale zejména v klinickém materiálu od pacientů.

Naše laboratoř rovněž aplikovala bisulfitovou konverzi bez nutnosti použití PCR [54]. Metoda spočívá v tom, že metylcytozin je na rtuťových elektrodách redukovatelný, zatímco uracil po bisulfitové konverzi nikoliv. Metylovaná DNA tak po konverzi poskytovala vyšší signál než nemetylovaná DNA, přičemž množství metylcytozinů v DNA korelovalo s velikostí signálu. I tuto metodu je potřeba optimalizovat pro její použití v biologických vzorcích.

### Závěr a výhled do budoucnosti

Studium metylace DNA jakožto epigenetické modifikace regulující genovou expresi je nejen zajímavou, ale i nesmírně důležitou oblastí současného onkologického výzkumu. Čím dál tím více vědeckých prací potvrzuje vliv abnormální metylace na expresi důležitých nádorových supresorů nebo onkoproteinů, a vývoj nových metod pro analýzu metylace DNA tak může vést k efektivnější diagnostice nádorových onemocnění anebo k lepší predikci odpovědi na jejich léčbu. Prozatím však chybí dostatečně ověřené testy použitelné v klinické praxi. Jedním z mála je Epi proColon – diagnostický krevní test nedávno schválený americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pro detekci metylace promotoru genu pro Septin 9 u pacientů s kolorektálním karcinomem [55].

Protože důležitým faktorem těchto testů bude i jejich finální cena, vyvíjejí se i me-

tody relativně časově a laboratorně nenáročné, a tudíž celkově levnější. Mezi tyto metody patří jednak MS-HRM, sledující rozdílné teploty tání duplexů DNA v závislosti na metylaci konkrétních CpG míst, a různé elektrochemické techniky. I navzdory značnému pokroku ve vývoji těchto metod však bude potřeba jejich přísná validace v klinickém materiálu. Dá se očekávat, že ruku v ruce s dalším pokrokem ve výzkumu metylace DNA a jejího vlivu na karcinogenezi dojde k dalšímu rozvoji a využití těchto metod v diagnostice a prognostice onkologických onemocnění.

## Literatura

- Herman JG, Baylin SB. Mechanisms of disease: gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New Engl J Med* 2003; 349(21): 2042–2054.
- Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 1998; 20(2): 116–117.
- Xu GL, Bestor TH, Bouchis D et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999; 402(6758): 187–191.
- Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(20): 11891–11896.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(7): 564–569.
- Hegi ME, Diserens A, Gorlia T et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New Engl J Med* 2005; 352(10): 997–1003.
- Esteller M, Corn PG, Urena JM et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998; 58(20): 4515–4518.
- Sato Y, Yoshizato T, Shiraiishi Y et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2013; 45(8): 860–867. doi: 10.1038/ng.2699.
- Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E et al. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Molecular Oncology* 2012; 6(6): 567–578. doi: 10.1016/j.molonc.2012.07.007.
- Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21(35): 5400–5413.
- Hublarova P, Hrstka R, Rotterova P et al. Prediction of human papillomavirus 16 E6 gene expression and cervical intraepithelial neoplasia progression by methylation status. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(3): 321–325. doi: 10.1111/IGC.0b013e31819d8a5c.
- Delpu Y, Cordelier P, Cho WC et al. DNA methylation and cancer diagnosis. *Int J Mol Sci* 2013; 14(7): 15029–15058. doi: 10.3390/ijms140715029.
- Ehrlich M, Gamasosa MA, Huang LH et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res* 1982; 10(8): 2709–2721.
- Badal V, Chuang LS, Tan EH et al. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 2003; 77(11): 6227–6234.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69(6): 915–926.
- Bruce S, Hannula-Jouppi K, Lindgren CM et al. Restriction site-specific methylation studies of imprinted genes with quantitative real-time PCR. *Clin Chem* 2008; 54(3): 491–499. doi: 10.1373/clinchem.2007.098491.
- von Känel T, Huber AR. DNA methylation analysis. *Swiss Med Wkly* 2013; 143: w13799. doi: 10.4414/SMW.2013.13799.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(18): 9821–9826.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(8): e32.
- Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* 2007; 2(9): 2265–2275.
- Xiong ZG, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(12): 2532–2534.
- Jacinto FV, Ballestar E, Esteller M. Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): hunting down the DNA methylome. *Biotechniques* 2008; 44(1): 35–43.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003; 49(6): 853–860.
- Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10(2): 219–240. doi: 10.1586/erm.09.84.
- Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(6): E41.
- Wojdacz TK, Hansen LL, Dobrovic A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC Res Notes* 2008; 1(1): 54. doi: 10.1186/1756-0500-1-54.
- Snell C, Krypyuk M, Wong EM et al. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 2008; 10(1): R12. doi: 10.1186/bcr1858.
- Liu W, Gong J, Hu J et al. Quantitative assessment of AKAP12 promoter methylation in human prostate cancer using methylation-sensitive high-resolution melting: correlation with Gleason score. *Urology* 2011; 77(4): 1006.e1–1006.e7. doi: 10.1016/j.urology.2010.12.010.
- Dimitrakopoulos L, Vorkas PA, Georgoulas V et al. A closed-tube methylation-sensitive high resolution melting assay (MS-HRMA) for the semi-quantitative determination of CST6 promoter methylation in clinical samples. *BMC Cancer* 2012; 12: 486–497. doi: 10.1186/1471-2407-12-486.
- Mastoraki S, Chimonidou M, Dimitrakopoulos L et al. A rapid and accurate closed-tube methylation-sensitive high resolution melting analysis assay for the semi-quantitative determination of SOX17 promoter methylation in clinical samples. *Clin Chim Acta* 2015; 444: 303–309. doi: 10.1016/j.cca.2015.02.035.
- Yang X, Dai W, Kwong DL et al. Epigenetic markers for noninvasive early detection of nasopharyngeal carcinoma by methylation-sensitive high resolution melting. *Int J Cancer* 2015; 136(4): E127–E135.
- Liu W, Guan M, Su B et al. Rapid determination of AKAP12 promoter methylation levels in peripheral blood using methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) analysis: application in colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2010; 411(13–14): 940–946.
- Xiao Z, Li B, Wang G et al. Validation of methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM) for the detection of stool DNA methylation in colorectal neoplasms. *Clin Chim Acta* 2014; 431: 154–163. doi: 10.1016/j.cca.2014.01.044.
- Qiu C, Zhi Y, Shen Y et al. High-resolution melting analysis of HPV-16 L1 gene methylation: a promising method for prognosing cervical cancer. *Clin Biochem* 2015; 48(13–14): 855–859. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.05.006.
- Jacquin E, Baraquin A, Ramanah R et al. Methylation of human papillomavirus type 16 CpG sites at E2-binding site 1 (E2BS1), E2BS2, and the Sp1-binding site in cervical cancer samples as determined by high-resolution melting analysis-PCR. *J Clin Microbiol* 2013; 51(10): 3207–3215. doi: 10.1128/JCM.01106-13.
- Candiloro IL, Mikeska T, Hokland P et al. Rapid analysis of heterogeneously methylated DNA using digital methylation-sensitive high resolution melting: application to the CDKN2B (p15) gene. *Epigenetics Chromatin* 2008; 1(1): 7. doi: 10.1186/1756-8935-1-7.
- Palecek E, Tkac J, Bartosik M et al. Electrochemistry of nonconjugated proteins and glycoproteins. Toward sensors for biomedicine and glycomics. *Chem Rev* 2015; 115(5): 2045–2108. doi: 10.1021/cr500279h.
- Palecek E, Bartosik M. Electrochemistry of nucleic acids. *Chem Rev* 2012; 112(6): 3427–3481. doi: 10.1021/cr200303p.
- Bartosik M, Palecek E, Vojtesek B. Elektrochemická analýza nukleových kyselin, bílkovin a polysacharidů v biomedicině. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S53–S60.
- Campuzano S, Pedrero M, Pingarron JM. Electrochemical genosensors for the detection of cancer-related miRNAs. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406(1): 27–33. doi: 10.1007/s00216-013-7459-z.
- Boon EM, Salas JE, Barton JK. An electrical probe of protein-DNA interactions on DNA-modified surfaces. *Nat Biotechnol* 2002; 20(3): 282–286.
- Bartosik M, Koubkova L, Karban J et al. Electrochemical analysis of a novel ferrocene derivative as a potential antitumor drug. *Analyst* 2015; 140(17): 5864–5867. doi: 10.1039/c5an00958h.
- Wang P, Han P, Dong L et al. Direct potential resolution and simultaneous detection of cytosine and 5-methylcytosine based on the construction of polypyrrole functionalized graphene nanowall interface. *Electrochem Commun* 2015; 61: 36–39.
- Deng H, Yang X, Yeo SP et al. Highly sensitive electrochemical methyltransferase activity assay. *Anal Chem* 2014; 86(4): 2117–2123. doi: 10.1021/ac403716g.
- Furst AL, Barton JK. DNA electrochemistry shows DNMT1 methyltransferase hyperactivity in colorectal tumors. *Chem Biol* 2015; 22(7): 938–945. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.05.019.
- Furst AL, Muren NB, Hill MG et al. Label-free electrochemical detection of human methyltransferase from tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(42): 14985–14989. doi: 10.1073/pnas.1417351111.
- Li W, Liu X, Hou T et al. Ultrasensitive homogeneous electrochemical strategy for DNA methyltransferase activity assay based on autonomous exonuclease III-assisted isothermal cycling signal amplification. *Biosens Bioelectron* 2015; 70: 304–309. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.060.
- Muren NB, Barton JK. Electrochemical assay for the signal-on detection of human DNA methyltransferase activity. *J Am Chem Soc* 2013; 135(44): 16632–16640.
- Wu H, Liu S, Jiang J et al. A sensitive electrochemical biosensor for detection of DNA methyltransferase activity by combining DNA methylation-sensitive cleavage and terminal transferase-mediated extension. *Chem Commun* 2012; 48(50): 6280–6282. doi: 10.1039/c2cc32397d.
- Zhang L, Wei M, Gao C et al. Label-free electrochemical detection of methyltransferase activity and inhibitor screening based on endonuclease HpaII and the deposition of polyaniline. *Biosens Bioelectron* 2015; 73: 188–194. doi: 10.1016/j.bios.2015.05.066.

51. Sina AA, Howell S, Carrascosa LG et al. eMethylsorb: electrochemical quantification of DNA methylation at CpG resolution using DNA-gold affinity interactions. *Chem Commun (Camb)* 2014; 50(86): 13153–13156. doi: 10.1039/c4cc06732k.
52. Koo KM, Sina AA, Carrascosa LG et al. eMethylsorb: rapid quantification of DNA methylation in cancer cells on screen-printed gold electrodes. *Analyst* 2014; 139(23): 6178–6184. doi: 10.1039/c4an01641f.
53. Wang P, Wu H, Dai Z et al. Picomolar level profiling of the methylation status of the p53 tumor suppressor gene by a label-free electrochemical biosensor. *Chem Commun* 2012; 48(87): 10754–10756. doi: 10.1039/c2cc35615e.
54. Bartosik M, Fojta M, Palecek E. Electrochemical detection of 5-methylcytosine in bisulfite-treated DNA. *Electrochim Acta* 2012; 78: 75–81.
55. Epigenomics.com [homepage on the Internet]. Společnost Epigenomics [updated 2016 May 16; cited 2016 May 16]. Available from: [www.epigenomics.com/en/products-services/epi-procolon.html](http://www.epigenomics.com/en/products-services/epi-procolon.html).

# Úloha PD-1/PD-L1 signalizace v protinádorové imunitní odpovědi

## The Role of PD-1/PD-L1 Signaling Pathway in Antitumor Immune Response

Zatloukalová P., Pjehová M., Babčanová S., Hupp T. R., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Pro správnou funkci imunitního systému je důležitá souhra mezi inhibičními a stimulačními mechanismy, které jednak chrání organismus před cizorodými mikroorganismy a látkami z vnějšího prostředí, ale také brání zdravou tkáň před případnými poškozujícími útoky imunitního systému. Inhibiční mechanismy jsou tedy nepostradatelnou složkou imunitního systému podílející se na jeho správné funkci. Nádorové buňky však mohou inhibiční mechanismy zneužít k úniku před imunitní reakcí a tím podpořit vznik a rozvoj nádorového onemocnění. Proto je tedy za jednu z charakteristik nádorových buněk považována schopnost vyhnout se imunitnímu dozoru. Imunoterapie je léčebným postupem, v průběhu kterého dochází ke stimulaci imunitního systému. Za efektivní a specifické imunoterapeutické cíle jsou považovány kontrolní body imunitní reakce. V posledních letech je značná pozornost věnována inhibiční dráze PD-1/PD-L1, tj. dráze programované buněčné smrti. Blokádou PD-1/PD-L1 dochází k utlumení inhibičního signálu, k obnovení účinnosti imunitních mechanismů a ke zvýšení protinádorové aktivity. Protilátky blokující receptor PD-1 a jeho ligand PD-L1 jsou již poměrně úspěšně klinicky využívány. Přesto je stále velmi důležité vést výzkum se zaměřením na objasnění mechanismu této dráhy, na nalezení faktorů významně ovlivňujících její aktivitu a na popis variability této dráhy vycházející z různorodosti nádorového prostředí. Získané výsledky lze poté využít k dosažení maximálního protinádorového účinku inhibiční osy PD-1/PD-L1. **Cíl:** Cílem tohoto článku je shrnout dosavadní poznatky o PD-1/PD-L1 signální dráze a prodiskutovat její úlohu v protinádorové imunitní odpovědi.

### Klíčová slova

dráha programované buněčné smrti – únikové mechanismy nádorů – PD-1 – PD-L1 – CD274

### Summary

**Background:** Correct function of the immune system depends on close cooperation between stimulation and inhibition signals, which protect an organism from outside microorganisms and other agents, but also protects healthy tissues against possible self-destructing attacks of the immune system. However, the inhibitory mechanisms can be abused by cancer cells that evade immune responses and, in fact, they help develop cancer. Therefore, one of the characteristics of cancer cells is the ability to evade immune recognition. Immunotherapy is a treatment method that stimulates the immune system to fight cancer. The checkpoints of the immune system can be considered as effective and specific therapeutic targets. Programmed cell death signaling pathway (PD-1/PD-L1) is one of the most discussed inhibition pathways in recent years. Blockage of PD-1/PD-L1 interaction restores mechanisms of immune response and increases antitumor immune activity. Monoclonal antibodies blocking PD-1 receptor or its ligand PD-L1 have already shown clinical efficacy. However, it is important to carry out research to explore the mechanisms of PD-1/PD-L1 pathway to find new factors, which influence its activity and, of course, to illuminate the variability of this pathway which naturally originates in the diversity of the tumor milieu. Obtained results could be utilized to achieve maximal anticancer effect after inhibition of PD-1/PD-L1 signaling pathway useful in clinical practice. **Aim:** The aim of the article is to summarize current knowledge about PD-1/PD-L1 signaling pathway and to discuss its role in antitumor immune response.

### Key words

programmed cell death pathway – tumor escape – PD-1 – PD-L1 – CD274

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



**Mgr. Pavlína Zatloukalová, Ph.D.**  
Regionální centrum aplikované  
molekulární onkologie  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: pavlina.zatloukalova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 13. 6. 2016

Přijato/Accepted: 4. 8. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164572>



## Úvod

Imunitní systém zajišťuje integritu organismu tím, že jej chrání před patogenními organizmy a škodlivými látkami, rozpoznává vlastní tkáň, odstraňuje buňky staré, poškozené a nádorové. Veškeré děje probíhající v organismu, vč. karcinogeneze, jsou pod neustálým imunitním dohledem. Imunitní systém potlačuje růst nádorových buněk především v počátečních fázích nádorové transformace. S rozvojem nádoru se mechanismy imunitní reakce postupně vyčerpávají a nádorové buňky nasazují nástroje, kterými imunitní reakci samy účinně omezují. Imunitní systém je navíc ve vztahu k nádorovým buňkám v nevýhodě, a to z důvodu značné podobnosti nádorových buněk s normálními. Imunitní systém má tendenci nádorové buňky tolerovat jako buňky vlastní a tím snižuje svoji účinnost v boji proti nádorům. Pokud je ovšem abnormalita nádorových buněk rozpoznatelná, jsou do reakce zapojeny všechny mechanismy přirozené (nespecifické) i adaptivní (antigeně specifické) imunity.

Nádorové buňky uplatňují řadu strategií, pomocí nichž se snaží uniknout kontrole imunitního systému. Nádorová buňka se především snaží zamaskovat svůj specifický nádorový antigen rozpoznatelný imunitním systémem. Immunogenicita (schopnost vyvolat imunitní odpověď) nádorových buněk je velmi účinně snižována mutacemi v genech kódujících nádorové antigeny, které mají za následek vznik variant imunitním systémem nerozpoznatelných. U řady nádorových buněk může pro změnu dojít k poklesu, nebo dokonce až ke ztrátě exprese MHC molekul (major histocompatibility complex – hlavní histokompatibilní komplex) nezbytných pro zviditelnění nádorových antigenů pro T lymfocyty a u některých nádorů dochází ke zvýšené produkci glykokalyxových molekul překrývajících nádorové antigeny [1].

Nádorové buňky jsou schopné ve svůj prospěch zneužívat také samotné buňčné složky imunitního systému. T lymfocyty se podílejí na rozpoznání a likvidaci patogenů a nádorových buněk, přičemž jejich aktivita je velmi přísně modulovaná pozitivními (kostimulač-

ními) a negativními (inhibičními) regulačními signály. Aktivace „naivních“ T lymfocytů je zprostředkována přes TCR receptor interagující s antigenem navázaným na molekulu MHC v antigen prezentujících buňkách (APC) (obr. 1). Tento signál zajišťuje specifickou imunitní odpověď, ale sám o sobě není k aktivaci T lymfocytů dostatečný. Druhý, tzv. kostimulační signál, je přenášen prostřednictvím kostimulační molekuly CD28 přítomné na povrchu T lymfocytů, která se váže na receptor B7 přítomný na APC. Kostimulační signál je na antigenu nezávislý, ale k aktivaci T lymfocytů je nezbytný. Nedostatečná síla kostimulačního signálu po setkání T lymfocytu s nádorovou buňkou způsobí „uspání“ neboli funkční inaktivitu, tzv. anergii. Proto jsou také kostimulační molekuly CD80 a CD86 exprimované nádorovými buňkami jen minimálně nebo vůbec [2]. Anergní T lymfocyty nemají schopnost produkovat aktivační cytokiny, což brání jejich dozrávání v buňky efektorové.

Rozsah imunitní reakce je závislý na interakci řady dalších receptorů a ligandů, které zesilují či tlumí procesy aktivace T lymfocytů. Významnou inhibiční dráhou navozující funkční inaktivitu lymfocytů je PD-1/PD-L1, která je považována za jeden z kontrolních bodů imunitního systému (checkpoint). Obecně tato dráha chrání organismus před vznikem autoimunitních onemocnění, ale současně se může podílet na navození nádorové tolerance. Vznik nádorové tolerance je složitý a komplexní proces, který je často provázen dysbalancí mezi inhibičními a kostimulačními signály. Zvýšená aktivita inhibiční PD-1/PD-L1 dráhy může vyvolat funkční postižení efektorových T lymfocytů, a tím způsobit jejich „vyčerpání“ (exhausting). „Vyčerpané“ T lymfocyty nejsou schopné specifické cytotoxické odpovědi a destrukce cílových buněk [3]. K této T lymfocytární dysfunkci může docházet, kromě již zmíněných nádorových onemocnění, také u dlouhodobých infekcí a jejím typickým znakem je zvýšená exprese PD-1.

### PD-1 receptor a jeho exprese

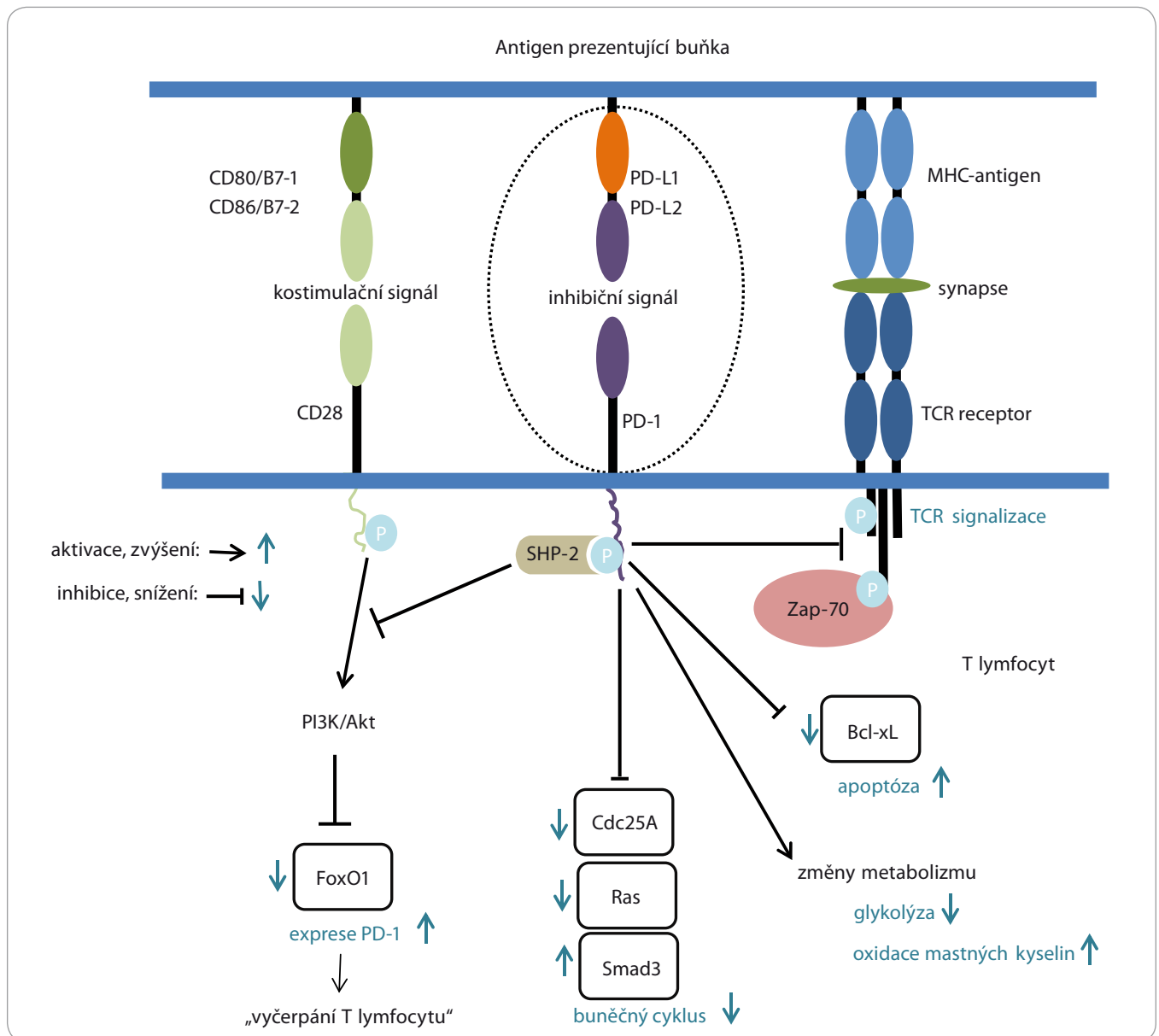
PD-1 je transmembránový glykoprotein typu I patřící do velké imunoglobulinové rodiny proteinů CD28/B7. PD-1 je tvo-

řen transmembránovou hydrofobní doménou, na kterou je přes 20 aminokyselin dlouhý linker navázaná extracelulární IgV doména, která vykazuje 21–22% homologii s ostatními receptory rodiny CD28 [4]. Na vnitřní straně membrány se nachází intracelulární doména receptoru se dvěma konzervovanými tyrozinovými motivy – ITIM (immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif) neboli inhibiční motiv receptoru imunitního systému založený na tyrozinu – a ITSM (immunoreceptor tyrosin-based switch motif) neboli „přepínatelný“ motiv receptoru imunitního systému založený na tyrozinu. Inhibiční funkce PD-1 je vázaná především na ITSM motiv (TxYxxV/I) [5] a jeho významnost byla potvrzena nalezením mutace, která potlačila inhibiční schopnost PD-1. Naopak mutace v sekvenci ITIM funkce PD-1 neovlivnila a předpokládá se, že ITIM je pravděpodobně zapojen do jiných regulačních dějů nesouvisejících s aktivací T lymfocytů [5]. PD-1 se v membráně vyskytuje ve formě monomeru, a to z důvodu nepřítomnosti cysteinových zbytků, které by umožnily homodimerizaci.

PD-1 je kódován genem *PDCD1* lokalizovaným na chromozomu 2 a obsahujícím pět exonů [6]. Je exprimován především na aktivovaných T a B lymfocytech, monocytech, NK buňkách, dendritických buňkách a na tumor infiltrujících lymfocytech [6]. K expresi PD-1 může také docházet na regulačních T lymfocytech (Treg), a to na membráně i v cytoplazmě [7]. V tomto případě není ovšem jasné, zda cytoplazmatický PD-1 uplatňuje své inhibiční vlastnosti [8]. V klidových imunitních buňkách byla pozorována jen minimální exprese PD-1. Po stimulaci T lymfocytů však byla významná hladina PD-1 detekována již po 2 hod a exprese PD-1 plynule stoupala v průběhu dalších 24 hod [9]. K silné expresi PD-1 dochází na „vyčerpaných“ inaktivních T lymfocytech při chronické virové infekci [3]. Přestože je PD-1 exprimován v celé řadě buněk imunitního systému, pravděpodobně nejdůležitější funkci zaujímá jako inhibiční receptor na T lymfocytech.

### Ligandy PD-L1 a PD-L2 a jejich exprese

Mezi ligandy specificky se vážající na PD-1 patří PD-L1 (neboli B7-H1, CD274)



Obr. 1. Molekulární mechanismus PD-1/PD-L1 signalizace. Upraveno podle [34].

a PD-L2 (neboli B7-DC, CD273). Jedná se o transmembránové glykoproteiny imunoglobulinové povahy mající ve své struktuře extracelulární domény IgC a IgV typické pro rodinu proteinů B7. Domény obsahují čtyři cysteinové zbytky, které vytvářejí disulfidické můstky stabilizující molekulu. Cytoplazmatická doména je tvořena řetězcem 30 aminokyselin a pravděpodobně není schopná dále přenášet signál po vazbě ligandu na PD-1.

Inhibiční role PD-L1 v imunitním systému byla objasněna u myši deficientní v PD-L1, u kterých se rozvinulo au-

toimunitní onemocnění [10]. Později bylo potvrzeno, že PD-1/PD-L1 interakce hraje významnou roli v potlačení imunitní odpovědi v nádorovém mikroprostředí [11,12]. Dalším interakčním partnerem PD-L1 je kostimulační molekula CD80 exprimovaná na aktivovaných T lymfocytech [13]. Jejich vzájemnou interakcí dochází k omezení funkce T lymfocytů a ke snížení produkce cytokinů [13]. Jakou měrou se na omezení imunitní odpovědi podílí interakce PD-L1 s PD-1 či CD80 není dosud známo [14]. Interakčním partnerem PD-L2 je kromě PD-1 také transmembrá-

nový receptor RGMB (repulsive guidance molecule b neboli Dragon). Funkce RGMB v rámci imunitního systému není doposud zcela objasněna. Bylo zjištěno, že interakce PD-L2/RGMB zvyšuje toleranci k patogenům, které proniknou do dýchacích cest [15].

Expresní profily PD-L1 a PD-L2 se výrazně liší, proto se předpokládá, že se každý účastní jiných procesů regulace imunitní odpovědi. PD-L2 je obvykle detekován ve velmi nízké hladině a jeho exprese je omezena na makrofágy a dendritické buňky. Předpokládá se, že hlavní funkcí PD-L2 je aktivace a polarizace

T lymfocytů [16]. PD-L1 je exprimován zejména na T a B lymfocytech, dendritických buňkách a makrofázích. Expres PD-L1 však byla zjištěna i v buňkách zdravé tkáně plic, jater, sleziny atd. [6], kde pravděpodobně přispívá k periferní toleranci [6]. Nádorové tkáně často vykazují zvýšenou hladinu PD-L1, který je většinou detekován v lokálně ohraničených oblastech na povrchu buněk [17] a pravděpodobně napomáhá vzniku nádorové tolerance. Zajímavý je příklad Hodgkinova lymfomu, který je charakterizován přítomností buněk Reedové-Sternberga vykazujících specifickou genovou aberaci, a to amplifikaci oblasti chromozomu *9p24.1*, která je zodpovědná za zvýšenou produkci ligandů PD-L1 a PD-L2 [18]. Zvýšená hladina PD-L1 koreluje s nepříznivou prognózou onemocnění a expresí PD-L1 zvyšuje agresivitu a invazivitu nádorů [16].

### Molekulární mechanismus PD-1/PD-L1 signalizace

Pro aktivaci T lymfocytů je zásadní interakce TCR receptoru s antigenem navázaným na MHC molekulu APC za vzniku imunologické synapse. Jedná se o supra-molekulární strukturu, jejíž součástí jsou kostimulační molekuly jako CD28, CD80/CD86 či CD40, ale i další adhezivní molekuly jako LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) či ICAM (intracellular adhesion molecule-1) zajišťující stabilitu komplexu. V případě interakce s inhibiční dráhou PD-1/PD-L1 dochází nejprve k vazbě PD-L1 na PD-1, k připojení k TCR synapsi a k defosforylaci CD3 a ZAP-70 molekuly TCR receptoru podílejících se na TCR signalizaci (obr. 1). Vazbou ligandu na PD-1 dochází současně k fosforylaci tyrozinu na ITSM motivu, čímž se aktivuje tyrozinová fosfatáza SHP-2 (Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2) inhibující PI3K/Akt signální dráhu [6]. Oba výše zmíněné děje aktivují další mechanismy vedoucí k omezení proliferace a k dysfunkci T lymfocytů.

PD-1/PD-L1 dráha stimuluje apoptózu T lymfocytů (obr. 1). Za normálních podmínek kostimulační synapse podporuje expresi antiapoptotického Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large), jehož expresí je ale v nádorovém prostředí potlačena

aktivitou PD-1/PD-L1. Tento proces byl potvrzen již dříve v rámci studií myších a lidských PD-L1<sup>+</sup> buněk, u kterých byla apoptóza T lymfocytů potlačena protilátkou blokující PD-L1 [17,19].

Proliferace T lymfocytů může být dále omezena blokadou buněčného cyklu (obr. 1), kterou navozuje zvýšená aktivita transkripčního faktoru Smad3 (SMAD family member 3) blokujícího buněčný cyklus a degradace Cdc25A (M-phase inducer phosphatase 1), což je pro změnu aktivátor buněčného cyklu. Oba výše zmíněné faktory inhibují proliferaci T lymfocytů a oba jsou indukované PD-1/PD-L1 dráhou [20]. Ras (p21ras) je naopak faktorem stimulačím buněčný cyklus, jehož expresí je vlivem PD-1/PD-L1 signalizace inhibována [20]. PD-1/PD-L1 dále inhibuje signální dráhu PI3K/Akt, která omezuje degradaci transkripčního faktoru FoxO1, který zpětně přispívá k expresi PD-1 a tím podporuje vznik „vyčerpaných“ T lymfocytů [21].

PD-1/PD-L1 signalizace ovlivňuje také metabolismus T lymfocytů, a to inhibicí glykolýzy a metabolismu aminokyselin a současně aktivací dějů vedoucích k oxidaci mastných kyselin [22].

Velmi důležitý je indukující vliv PD-1/PD-L1 dráhy na vývoj Treg, které se obecně podílejí na potlačení imunity tím, že omezují aktivitu efektorových T lymfocytů [23]. Přestože je role Treg v regulačních procesech imunitní odpovědi velmi komplexní a není dosud zcela objasněna, podařilo se inhibici PD-1/PD-L1 dráhy buněk melanomu obnovit cytotoxické vlastnosti T lymfocytů a naopak potlačit tlumivou aktivitu Treg [24]. Stejný pozitivní účinek na vývoj Treg byl také pozorován u dendritických buněk exprimujících PD-1 [25].

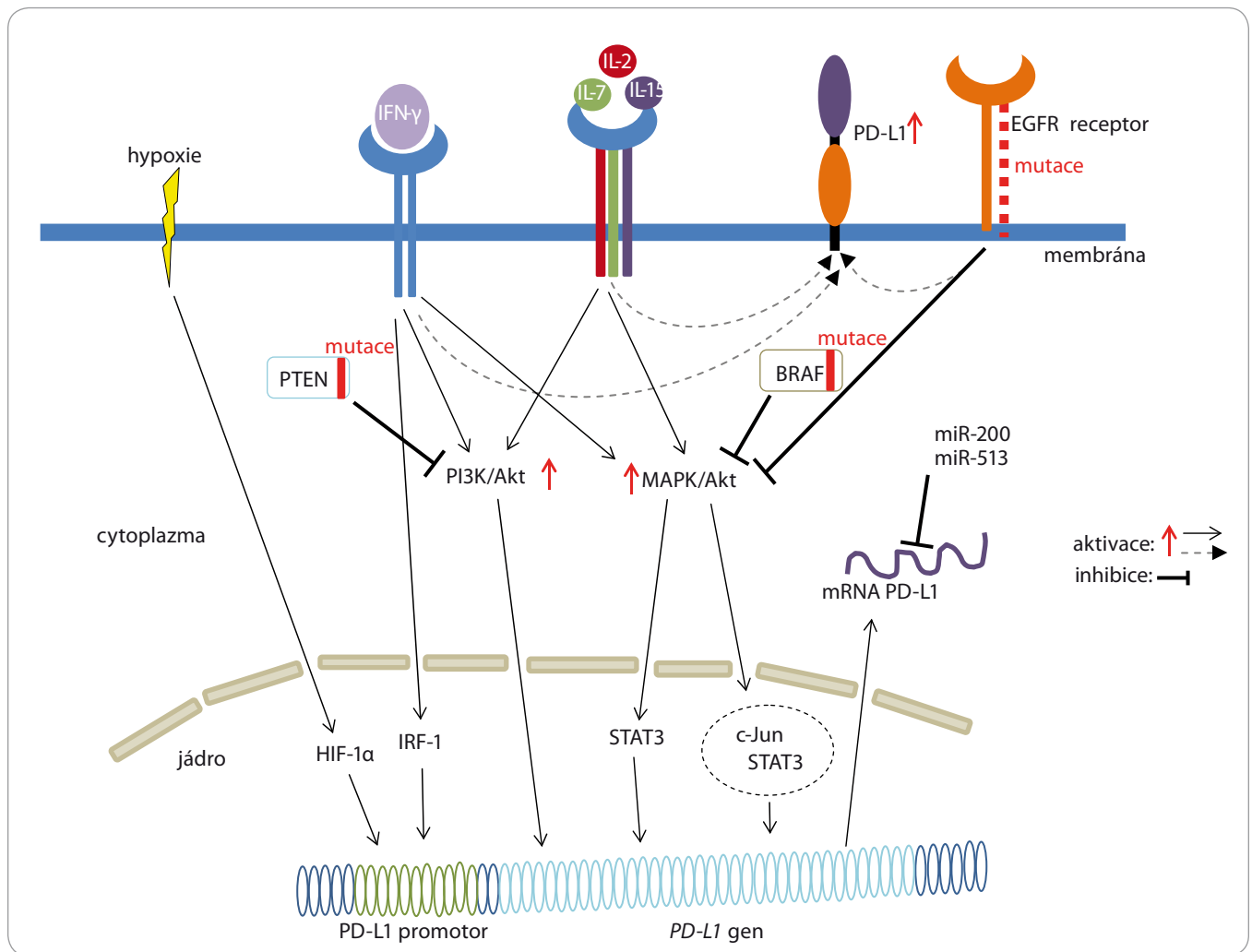
### Mechanismy regulující expresi PD-L1 a PD-L2 v nádorových buňkách

Expres PD-L1 je regulovaná signálními dráhami MAPK (mitogen-activated protein kinase, rodina serin/threonin kináz) a PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3-kinase-Akt) (obr. 2), přičemž především abnormality na úrovni jednotlivých regulačních komponent mohou vést ke karcinogenezi. Podíl obou drah v procesu karcinogeneze se u jednotlivých ná-

dorových onemocnění liší. Jednou z mutací vedoucí k aberantní aktivaci MAPK podílející se na zvýšené proliferaci, ale i rezistenci nádorových buněk, je mutace v genu *BRAF* kódujícím serin/threonin kinázu. Mutace v genu *BRAF* ovlivňují aktivitu transkripčních faktorů c-Jun a STAT3. c-Jun přímo zvyšuje *de novo* expresi PD-L1. Naopak transkripční faktor STAT3 je schopen indukovat expresi PD-L1 u melanomu pouze v kooperaci s c-Jun [26]. Ke zvýšené expresi PD-L1 může také docházet po aktivaci MAPK způsobené mutací v receptoru epidermálního růstového faktoru u nemalobuněčného karcinomu plic (non-small cell lung cancer – NSCLC) [27]. Naopak hyperaktivace PI3K/Akt signální dráhy indukující expresi PD-L1 je často spojená se ztrátou funkce nádorového supresoru PTEN (phosphatase and tensin homologue), jak bylo zjištěno u buněk karcinomu střeva [28] a melanomu [26].

Expres PD-L1 u nádorových buněk byla indukovaná aktivací MAPK po aplikaci paklitaxelu [29] nebo nízké koncentrace cisplatinu [30]. Aktivovaná MAPK a s ní spojená zvýšená expres PD-L1 může přispívat k omezení imunitní reakce a tím podporovat nádorovou rezistenci [29].

Expres PD-L1 je také indukovaná hypoxickým prostředím, které je typické pro nádorové tkáně (obr. 2). Toto prostředí indukuje zvýšenou expresi transkripčního faktoru HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ), který se přímo váže na promotor genu kódujícího PD-L1 a tím reguluje jeho transkripci [31]. Expres PD-L1 je také modulovaná prostřednictvím mikroRNA (miRNA). Jedná se o malé regulační RNA o velikosti 22–24 nukleotidů, které se vážou na částečně komplementární oblasti mRNA a tím řídí inhibici translace, nebo degradaci mRNA. Expres PD-L1 je indukovaná miR-200, která zároveň podporuje metastazování nádoru [32]. Naopak snížení expresi PD-L1 je zprostředkováno miR-513 [33]. Expres PD-L1 je indukovaná IFN- $\gamma$  (interferonem  $\gamma$ ), který je produkován cytotoxickými T lymfocyty. IFN- $\gamma$  uvolněný z aktivovaných T lymfocytů mohou využít nádorové buňky k indukci svého „nádorového“ PD-L1, jehož interakce s PD-1 receptorem na T lymfocytech přispívá k in-



Obr. 2. Mechanizmy regulace exprese PD-L1 v nádorových buňkách.

hibici imunitního systému. Na expresi PD-L1 indukované IFN-γ se podílí transkripční faktor IRF-1 (interferon regulatory factor 1), který se přímo váže na promotor PD-L1 (obr. 2) [34]. Expresi PD-L1 zvyšují také interleukiny signalizací prostřednictvím transkripčního faktoru STAT3 [35].

### PD-1/PD-L1 a protinádorová terapie

V současné době jsou k dispozici monoklonální protilátky blokující receptor PD-1, ale i ligand PD-L1. První klinické experimenty byly zaměřeny na podání anti-PD-1 protilátek pacientům s metastatickým melanomem. První lék schválený pro klinické využití byl pembrolizumab. Jedná se vysoce selektivní humanizovanou IgG4-k protilátku proti receptoru PD-1 využívanou k léčbě pacientů s pokročilým melanomem. Kli-

nický přínos pembrolizumabu byl však zjištěn pouze u omezeného počtu léčených pacientů, navíc vyvolané autoimunitní nežádoucí účinky mohou být závažné až život ohrožující. Další IgG4 monoklonální protilátkou proti PD-1 je nivolumab. Byl schválený k léčbě pokročilého metastazujícího melanomu, renálního karcinomu a NSCLC, u kterého byl pozorován výrazný efekt monoterapie s překvapivě nízkými vedlejšími účinky [36]. V nejbližší době se očekává jeho rozšíření na další diagnózy.

Na ligand PD-L1 cílí protilátky atezolizumab, durvalumab a avelumab. Atezolizumab je testován k terapii uroteliálního karcinomu močového měchýře (urinary bladder cancer – UBC), kde celková míra léčebné odpovědi (overall response rate – ORR) dosahovala 50 % u pacientů s metastazujícím karcinomem [37]. Další

studie probíhají u pacientů s PD-L1 pozitivním lokálně pokročilým metastazujícím NSCLC. Durvalumab je humanizovaná protilátka procházející klinickými studiemi monoterapie u NSCLC, nádorů hlavy a krku a UBC, kde ORR dosáhly 46 % u PD-L1 pozitivních pacientů [38].

Další možností je kombinovaná léčba blokující současně dva kontrolní body PD-1 a CTLA-4 (cytotoxický T lymfocytární antigen 4). Inhibice CTLA-4 se projevuje převážně v časných stádiích aktivity T lymfocytů, inhibice PD-1 ovlivňuje T lymfocyty zejména v efektorové fázi. Rozdílnost v působení těchto protilátek naznačuje jejich komplementaritu a také výsledky kombinované léčby potvrdily její vyšší účinnost oproti monoterapii anti-CTLA-4 i anti-PD-1. Bohužel vyšší však byla i toxicita kombinované léčby [39].

## Závěr

Identifikace kontrolních bodů imunitního systému a zároveň hlubší pochopení vztahu mezi nádorovou progresí a imunitním systémem přináší nové možnosti v léčbě nádorových onemocnění. Léčba založená na využití monoklonálních protilátek ke kontrolním bodům imunitní reakce představuje novou éru moderní imunoterapie. Vyřazení popsaných inhibičních molekul pomocí cílených protilátek napomáhá vyšší aktivitě imunitního systému, neboť blokádu PD-1/PD-L1 je podpořena efektorová složka imunity přímo v nádoru, kde napomáhá přemoci toleranci k nádorové tkáni.

Exprese „nádorového“ PD-L1 je vysoce heterogenní a vychází z různorodosti nádorového mikroprostředí. Inhibiční dráha PD-1/PD-L1 může k prolomení tolerance imunitního systému využít řadu mechanismů, proto se i strategie úniku nádorových buněk před imunitní reakcí liší a proto také dochází k odpovědi na imunoterapii bez ohledu na míru exprese ligandu PD-L1. PD-L1 je dynamický marker, jehož hladina se v čase mění v závislosti na rozvoji imunitní odpovědi a stále není jasné, zda se testování nádorových buněk na přítomnost PD-L1 bude moci přenést do klinické praxe [40]. Jedním z důležitých úkolů blízké budoucnosti je nalezení prediktivních a prognostických markerů, které by napomohly ohodnotit možnosti a sílu imunitního systému a vybrat populaci pacientů vhodných pro tuto léčbu.

## Literatura

1. Šťastný M, Říhová B. Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 4): 4S28–4S37. doi: 10.14735/amko20154S28.
2. Melichar B, Nash MA, Lenzi R et al. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 119(1): 19–27.
3. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439(7077): 682–687.
4. Zhang X, Schwartz JC, Guo X et al. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity* 2004; 20(3): 337–347.
5. Riley JL. PD-1 signaling in primary T-cells. *Immunol Rev* 2009; 229(1): 114–125. doi: 10.1111/j.1600065X.2009.00767.x.

6. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *J Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
7. Francisco LM, Salinas VH, Brown K et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 2009; 206(13): 3015–3029. doi: 10.1084/jem.20090847.
8. Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita DM et al. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ rating regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol* 2006; 176(5): 2808–2816.
9. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE et al. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 2004; 173(2): 945–954.
10. Dong H, Zhu G, Tamada K et al. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* 2004; 20(3): 327–336.
11. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(5): 336–347.
12. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(6): 467–477. doi: 10.1038/nri2326.
13. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007; 27(1): 111–122.
14. Yang J, Riella LV, Chock S et al. The novel costimulatory programmed death ligand 1/B7.1 pathway is functional in inhibiting alloimmune responses in vivo. *J Immunol* 2011; 187(3): 1113–1119. doi: 10.4049/jimmunol.1100056.
15. Xiao Y, Yu S, Zhu B et al. RGMb is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance. *J Exp Med* 2014; 211(5): 943–959. doi: 10.1084/jem.20130790.
16. He J, Hu Y, Hu M et al. Development of PD-1/PD-L1 pathway in tumor immune microenvironment and treatment for non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 2015; 5: 13110. doi: 10.1038/srep13110.
17. Dong H, Strome SE, Salomao DR et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8(8): 793–800.
18. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I et al. PD-1 Blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015; 372(4): 311–319. doi: 10.1056/NEJMoa1411087.
19. Curiel TJ, Wei S, Dong H et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 2003; 9(5): 562–567.
20. Patsoukis N, Sari D, Boussiotis VA. PD-1 inhibits T cell proliferation by upregulating p27 and p15 and suppressing Cdc25A. *Cell Cycle* 2012; 11(23): 4305–4309. doi: 10.4161/cc.22135.
21. Staron MM, Gray SM, Marshall HD et al. The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8+ T cells during chronic infection. *Immunity* 2014; 41(5): 802–814. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.013.
22. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* 2015; 6: 6692. doi: 10.1038/ncomms7692.
23. Amarnath S, Mangus CV, Wang JC et al. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Sci Transl Med* 2011; 3(111): 111ra120. doi: 10.1126/scitranslmed.3003130.
24. Wang W, Lau R, Yu D et al. PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4+ CD25(Hi) regulatory T cells. *Int Immunol* 2009; 21(9): 1065–1077. doi: 10.1093/intimm/dxp072.
25. Rosenblatt J, Glotzbecker B, Mills H et al. PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine. *J Immunother* 2011; 34(5): 409–418. doi: 10.1097/CJI.0b013e31821ca6ce.
26. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A et al. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res* 2013; 19(3): 598–609. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2731.
27. Akbay EA, Koyama S, Carretero J et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov* 2013; 3(12): 1355–1363. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0310.
28. Song M, Chen D, Lu B et al. PTEN loss increases PD-L1 protein expression and affects the correlation between PD-L1 expression and clinical parameters in colorectal cancer. *PLoS One* 2013; 8(6): e65821. doi: 10.1371/journal.pone.0065821.
29. Gong W, Song Q, Lu X et al. Paclitaxel induced B7-H1 expression in cancer cells via the MAPK pathway. *J Chemother* 2011; 23(5): 295–299.
30. Qin X, Liu C, Zhou Y et al. Cisplatin induces programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) over-expression in hepatoma H22 cells via Erk/MAPK signaling pathway. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2010; 56 (Suppl): OL1366–OL1372.
31. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR et al. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res* 2014; 74(3): 665–674. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0992.
32. Chen L, Gibbons DL, Goswami S et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun* 2014; 5: 5241. doi: 10.1038/ncomms6241.
33. Gong AY, Zhou R, Hu G et al. Cryptosporidium parvum induces B7-H1 expression in cholangiocytes by down-regulating microRNA-513. *J Infect Dis* 2010; 201(1): 160–169. doi: 10.1086/648589.
34. Chinai JM, Janakiram M, Chen F et al. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends Pharmacol Sci* 2015; 36(9): 587–595. doi: 10.1016/j.tips.2015.06.005.
35. Wang WB, Yen ML, Liu KJ et al. Interleukin-25 mediates transcriptional control of PD-L1 via STAT3 in multipotent human mesenchymal stromal cells (hMSCs) to suppress Th17 responses. *Stem Cell Reports* 2015; 5(3): 392–404. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.07.013.
36. Brahmer JR, Horn L, Gandhi L et al. Nivolumab (anti-PD-1, BMS-936558, ONO-4538) in patients (pts) with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): survival and clinical activity by subgroup analysis. *J Clin Oncol* 2014; 32 (Suppl): abstr. 8112.
37. Powles T, Eder JP, Fine GD et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014; 515(7528): 558–562. doi: 10.1038/nature13904.
38. Massard C, Gordon MS, Sharma S et al. Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint inhibitor, in patients with advanced urothelial bladder cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34(26): 3119–3129. doi: 10.1200/JCO.2016.67.9761.
39. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzales R et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373(1): 23–34. doi: 10.1056/NEJMoa1504030.
40. Teixidó C, Karachaliou N, González-Cao M et al. Assays for predicting and monitoring responses to lung cancer immunotherapy. *Cancer Biol Med* 2015; 12(2): 87–95. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0019.

# Nemalobuněčný karcinom plic – od imunobiologie k imunoterapii

## Non-Small Cell Lung Cancer – from Immunobiology to Immunotherapy

Bílek O.<sup>1,2</sup>, Bohovicová L.<sup>1</sup>, Demlová R.<sup>2,3</sup>, Poprach A.<sup>1</sup>, Lakomý R.<sup>1</sup>, Zdražilová-Dubská L.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup>Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>3</sup>Oddělení klinických hodnocení, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>4</sup>Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Základem léčby časných nebo lokálně pokročilých stadií nemalobuněčného karcinomu plic (non-small cell lung cancer – NSCLC) je chirurgická resekce, event. radioterapie. V případě inoperabilního či metastatického postižení je léčba paliativní systémová. Celosvětově představuje NSCLC nejčastější příčinu úmrtí v souvislosti s nádorovým onemocněním a dlouhodobě vyvstává potřeba nových terapeutických přístupů. Důkazy o úloze protinádorové aktivity imunitního systému vyvolaly v posledních letech nový zájem o imunoterapii, a to i v léčbě NSCLC. Předmětem vývoje a klinického hodnocení jsou různé strategie vakcinace s cílem posílení imunitní odpovědi a antigen-nespecifická imunomodulace. V této oblasti se dostávají do klinické praxe tzv. checkpoint inhibitory blokující inhibiční imunologické synapse jak cytotoxického T lymfocytárního antigenu 4 (CTLA-4) či proteinu programované buněčné smrti a jeho ligandu (PD-1, PD-L1). Mimo vývoj inovativních léčiv je významným cílem v oblasti imunoterapie solidních malignit identifikace a klinická aplikace efektivních biomarkerů odpovědi na protinádorovou imunoterapii a hodnocení přínosu kombinace imunoterapie s klasickými léčebnými metodami jako chemoterapie, radioterapie a s cílenou léčbou. **Cíl:** Cílem tohoto sdělení je 1. popsat základní imunobiologii NSCLC v kontextu inovativních imunomodulačních terapeutik, 2. popsat strategii a shrnout terapeutické výsledky protinádorových vakcín u NSCLC z klinických hodnocení fáze III, 3. shrnout výsledky terapie checkpoint inhibitory u NSCLC a 4. nastínit aktuální výzvy v oblasti imunoterapie NSCLC.

### Klíčová slova

nemalobuněčný karcinom plic – imunoterapie – protinádorové vakcíny – biomarkery léčebné odpovědi

### Summary

**Background:** The treatment of early or locally advanced stages of non-small cell lung cancer (NSCLC) is based on surgical resection or radiotherapy. Metastatic disease is always incurable, treatment is palliative, systemic based on chemotherapy or target therapy. NSCLC is the most common cause of cancer-related death worldwide, and new therapeutic approaches are needed. Based on the emerging data on the role of immune system in shaping of tumor outbreak and outcome, immunotherapy is currently in the center of interest of cancer research and therapy of solid cancers including NSCLC. Various anti-cancer vaccination approaches and antigen-independent immunomodulatory drugs are being developed and trialed. The most advanced in terms of approaching clinical practice are the so-called checkpoint inhibitors blocking cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) or programmed cell death of the protein and its ligand (PD-1, PD-L1). Beside innovative drug development, the field of cancer immunotherapy focuses on the identification and clinical application of effective biomarkers of clinical efficacy and on the evaluation of combinations of immunotherapeutic drugs or with classical anti-cancer approaches, such as chemotherapy, radiotherapy or with targeted therapy. **Aim:** In this review, we summarize basic principles of immunobiology of NSCLC in the context of innovative immunotherapeutics, strategy and phase III results of anti-cancer vaccines in NSCLC, results of NSCLC treatment with checkpoint inhibitors, and current challenges in immunotherapy of lung cancers.

### Key words

non-small cell lung cancer – immunotherapy – cancer vaccines – drug response biomarkers

Práce byla podpořena grantem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



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

Obdrženo/Submitted: 10. 6. 2016

Přijato/Accepted: 16. 6. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164578>

## Úvod

Incidence karcinomu plic v ČR je 38/100 000 žen a 87/100 000 mužů. Celosvětově představuje nejčastější příčinu úmrtí v souvislosti s nádorovým onemocněním. Základem léčby nemalobuněčného karcinomu (non-small cell lung cancer – NSCLC) stadia I a II je resekční výkon, event. radioterapie, není-li operace indikována. Stadium IIIA je rovněž považováno za operabilní, ale s výrazně horší prognózou nepřesahující 15% 5leté přežití, zvláště při N2 postižení. Adjuvantní chemoterapie je indikována u stadia II a III, přínos u stadia IB zůstává sporný, u stadia IA není žádný. Adjuvantní radioterapie má přínos jen u stadia III s uzlinovým postižením N2. Léčba metastatického bronchogenního karcinomu je paliativní systémová. Analytické možnosti posledních let přinesly zásadní informace o biologii a patofyziologii NSCLC, které svědčí o tom, že molekulární podstata této diagnózy je heterogenní a na základě přítomnosti kauzálních onkogenních mutací/aberrací se rozpadá do několika molekulárně definovaných podjednotek [1]. Jednot-

livé kauzální aberace se pak stávají cílem protinádorové terapie (tab. 1) [2–34]. V závislosti na přítomnosti aktivačních mutací EGFR či translokace EML4-ALK je volena cílená léčba kinázovým inhibito-rem nebo chemoterapií.

## Imunobiologie NSCLC

Počátky hypotézy předpokládající schopnost imunitního systému eliminovat či kontrolovat maligní buňky se datují na přelom 19. a 20. století [35–38]. Existuje řada nástrojů imunitního systému, které mohou atakovat maligní buňky; příkladem je generace efektorových T lymfocytů namířených proti nádorovým antigenům (obr. 1) či cytolytická aktivita NK buněk. Na druhou stranu existuje řada imunosupresivních mechanismů, jimiž může disponovat maligní buňka či spíše nádorové mikroprostředí a které odvrací protinádorovou aktivitu imunitních buněk. Koncept imunitního dohledu nad nádorovým bujením je v dnešní době rozpracován do konceptu nádorové imunoeditace (cancer immunoediting) popisujícího vzájemnou interakci nádorových buněk

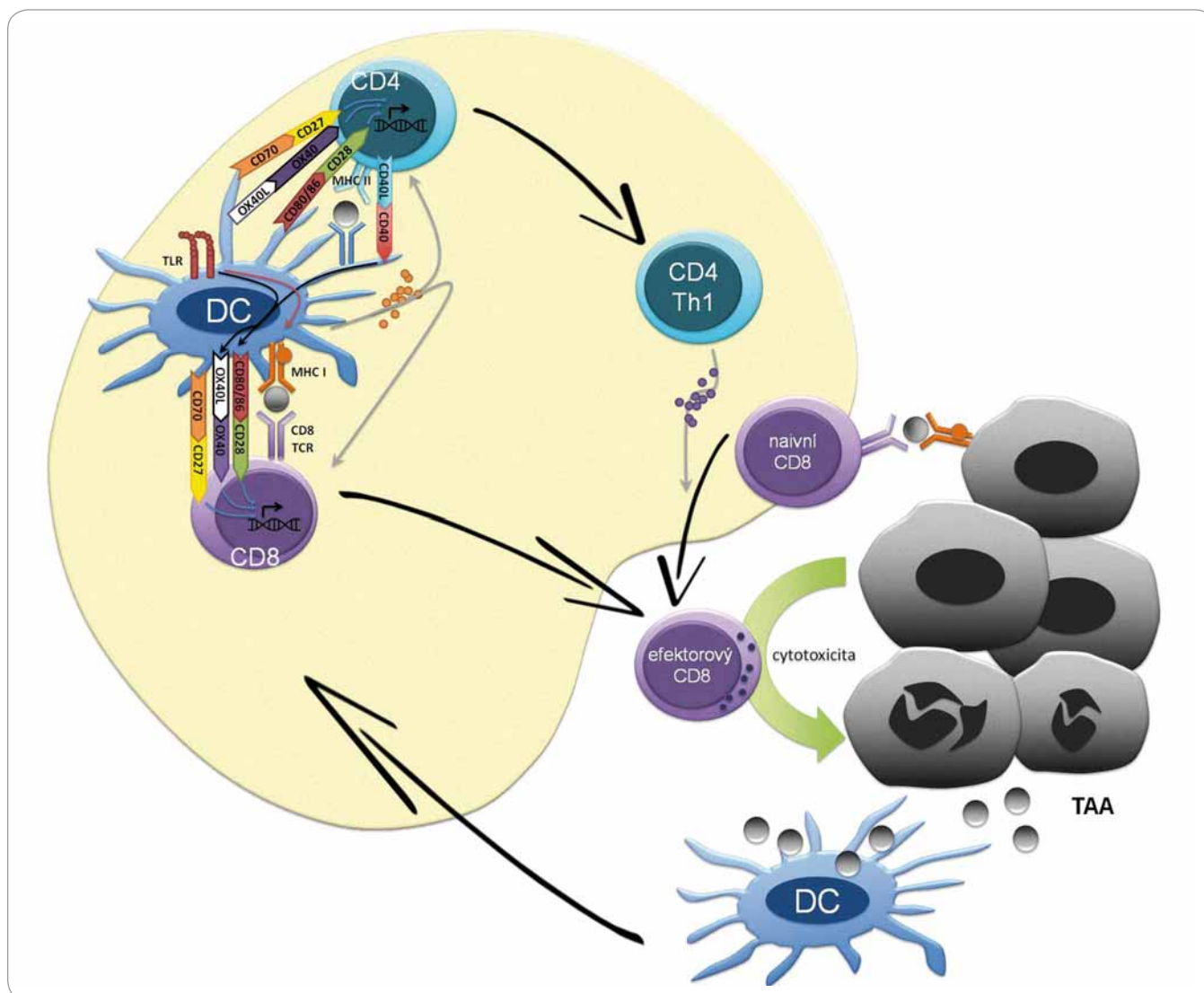
a imunitního systému. Imunoeditace spočívá ve vývoji protinádorových mechanismů imunitního systému, ale také prvků úniku nádorových buněk imunitnímu dohledu. Během imunoeditingu se tedy selektují klony nádorových buněk s nižší imunogenicitou nebo s antigením spektrem, proti němuž nebyla naměřena imunitní reakce. Vzájemná interakce nádorových buněk a imunitního systému může být rozdělena do tří fází (3Es), z anglického elimination, equilibrium, escape. Fáze eliminace je charakterizována převahou imunitního dohledu, tedy protinádorovými mechanismy imunitního systému, které vedou k eliminaci tumoru či efektivní kontrole jeho růstu. V rovnovážné fázi nádorové imunoeditace udržuje imunitní systém maligní tkáň z klinického hlediska v klidovém stadiu (dormancy). Nicméně v nádorové tkáni dochází ke genetickým a epigenetickým změnám a díky konstantnímu selekčnímu tlaku imunitního systému dále progredují klony buněk málo imunogenních, rezistentních k imunitní odpovědi a navozujících imunosupresi, což představuje nádorovou imunoeditaci

Tab. 1. Nejčastější dosud známé aberace u NSCLC jako cíle stávající a potencionální protinádorové terapie.

Cíl = aberace	Frekvence u NSCLC	Cílená léčba	Reference
aktivační mutace receptorů EGFR (delece v exonu 19 a bodová mutace v exonu 21 = L858R)	15–20 % u adenokarcinomů, málo časté u SCC	EGFR tyrozinkinázové inhibitory první generace/gefitinib**, erlotinib**	[2–7]
aktivační mutace receptorů EGFR vč. mutace T790M	mutace T790M vzniká sekundárně při léčbě; EGFR TKI	EGFR tyrozinkinázové inhibitory druhé generace/afatinib**, dacomitinib, neratinib	[8–13]
aktivační mutace EGFR T790M		EGFR tyrozinkinázové inhibitory třetí generace/rociletinib, osimertinib*	[14–18]
ALK-EML4 fúzní protein	5–7 %	inhibitory ALK tyrozinkinázy/ crizotinib**, ceritinib*, alectinib inhibice HSP90/ganetespid	[19–23]
fúze zahrnující ROS1	2 %	crizotinib** brigatinib	[19,24–26]
amplifikace cMET	4 % adeno, 6 % SCC	crizotinib** TK inhibitor/kabozantinib	[27–29]
mutace <i>BRAF</i>	2 % adenomů, 2 % SCC; V600E 1 % adenomů	dabrafenib, trametinib (MEK inhibitor)	[30–32]
mutace <i>KRAS</i>	20–30 % NSCLC	selumetinib (MEK inhibitor)	[33]
fúzní gen <i>RET</i>	1 % adenomů	kabozantinib, vandetanib	[28,34]

\* V současnosti je registrováno pro léčbu NSCLC v rámci EU.

\*\* V současnosti je registrováno pro léčbu NSCLC v rámci EU a současně hrazeno ze zdravotního pojištění v rámci ČR.



**Obr. 1. Základní mechanismus antigen-dependentní stimulace T lymfocytů.**

Na počátku buněčné (i protilátkové) imunitní odpovědi je internalizace antigenu dendritickou případně jinou antigen-přezentující buňkou (APC), následný rozklad antigenu na malé peptidy a prezentace na povrchu buňky v kontextu proteinů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) I. a II. třídy. Dendritické buňky s antigenním peptidem cirkulují do lymfatických uzlin, po zrání umožní aktivaci naivních T lymfocytů na pomocné (Th1, Th2) CD4<sup>+</sup> kostimulační reakci mezi receptory B7.1 (CD80) a B7.2 (CD86) přítomnými na APC a receptorem CD28 přítomným na Th buňkách. Prezentaci antigenu dendritickou buňkou potencuje signalizace z TLR receptorů pro PAMP molekuly, což vede v dendritické buňce k signalizaci stimulující expresi MHC II i kostimulačních molekul CD80/CD86. Signalizace mezi dendritickou buňkou a T lymfocyty je modulována řadou inhibičních a aktivačních signálů. Mezi aktivační signály dendritických buněk patří mimo CD80/CD86 také OX40L či CD70, jež vazbou na příslušné molekuly na T lymfocytech potencují jejich aktivaci, proliferaci a získání efektorových funkcí. Cross-prezentace antigenů dendritickou buňkou je potencionována tzv. licencováním (licensing) CD4<sup>+</sup> Th lymfocytů se stejnou antigenní specifitou. V procesu licencování se uplatňuje např. signalizace z CD40 po interakci s CD40L Th lymfocytů, která vede k up-regulaci kostimulačních molekul na dendritické buňky a toto potažmo k aktivaci efektorových CD8<sup>+</sup> cytotoxických T lymfocytů. Sekrece cytokinů jako IL-2 (Th1 lymfocyty), IL-12 (dendritické buňky), IFN- $\gamma$  (Th1 lymfocyty) usnadňuje aktivaci CD8<sup>+</sup> lymfocytů na cytotoxické T lymfocyty, které získávají a) schopnost rozpoznat nádorové buňky, prostřednictvím komplexu peptid – MHC I a b) efektorové funkce k indukci buněčné smrti maligních buněk. Proteiny z usmrčených maligních buněk jsou opět pohlceny APC buňkami, což navozuje antigen-dependentní stimulaci T lymfocytů.

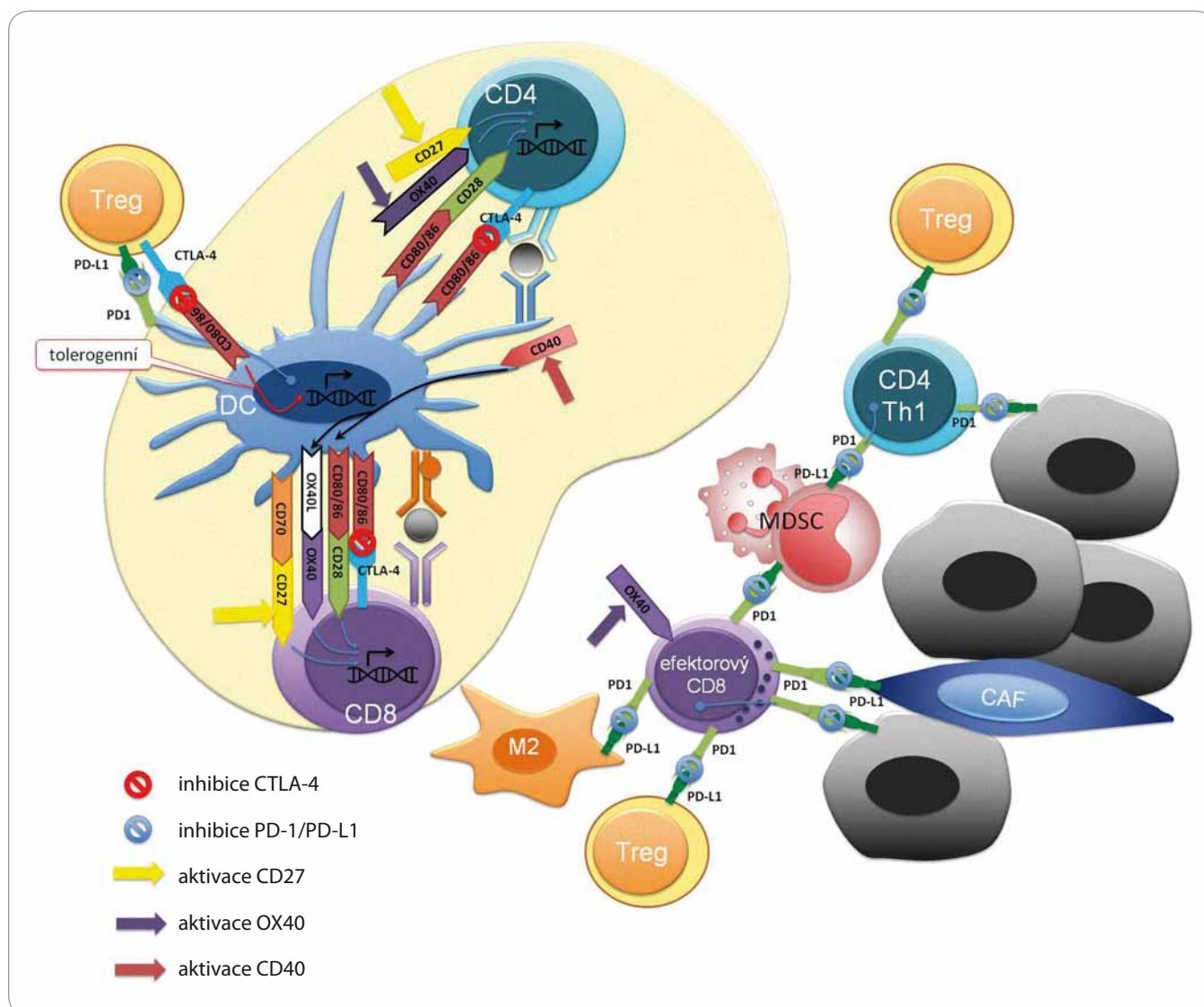
TAA – antigen asociovaný s nádorem, TLR – toll-like receptor, DC – dendritická buňka

v pravém slova smyslu. Jako únik/escape se označuje stav, kdy mechanismy rezistence a navození imunoprese nádoro-

vými buňkami převládnu, vzniká imunosupresivní nádorové mikroprostředí, dochází k růstu nádoru a ten se začíná

klinicky manifestovat. Ke vzniku imunosupresivního nádorového mikroprostředí přispívá celková imunoprese





**Obr. 2. Imunomodulační mechanismy checkpoint inhibitorů v sekundárních lymfatických orgánech a nádorovém mikroprostředí.** CTLA-4 (CD152) je exprimována na T lymfocytech a slouží k supresi imunitní reakce. CTLA-4 kompetuje s aktivací molekulou CD28 o vazbu s kostimulačním komplexem dendritických buněk CD80/CD86. Vazba CTLA-4 a CD80/CD86 vede k navození tolerogenní/immunosupresivní signalizace v dendritických buňkách vedoucí k produkci imunosupresivních působků např. TGF- $\beta$  či IDO. Terapeutické protilátky interferující s vazbou CTLA-4 a CD80/CD86 jsou ipilimumab a tremelimumab. Imunosupresivní systém PD-1/PD-L1 se uplatňuje v potlačení funkce efektorových T lymfocytů v místě zánětu [52]. Povrchová molekula PD-1 (CD279) je exprimována T, B lymfocyty, NK buňkami, dendritickými buňkami, monocyty. Vazba PD-L1 (CD274) či PD-L2 (CD275) na PD-1 vede ke snížení produkce cytokinů a proliferace a navození apoptózy PD-1<sup>+</sup> buněk. PD-L1 je exprimován řadou buněk vč. maligních buněk, fibroblastů asociovaných s nádorem, T regulačních lymfocytů, myeloidních supresorových buněk MDSC či M2 s nádorem asociovaných makrofágů. Terapeuticky se využívá blokáda PD-1/PD-L1 vazby, jak prostřednictvím anti-PD-1 mAb (nivolumab, pembrolizumab) tak anti-PD-L1 protilátek (avelumab, atezolizumab, durvalumab). CD27 je stimulační molekula na povrchu T lymfocytů, jejíž interakce s CD70 APC přispívá k antigen-dependentní klonální expanzi a získání efektorových funkcí T lymfocytů. Předmětem klinického hodnocení aktuálně časných fází je agonista CD27 varlilumab. Signální molekula OX-40 je exprimována na efektorových T lymfocytech. Interakce OX-40 a OX-40L exprimovaného zralými dendritickými buňkami vede k signalizaci důležité pro přežití efektorových T lymfocytů a tvorbu a reaktivaci paměťových T lymfocytů. Na stimulaci OX-40 cílí agonistická protilátka anti-OX-40 či fúzní protein imunoglobulinu a OX-40L; v současnosti v klinických hodnoceních časných fází. CD40 je exprimován na APC a na řadě buněk mimo imunitní systém vč. maligních buněk. Aktivace CD40 stimuluje antigen-přezentační schopnosti dendritických buněk např. prostřednictvím upregulace ko-stimulačních molekul CD80/CD86 poskytujících 2. signál pro aktivaci T lymfocytů. Mimo to anti-CD40 agonistické protilátky potencují protinádorovou aktivitu makrofágů a navozují ADCC maligních buněk exprimujících CD40 (popsáno především u hematologických malignit). Předmětem klinického hodnocení jsou agonistické anti-CD40 protilátky a rekombinantní CD-40L.

Treg – regulační T lymfocyt, CAF – fibroblast asociovaný s malignitou, MDSC – myeloidní supresorová buňka, M2 – M2 polarizovaný makrofág

jedince. Mezi konkrétní imunosupresivní mechanismy nádoru patří exprese PD-L1 na membránách maligních buněk či antigen-prezentujících buněk (APC) navozující supresi efektorových T lymfocytů. K dalším mechanismům rozvoje imunologické tolerance patří snížená exprese antigenů, MHC (major histocompatibility complex) I. třídy a kostimulačních molekul na povrchu nádorových buněk, sekrece cytokinů jako např. TGF- $\beta$ , která interferuje s vyžíváním dendritických buněk a zvyšuje podíl myeloidních supresorových buněk (myeloid-derived suppressor cells – MDSC) a regulačních T lymfocytů (Tregs) v nádorovém stromatu (obr. 2). Konečně může být příčinou imunologické rezistence odolnost nádorových buněk vůči navození apoptózy CD8 lymfocyty.

Pro rozeznání maligní buňky a efektivní protinádorové odpovědi imunitního systému jsou zásadní nádorové neoantigeny, jež jsou produkty translace mutovaných genů, intronových sekvencí, translace z alternativních čtecích rámců, pseudogenů, antisense řetězců, translokovaných genů či genů se začleněným virovým genomem. Množství nádorových antigenů/neoantigenů, které nádorová buňka produkuje, souvisí s množstvím somatických mutací dané buňky a nádory s vysokým podílem somatických mutací jsou více imunogenní v porovnání s nádory s malým množstvím mutací. Obecně nacházíme nejvíce somatických mutací v nádorech, které jsou spojené s fyzikálně, chemicky či biologicky indukovanou kancerogenezi – tj. v maligním melanomu, skvamobuněčném karcinomu plic, bronchogenním adenokarcinomu, karcinomu močového měchýře a malobuněčném karcinomu plic [39]; díky mutagenně podmíněné kancerogenezi jsou tyto typy malignit nejvíce imunodependentní a imunoresponseivní. Z pohledu jednotlivých případů NSCLC je vysoká proporce nádorových neoantigenů spojena s delším celkovým přežitím (overall survival – OS) a naopak heterogenita nádoru ve smyslu přítomnosti více subklonů se specifickým neoantigenním repertoárem je spojena s horším OS [40]. Popsaný mechanismus pravděpodobně souvisí s klinickým pozorováním lepší léčebné

odpovědi na terapii checkpoint inhibice PD-1/PD-L1 u kuřáků s NSCLC oproti nekuřákům s NSCLC [41].

### Imunoterapie NSCLC

Z hlediska přístupu je možné obecně rozdělit imunoterapeutické postupy na pasivní a aktivní a dále na antigen-specifické či nespecifické a výsledkem jsou pak čtyři základní subkategorie imunoterapie, do kterých spadá: 1. aktivní nespecifická imunoterapie humorálními působky, která v případě léčby NSCLC **cytokiny** IL-2 či IFN- $\alpha$  nepřinesla úspěch [42]; 2. pasivní imunoterapie aplikací **monoklonálních protilátek** cílených proti tumorem-asociovaným antigenům s cílem vyvolání protilátkami indukované cytotoxicity (antibody-dependent cellular cytotoxicity – ADCC). Příkladem tohoto typu protinádorové terapie je herceptin (anti-Her2) či cetuximab (anti-EGFR). Nicméně pro léčbu NSCLC není aktuálně žádný přípravek pasivní imunoterapie registrován; 3. **protinádorová vakcinace** stimulující protinádorovou imunitní odpověď CD8<sup>+</sup> cytotoxických lymfocytů a CD4<sup>+</sup> Th lymfocytů proti nádorovým antigenům a tvorbu antigen specifických protilátek. Některé z těchto přístupů jsou ve vývoji a ty, které byly předmětem klinického hodnocení fáze III, jsou popsány v následující podkapitole; 4. modulace imunitního systému bez antigenní specifity, např. stimulace efektorových funkcí T lymfocytů imunomodulačními monoklonálními protilátkami (tzv. **checkpoint inhibitory**), které jsou v současné době největším předmětem zájmu v oblasti imunoterapie nádorů plic.

### Terapeutické protinádorové vakcíny

Jako zdroj antigenů, proti němuž se vyvolá protinádorová imunitní odpověď, mohou sloužit imortalizované nádorové buňky, lyzáty z nádorových buněk, definované nádorové peptidy, které jsou spolu s adjuvans aplikovány onkologickým pacientům. Jako adjuvans jsou používány mikrobiální látky, např. inkompletní Freundovo adjuvans, CpG, cytokiny, jako je GM-CSF, IL-2, IL-12, IFN- $\alpha$  či fosfolipidy a sloučeniny hliníku. Nádorové antigeny mohou být apliko-

vány přímo či spolu s vektorem, který může zároveň poskytovat imunostimulační kontext. Příkladem jsou virové vektory či dendritické buňky. Mechanismus účinku protinádorových vakcín předpokládá, že aplikace nádorových antigenů spolu s adjuvans spustí přirozenou imunitní odpověď, tedy správnou prezentaci antigenů prostřednictvím APC efektorovým T lymfocytům, což způsobí cytolyzu nádorových buněk v primárním ložisku i v metastázách. Vývoj protinádorových vakcín je technologicky náročný a nákladný a následně je pak v klinických hodnoceních zpravidla limitovaný počet pacientů, což prakticky znemožňuje identifikaci prediktivních faktorů a subkohort jedinců, kteří by z léčby protinádorovými vakcínami benefitovali. Nicméně některá léčiva typu protinádorových vakcín se dostala do fáze III klinického zkoušení léčby NSCLC.

### Tecemotide (L-BLP25)

L-BLP25 je lipozomální vakcína proti antigenu MUC1 exprimovanému u většiny nádorů vč. NSCLC a jeho vysoká exprese je spojena s horší prognózou [43]. Vakcína byla zkoušena ve studii START v léčbě pacientů s neresekabilním NSCLC v klinickém stadiu III po léčbě chemoterapií a radioterapií. U celkového souboru pacientů nebylo dosaženo primárního cíle prodloužení OS. U subpopulace pacientů, kteří absolvovali léčbu v konkomitantní podobě a nikoli sekvenčně, však došlo k významnému prodloužení mediánu OS (30,8 vs. 20,6 měsíce; HR 0,78;  $p = 0,016$ ). Analýza nežádoucích účinků nezaznamenala klinicky významné rozdíly mezi léčebnými rameny [44]. Na základě výsledků klinického hodnocení fáze III, které probíhalo v Japonsku (EMR 63325-021) a které neprokázalo efektivitu L-BLP25, byly další zkoušky a vývoj preparátu zastaveny ve prospěch checkpoint inhibitorů.

### TG4010 (MVA-MUC1-IL2)

Další vakcínou zaměřenou proti antigenu MUC1 je TG4010. Jejím základem je atenuovaný virový vektor exprimující sekvenci MUC1 a IL-2 [45]. V randomizované studii fáze IIb/III zahrnující 222 dříve neléčených pacientů klinického stadia IIIB/IV byl hodnocen efekt

přidání vakcíny k paliativní chemoterapii 1. linie v režimu cisplatina/gemcitabin. V rameni s TG4010 došlo k signifikantnímu prodloužení doby přežití bez progresu (progression-free survival – PFS) (5,9 vs. 5,1 měsíce; HR 0,74;  $p = 0,019$ ). V mediánu OS však nebylo dosaženo významného rozdílu. Léčba nebyla spojena se závažnými nežádoucími účinky [46].

#### **Melanom asociovaný antigen (MAGE-A3)**

MAGE-A3 patří do rodiny tumorspecifických antigenů a je exprimován výlučně nádorovými buňkami. Pozitivita je uváděna v 35–55 % případů NSCLC [47]. Hodnocený imunoterapeutický přípravek využívající imunogenicity tohoto antigenu obsahoval rekombinantní protein MAGE-A3 a komplexní adjuvans AS15. Rozsáhlá studie MARGIT (NCT00480025) neprokázala významné prodloužení PFS proti placebo v adjuvantním podání pacientům klinického stadia IB–III (60,5 vs. 57,9 měsíce; HR 0,970;  $p = 0,7572$ ). Tolerance léčby byla dobrá, závažné nežádoucí účinky stupně 3, 4 nebyly zaznamenány [48]. Vzhledem k tomu, že adjuvantní podání této vakcíny nevedlo k prodloužení celkového bezpříznakového přežití (disease-free survival – DFS) v porovnání se standardním chemoterapeutickým režimem v adjuvanci, není tato vakcína dále vyvíjena.

#### **Rekombinantní lidský epidermální růstový faktor (CimaVax-EGF)**

Antigenně specifická vakcína je tvořená rekombinantním EGF fúzovaným s nosným proteinem a adjuvans. Mechanizmem účinku je tvorba anti-EGF protilátek a tím navození blokáce signální dráhy z receptorů EGFR na maligních buňkách. Ve studii fáze III bylo léčeno a sledováno 405 pacientů s NSCLC stadia IIIB/IV pro stanovení benefit maintenance podání CimaVax-EGF po absolvování 1. linie paliativní chemoterapie proti nejlepší podpůrné léčbě. Studie prokázala signifikantní prodloužení mediánu OS oproti nejlepší podpůrné léčbě (12,43 vs. 9,43 měsíce; HR 0,77;  $p = 0,04$ ). Nežádoucí účinky stupně 3 byly hlášeny u 3,6 % pacientů (nejčastěji bolest hlavy, dušnost, eozinofilie), stupně 4 pozorováno

nebyly. Vysoké hladiny EGF před zahájením léčby byly prediktorem léčebné odpovědi [49].

#### **Belagenpumatulcel-L**

Jedná se o celobuněčnou alogenní vakcínu připravovanou transfekcí čtyř různých buněčných linií odvozených od NSCLC antisense TGF- $\beta$ 2 transgenem a ozářením před aplikací. Mechanismus účinku je navození imunitní odpovědi proti nádorovým antigenům a potlačení imunosupresivní aktivity nádorového mikroprostředí. Vakcína byla testována v rámci maintenance aplikace pacientům v klinickém stadiu IIIB/IV, u kterých nebyla zaznamenána progresivní onemocnění po absolvování 1. linie paliativní chemoterapie na bázi platiny (NCT00676507). V celkovém souboru nebylo prokázáno prodloužení mediánu OS (20,3 vs. 17,8 měsíce; HR 0,94;  $p = 0,594$ ), ani prodloužení PFS. Benefit v mediánu OS byl pouze u pacientů s jinou histologií než adenokarcinom a u těch, kteří absolvovali radioterapii (28,4 vs. 16,0 měsíce; HR 0,61;  $p = 0,032$ ). Vakcína byla dobře tolerována, závažné nežádoucí účinky nebyly hlášeny [50].

#### **Racotumomab**

Racotumomab je protilátková vakcína, jejímž cílovým antigenem jsou N-glycolilneuraminovou kyselinu (NeuGc) obsahující gangliosidy. Tyto gliolipidy nejsou přítomny na cytoplazmatické membráně normálních lidských buněk, byly však zachyceny u některých typů nádorů vč. NSCLC. Racotumomab je myší protilátka proti NeuGc obsahujícím gangliosidům, která vyvolává tvorbu IgG a IgM protilátek proti těmto epitopům. V rámci testování na myších modelech byla zaznamenána schopnost vyvolání vysoké protinádorové odpovědi. Aktuálně probíhá randomizovaná studie fáze III k ověření léčebného efektu u pacientů ve stadiu pokročilého neresekabilního nebo metastatického NSCLC, u kterých byl zaznamenán minimálně efekt stabilizace onemocnění po absolvování 1. linie paliativní léčby [51].

#### **Nespecifická imunoterapie**

Hlavním předmětem zájmu vývoje protinádorové imunoterapie jsou antigen-independentní modulatory imunitního

systemu, jejichž mechanismus působení je založen na eliminaci imunosupresivních mechanismů nádoru a/nebo nespecifické stimulaci imunitní odpovědi (obr. 2) [52]. Nejvíce prozkoumaný a popsáný je mechanismus působení a klinické výsledky inhibice CTLA-4 a interakce PD-1/PD-L1.

#### **Anti-CTLA-4 protilátky Ipilimumab**

Ipilimumab je humanizovaná IgG1 monoklonální protilátka. V současné době je součástí standardní léčby např. maligního melanomu, kde jsou zaznamenány případy dlouhodobých léčebných odpovědí. Efekt je zkoušen i v rámci jiných diagnóz vč. NSCLC. Výsledky studie fáze II srovnávající efekt přidání ipilimumabu k chemoterapii v kombinaci karboplatina/paclitaxel pacientům se skvamózním NSCLC klinického stadia III/IV prokázaly prodloužení PFS ve skupině s ipilimumabem, a to v případě sekvenčního podání chemoterapie a imunoterapie. Prodloužení mediánu OS nebylo statisticky signifikantní (12,2 vs. 8,3 měsíce; HR 0,87;  $p = 0,23$ ) [53]. V současné době probíhají studie fáze III hodnotící efekt 1. přidání ipilimumabu k chemoterapii u pacientů s pokročilým skvamózním NSCLC (NCT02279732) a 2. hodnotící efekt přidání ipilimumabu do kombinace s anti-PD-1 protilátkou nivolumabem v 1. linii léčby NSCLC (CheckMate 227, NCT02477826).

Četnost vedlejších účinků ipilimumabu se v registrační studii pro léčbu maligního melanomu s dávkou 3 mg/kg pohybuje kolem 80–90 %. Ve většině případů šlo o mírnou až střední toxicitu (stupeň 1, 2). Závažná (stupeň 3) a život ohrožující toxicita (stupeň 4) byla zaznamenána u cca 20–25 % pacientů. K vedlejším účinkům může dojít již v průběhu infuze nebo po ní. Více obávané jsou však imunitně podmíněné vedlejší účinky (immune related adverse events – ir-AE), které jsou nejčastější a rostou s dávkou. Při dávce 3 mg/kg se objevují až u 60 % pacientů, vážná ir-AE toxicita stupně 3 a 4 byla zaznamenána u 10–15 % pacientů. K nejčastějším ir-AEs patří kožní toxicita (vyrážka, svědění kůže), enterokolitida a průjemy, endokrinopatie (hypofyzitida, tyreoidi-

tida) a elevace jaterních testů. Imunitní systém však může napadnout jakýkoliv orgán v těle (srdce, plíce, ledviny, nervový systém, oči, hematopoetický systém a další). Je třeba důsledný management toxicity léčby [54].

#### **Tremelimumab**

Tremelimumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti CTLA-4. Ve studii fáze II [55] nebyl prokázán efekt maintenance aplikace proti nejlepší podpůrné péči pacientům s metastatickým NSCLC, u kterých nebyla zaznamenána progresse onemocnění po 1. linii paliativní chemoterapie (NCT02000947). Probíhá studie fáze III ověřující přínos kombinace tremelimumabu s anti-PD-L1 protilátkou darvalumab (MEDI4736) vs. standardní chemoterapie (NCT02352948).

#### **Anti-PD-1, anti-PD-L1 protilátky Nivolumab**

Nivolumab je plně humanizovaná monoklonální IgG4 anti-PD-1 protilátka standardně používaná např. v léčbě maligního melanomu (NCT01721772) [56]. Studie fáze III srovnávaly benefit podání nivolumabu pacientům s metastatickým NSCLC ve 2. linii paliativní léčby proti standardní chemoterapii docetaxelem. Studie CheckMate 017 týkající se skvamózního karcinomu plic prokázala statisticky významné prodloužení PFS a zejména mediánu OS (9,2 vs. 6,0 měsíce; HR 0,59;  $p = 0,0004$ ). Tato studie neprokázala korelaci mezi přítomností PD-L1 na nádorových buňkách a léčebnou odpovědí (NCT01642004). U adenokarcinomu byl rovněž prokázán léčebný benefit nivolumabu studií fáze III CheckMate 057 (NCT01673867), která srovnávala monoterapii nivolumabem v dávce 3 mg/m<sup>2</sup> každé dva týdny s podáním docetaxelu 75 mg/m<sup>2</sup> jednou za tři týdny. Monoterapie nivolumabem vedla k prodloužení mediánu OS (12,2 vs. 9,4 měsíce; HR 0,73;  $p = 0,002$ ), rozdíl v PFS nebyly v celém souboru statisticky významné (medián PFS 2,3 vs. 4,2 měsíce; HR 0,92;  $p = 0,393$ ). U této studie však byla zjevná signifikantní závislost mezi procentuálně vyjádřeným zastoupením PD-L1 na buněčné membráně nádorové buňky a mírou buněčné odpovědi. Na základě údajů o mož-

ném zlepšení léčebné odpovědi kombinací anti-CTLA-4 a anti-PD-1 protilátek probíhá studie CheckMate 227 hodnotící efekt v 1. linii paliativní léčby NSCLC (NCT02477826).

Toxicita anti-PD-1 a anti-PD-L1 protilátek je obecně menší než u ipilimumabu. Vážná kožní toxicita stupně 3 a 4 se vyskytuje výjimečně (2 %). Také průjem stupně 3 a 4 je málo častý (1–2 %), podobně jako hepatotoxicita (do 3 %) a vážné endokrinopatie (< 1 %). Na rozdíl od ipilimumabu se ale častěji po anti-PD-1 protilátkách objevuje pneumonitida (< 5 %). Podstatně vyšší četnost ir-AEs byla popsána ve studiích s kombinací anti-PD-1 a anti-CTLA-4 protilátkou (nivolumab + ipilimumab). Zde se výskyt vážných ir-AEs stupně 3 a 4 pohyboval kolem 50 %, s významným zastoupením gastrointestinální toxicity (15 %) a hepatotoxicity (19 %) [54,57].

#### **Pembrolizumab**

Jedná se opět o anti-PD-1 protilátku, jejíž účinnost u NSCLC byla hodnocena ve studii fáze III Keynote 010 (NCT01905657). Do studie byli zařazováni pacienti po selhání předchozí 1. linie s platinou a současně s prokázanou expresí PD-L1 min. v 1 % nádorových buněk s randomizací do jednoho ze tří léčebných ramen, pembrolizumab 2 mg/kg, 10 mg/kg nebo standardní rameno s docetaxelem 75 mg/m<sup>2</sup> každé tři týdny. OS bylo signifikantně delší v obou ramenech s pembrolizumabem (dávka 2 mg/kg medián OS 12,7 vs. 8,5 měsíce; HR 0,71;  $p = 0,0008$ , resp. 10 mg/kg HR 0,61;  $p < 0,0001$ ). Přítomnost PD-L1 ligandu na nádorových buňkách měla významný vliv na míru léčebné odpovědi s dopadem i na prodloužení OS [58]. U pacientů s přítomností PD-L1 vyšší než v 50 % nádorových buněk byl medián OS 14,9 vs. 8,2 měsíce; HR 0,54;  $p = 0,0002$  v dávce 2 mg/kg a 17,3 vs. 8,2 měsíce; HR 0,5;  $p < 0,0001$  při dávkování 10 mg/kg. FDA udělila pro tuto indikaci v říjnu 2015 na základě publikovaných výsledků tzv. accelerated approval, na evropské úrovni EMA je pembrolizumab v procesu posuzování.

#### **Avelumab**

Avelumab je anti-PD-L1 protilátka, ovlivňuje tedy nádorovou buňku a nikoli

přímo lymfocyt. Aktuálně probíhají studie Javelin Lung 100 (NCT02576574) a Javelin Lung 200 (NCT02395172) fáze III hodnotící efekt u pacientů s metastatickým NSCLC v 1. a 2. linii léčby. V 1. linii léčby je avelumab v dávce 10 mg/kg jednou za dva týdny srovnáván se standardní chemoterapií na bázi platiny, primárním cílem je hodnocení PFS a sekundárně i celkového přežití. Klinická studie Javelin Lung 200 ve 2. linii léčby hodnotí podání avelumabu oproti standardnímu podání docetaxelu v dávce 75 mg/m<sup>2</sup> jednou za tři týdny, primárním cílem je hodnocení OS a první výsledky jsou očekávány ke konci roku 2017. U obou studií je současně prospektivně hodnocena přítomnost PD-L1 v nádoru.

#### **Atezolizumab**

Jedná se o anti-PD-L1 protilátku zkoušenou u řady onkologických diagnóz. Recentně publikované výsledky studie POPLAR fáze II prokazují prodloužení OS proti docetaxelu v 2. linii paliativní léčby (OS 12,6 vs. 9,7 měsíce; HR 0,73;  $p = 0,004$ ). Výsledky byly v korelaci s mírou exprese PD-L1 nádorovou buňkou [59]. Obdobné výsledky přinesla i další studie BIRCH fáze II, kde byla pozorována odpověď na léčbu u 27 % pacientů s vyšší expresí PD-L1 [60]. V současnosti probíhají studie fáze III hodnotící přínos atezolizumabu v 1. linii paliativní léčby ve srovnání se standardní chemoterapií (NCT02409342, NCT02409355), zde jsou první výsledky očekávány v roce 2019.

### **Výzvy v imunoterapii NSCLC**

Nádorová imunologie a imunoterapie maligních onemocnění jsou v současné době v popředí zájmu onkologického výzkumu a podstatné místo zaujímají i v klinické praxi. Z hlediska klasifikace a managementu léčby časnějších stadií maligních onemocnění je významným počinem posledních let koncept imunoscóre/immunoscore, který je nejvíce rozpracován a aktuálně validován u kolořektálního karcinomu [61], nicméně je předmětem klinického výzkumu také u jednotlivých stadií NSCLC [62].

Vzhledem k tomu, že imunoterapie současnosti vstupuje především do

Tab. 2. Aktuálně probíhající studie fáze III/IV s checkpoint inhibitory u NSCLC.

Studie	Linie léčby	Číslo studie
nivolumab ± ipilimumab vs. nivolumab/cisplatina/pemetrexed	paliativní, 1. linie	NCT02477826
nivolumab – safety trial	paliativní, min. 2. linie	NCT02066636
nivolumab vs. dispenzarizace	adjuvantní	NCT02595944
pembrolizumab vs. placebo po resekci	adjuvantní	NCT02504372
pembrolizumab vs. chemoterapie na bázi platiny, PD-L1 pozitivní	paliativní, 1. linie	NCT02220894
avelumab vs. standardní chemoterapie (Javelin Lung 100)	paliativní, 1. linie	NCT02576574
avelumab vs. docetaxel (Javelin Lung 200)	paliativní, 2. linie	NCT02395172
atezolizumab vs. gemcitabin/cisplatina nebo karboplatina	paliativní, 1. linie	NCT02409355
atezolizumab vs. cisplatin nebo karboplatina + pemetrexed	paliativní, 1. linie	NCT02409342
atezolizumab vs. docetaxel	paliativní, 2. linie	NCT02008227
atezolizumab vs. nejlepší podpůrná péče	adjuvantní	NCT02486718
durvalumab ± tremelimumab vs. chemoterapie na bázi platiny	paliativní, 1. linie	NCT02453282
durvalumab vs. placebo	adjuvantní	NCT02273375
durvalumab ± tremelimumab vs. standardní chemoterapie	paliativní, min. 3. linie	NCT02352948

anti-CTLA-4 – ipilimumab, tremelimumab, anti-PD-1 – nivolumab, pembrolizumab, anti-PD-L1 – avelumab, atezolizumab, durvalumab

léčby pokročilých nádorových onemocnění, jejichž charakteristikou je repertoár imunosupresivních vlastností prostředí nádoru, je nadějí pro pacienty s pokročilými onemocněními identifikace opodstatněných kombinací imunoterapie (stávající protilátky, nové protilátky, vakcíny) se standardními léčebnými modalitami (chemoterapie, radioterapie, cílená léčba), kde se jistě uplatní i „drug repositioning“. Kombinací léčebných metod by mohlo být dosaženo komplementárního, či dokonce synergického působení [63]. Je však nutno zvažovat míru toxicity léčby, např. v případě maligního melanomu sice přinesla kombinace dakarbazinu s ipilimumabem (10 mg/kg) prodloužení OS z 9,1 na 11,2 měsíce, ale závažné nežádoucí účinky stupně 3, 4 byly zaznamenány v 56 % [64]. Při hledání konkomitantních a sekvenčních protinádorových postupů je racionální kombinovat imunoterapii především s terapeutickými postupy dosahujícími léčebného efektu nejen na základě cytotoxických účinků, ale vyvolávajícími i tzv. imunogenní buněčnou smrt, kdy dochází ke stimulaci imunitního systému proti antigenům uvolněným z imunogenně likvidované maligní

buňky. Imunogenní buněčnou smrt navozují některá chemoterapeutika, termické ablace či radioterapie. Klinicky pozorovatelnou konsekvencí popsaného způsobu buněčné smrti je abskopální efekt radioterapie vedoucí k regresi nádorového onemocnění i mimo ozařované pole a kombinace radioterapie s checkpoint inhibitory by mohla vést k podpoře tohoto efektu [65]. V souvislosti s kombinací imunoterapie s cílenou léčbou je zmiňována např. podpora vyžrávání dendritických buněk či aktivity a diferenciací T lymfocytů, přičemž četné studie již probíhají [66]. V rámci kombinací se testuje i současné podání checkpoint inhibitorů (tab. 2), jejichž relevance pro klinickou praxi je vzhledem k toxicitě a nákladovosti bez znalosti prediktivního biomarkeru limitovaná.

Přestože jsou dosavadní data získaná z klinických hodnocení imunoterapie checkpoint inhibitory povzbudivá ve smyslu dosažení déle trvajících odpovědí u metastatických onemocnění (především u maligního melanomu), je proporce léčených pacientů, u kterých je dosaženo významné dlouhotrvající klinické odpovědi, malá [67]. Podstatnou výzvou je tedy identifikace prediktiv-

ních biomarkerů jednotlivých modalit protinádorové imunoterapie. V případě inhibice interakce PD-1/PD-L1 se jako prediktivní biomarker nabízí, v analogii na prediktivní vlastnosti míry exprese Her-2 buňkami karcinomu prsu, kvantifikace míry exprese PD-L1 v maligní tkáni. Ve studiích jako CheckMate 017 hodnotící efekt nivolumabu u skvamózního NSCLC nebyla úloha exprese PD-L1 v maligní tkáni jako prediktoru léčby potvrzena; naopak v případě bronchogenního adenokarcinomu korelovala míra exprese ligandu PD-L1 s mírou léčebného efektu (např. CheckMate 057). Mimo roztržitost projektů hodnotících expresi PD-L1 s ohledem na použitý detekční systém (typ diagnostických protilátek, hodnota cut-off, hodnocení exprese na maligních buňkách vs. nádorovém stroma) je podstatným úskalím v ustanovení míry PD-L1 pozitivivity jako prediktivního biomarkeru inducibilní exprese tohoto ligandu, jež nemusí být pouze reflexí imunosupresivních vlastností nádorových buněk, ale může být naopak navozena parakrinní stimulací T lymfocytárního infiltrátu [68].

Na příkladu maligního melanomu se ukazuje, že prediktorem léčby check-

point inhibitory mohou být i cirkulující parametry hodnotitelné z periferní krve, kde jsou významnými biomarkery – mimo hladinu LDH (laktátdehydrogenázy) spojenou s aktivitou onemocnění – také parametry reflektující míru imunoprese resp. efektorových funkcí imunitního systému, jako je proporce lymfocytů, absolutní počet eozinofilů a monocytů, ale také zastoupení Tregs a MDSC [69,70]. Je racionální předpokládat, že mimo baselinové hladiny parametrů imunitního systému poskytuje určitou informaci o úspěšnosti léčby také dynamika vývoje jednotlivých imunitních parametrů. Tímto způsobem je možné sledovat např. dynamiku efektorových T lymfocytů či jiných leukocytárních subpopulací; při znalosti konkrétního nádorového antigenu (např. v případě peptidových vakcín) je možno sledovat dynamiku T lymfocytární frakce se specificitou k danému antigenu.

Hledání vhodných prediktorů odpovědí na léčbu checkpoint inhibitory je významné nejen z výzkumného hlediska a z hlediska reality klinické praxe s ohledem na optimalizaci efektivity při minimalizaci toxicity léčby, ale rovněž může zásadně přispívat k finanční udržitelnosti těchto terapeutických postupů. Dnes je již více než zřejmé, že pravděpodobně žádný zdravotnický systém, tedy nejen v ČR, nebude schopen absorbovat zvyšující se finanční zátěž spojenou s cílenou protinádorovou terapií vč. nákladné moderní imunoterapie. Pokud je během výzkumu v časných fázích zřejmé, že se bude jednat o inovativní léčivo s významným budoucím finančním dopadem do rozpočtu, a rovněž bude zřejmé, že profitovat z nákladné léčby bude jen určité procento pacientů, je nezbytné nutné, aby klinické studie pozdější fáze III byly designovány již souběžně s vývojem a ověřením diagnostické metody pro stanovení vhodného biomarkeru. Tím by došlo k ideálnímu stavu, kdy případná registrace léčiva bude souběžně doprovázena i „registrací“ diagnostické metody tak, jak je již delší dobu v FDA guidelines [71,72]. Jedním z příkladů takto FDA chválených léčiv s diagnostickým kitem může být olaparib a BRACAnalysis CDx™ nebo crizotinib a VENTANA ALK (D5F3) CDx Assay™ [73]. Přestože ne-

jsou na evropské úrovni zatím tyto validované prediktivní testy při registraci léčiv Evropskou lékovou agenturou vyžadovány, je diskuze na toto téma evropskými regulátory vedena a pravděpodobně se v blízké době stane realitou. Tento způsob regulace inovativních a cílených protinádorových terapeutik patří k těm smysluplnějším a má reálný potenciál povzbudit farmaceutické firmy, aby intenzivněji implementovaly hledání vhodných biomarkerů již během klinického výzkumu nového léčiva, nikoliv až následně retrospektivně při hledání „vhodných podskupin“ pacientů v případě, kdy se neprokáže superiority efektu hodnoceného léčivého přípravku v celé kohortě testovaných subjektů, případně po registraci léčiva, kdy je identifikace a implementace prediktorů léčby v rozporu s komerčními zájmy držitelů registrací.

#### Literatura

- Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(8): 535–546. doi: 10.1038/nrc3775.
- Lee DH, Park K, Kim JH et al. Randomized phase III trial of gefitinib versus docetaxel in non-small cell lung cancer patients who have previously received platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16(4): 1307–1314. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1903.
- Han JY, Park K, Kim SW et al. First-SIGNAL: first-line single-agent iressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 2012; 30(10): 1122–1128. doi: 10.1200/JCO.2011.36.8456.
- Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 121–128. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361(10): 947–957. doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
- Zhou C, Wu YL, Chen G et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011; 12(8): 735–742. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70184-X.
- Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(3): 239–246. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
- Katakami N, Atagi S, Goto K et al. LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J Clin Oncol* 2013; 31(27): 3335–3341. doi: 10.1200/JCO.2012.45.0981.
- Janjigian YY, Smit EF, Groen HJ et al. Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-

resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discov* 2014; 4(9): 1036–1045. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0326.

- Sequist LV, Besse B, Lynch TJ et al. Neratinib, an irreversible pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor: results of a phase II trial in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(18): 3076–3083. doi: 10.1200/JCO.2009.27.9414.
- Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res* 2011; 17(6): 1616–1622. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2692.
- Reckamp KL, Giaccone G, Camidge DR et al. A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer* 2014; 120(8): 1145–1154. doi: 10.1002/cncr.28561.
- Lee JS, Hirsh V, Park K et al. Vandetanib versus placebo in patients with advanced non-small-cell lung cancer after prior therapy with an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor: a randomized, double-blind phase III trial (ZEPHYR). *J Clin Oncol* 2012; 30(10): 1114–1121. doi: 10.1200/JCO.2011.36.1709.
- Sequist LV, Soria JC, Camidge DR. Update to rociletinib data with the RECIST confirmed response rate. *N Engl J Med* 2016; 374(23): 2296–2297. doi: 10.1056/NEJMc1602688.
- Sequist LV, Soria JC, Goldman JW et al. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(18): 1700–1709. doi: 10.1056/NEJMoa1413654.
- Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 2014; 4(9): 1046–1061. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0337.
- Yyer A. Osimertinib (AZD9291)-a science-driven, collaborative approach to rapid drug design and development. *Ann Oncol* 2016; 27(6): 1165–1170. doi: 10.1093/annonc/mdw129.
- Janne PA, Yang JC, Kim DW et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(18): 1689–1699. doi: 10.1056/NEJMoa1411817.
- Costa DB, Shaw AT, Ou SH et al. Clinical experience with crizotinib in patients with advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer and brain metastases. *J Clin Oncol* 2015; 33(17): 1881–1888. doi: 10.1200/JCO.2014.59.0539.
- Ou SH, Janne PA, Bartlett CH et al. Clinical benefit of continuing ALK inhibition with crizotinib beyond initial disease progression in patients with advanced ALK-positive NSCLC. *Ann Oncol* 2014; 25(2): 415–422. doi: 10.1093/annonc/mdt572.
- Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol* 2014; 15(10): 1119–1128. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70362-6.
- Li S, Qi X, Huang Y et al. Ceritinib (LDK378): a potent alternative to crizotinib for ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2015; 16(2): 86–91. doi: 10.1016/j.clcl.2014.09.011.
- Gainor JF, Tan DS, De Pas T et al. Progression-free and overall survival in ALK-positive NSCLC patients treated with sequential crizotinib and ceritinib. *Clinical Cancer Res* 2015; 21(12): 2745–2752. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3009.
- Bergethon K, Shaw AT, Ou SH et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012; 30(8): 863–870. doi: 10.1200/JCO.2011.35.6345.

25. Rosell R, Gettinger SN, Bazhenova LA et al. 1330: Brigatinib efficacy and safety in patients (Pts) with anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive (ALK+) non-small cell lung cancer (NSCLC) in a phase 1/2 trial. *J Thorac Oncol* 2016; 11 (4 Suppl): S114. doi: 10.1016/S1556-0864(16)30245-3.
26. Chin LP, Soo RA, Soong R et al. Targeting ROS1 with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a promising therapeutic strategy for a newly defined molecular subset of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012; 7(11): 1625–1630. doi: 10.1097/JTO.0b013e31826baf83.
27. Zou HY, Li Q, Lee JH et al. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 2007; 67(9): 4408–4417.
28. Drilon A, Wang L, Hasanovic A et al. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov* 2013; 3(6): 630–635.
29. Padda S, Neal JW, Wakelee HA. MET inhibitors in combination with other therapies in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2012; 1(4): 238–253. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2012.10.08.
30. Dabrafenib active in rare NSCLC subtype. *Cancer Discov* 2016; 6(7). OF4. doi: 10.1158/2159-8290.CD-NB2016-062.
31. Blumenschein GR Jr, Smit EF, Planchard D et al. A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) dagger. *Ann Oncol* 2015; 26(5): 894–901. doi: 10.1093/annonc/mdv072.
32. Planchard D, Kim TM, Mazieres J et al. Dabrafenib in patients with BRAF(V600E)-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(5): 642–650. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00077-2.
33. Janne PA, Shaw AT, Pereira JR et al. Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013; 14(1): 38–47. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70489-8.
34. Heymach JV, Lockwood SJ, Herbst RS et al. EGFR biomarkers predict benefit from vandetanib in combination with docetaxel in a randomized phase III study of second-line treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014; 25(10): 1941–1948. doi: 10.1093/annonc/mdu269.
35. Coley WB. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 1891; 14(3): 199–220.
36. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Clin Orthop Relat Res* 1893; 1991(262): 3–11.
37. Ehrlich P. The partial function of cells. (Nobel Prize address given on 11 December 1908 at Stockholm). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1954; 5(2): 67–86.
38. Ehrlich P. Address in pathology, on chemotherapy: delivered before the Seventeenth International Congress of Medicine. *Br Med J* 1913; 2(2746): 353–359.
39. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; 500(7463): 415–421. doi: 10.1038/nature12477.
40. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 2016; 351(6280): 1463–1469. doi: 10.1126/science.aaf1490.
41. Gettinger SN, Horn L, Gandhi L et al. Overall survival and long-term safety of nivolumab (anti-programmed death 1 antibody, BMS-936558, ONO-4538) in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33(18): 2004–2012. doi: 10.1200/JCO.2014.58.3708.
42. Jansen RL, Slingerland R, Goey SH et al. Interleukin-2 and interferon-alpha in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Immunother* 1992; 12(1): 70–73.
43. Agrawal B, Gendler SJ, Longenecker BM. The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol Med Today* 1998; 4(9): 397–403.
44. DeGregorio M, Soe L, Wolf M. Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small cell lung cancer (START): a randomized, double-blind, phase III trial. *J Thorac Dis* 2014; 6(6): 571–573. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.05.15.
45. Rochlitz C, Figlin R, Squiban P et al. Phase I immunotherapy with a modified vaccinia virus (MVA) expressing human MUC1 as antigen-specific immunotherapy in patients with MUC1-positive advanced cancer. *J Gene Med* 2003; 5(8): 690–699.
46. Quoix E, Lena H, Losonczy G et al. TG4010 immunotherapy and first-line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer (TIME): results from the phase 2b part of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(2): 212–223. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00483-0.
47. Jang SJ, Soria JC, Wang L et al. Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7959–7963.
48. Vansteenkiste JF, Cho BC, Vanakasa T et al. Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(6): 822–835. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00099-1.
49. Rodriguez PC, Popa X, Martinez O et al. A Phase III clinical trial of the epidermal growth factor vaccine CIMAvax-EGF as switch maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2016; 22(15): 3782–3790. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0855.
50. Giaccone G, Bazhenova LA, Nemunaitis J et al. A phase III study of belagenpumatucel-L, an allogeneic tumour cell vaccine, as maintenance therapy for non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2015; 51(16): 2321–2329. doi: 10.1016/j.ejca.2015.07.035.
51. Alfonso S, Valdes-Zayas A, Santiesteban ER et al. A randomized, multicenter, placebo-controlled clinical trial of racotumomab-alum vaccine as switch maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2014; 20(14): 3660–3671. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1674.
52. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
53. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2012; 30(17): 2046–2054. doi: 10.1200/JCO.2011.38.4032.
54. Lakomy R, Poprach A. Side effects of modern immunotherapy and how to solve them in the clinics. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 4): 4S103–4S114. doi: 10.14735/amko20154S103.
55. Zatloukal P, Heo DS, Park K et al. Randomized phase II clinical trial comparing tremelimumab (CP-675,206) with best supportive care (BSC) following first-line platinum-based therapy in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2009; 27 (Suppl 15): abstr. 8071.
56. Robert C, Long GV, Brady B et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Eng J Med* 2015; 372(4): 320–330. doi: 10.1056/NEJMoa1412082.
57. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Eng J Med* 2012; 366(26): 2443–2454. doi: 10.1056/NEJMoa1200690.
58. Herbst RS, Baas P, Kim DW et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387(10027): 1540–1550. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01281-7.
59. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387(10030): 1837–1846. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00587-0.
60. Besse B, Johnson M, Janne PA. Phase II, single-arm trial (BRCH) of atezolizumab as first-line or subsequent therapy for locally advanced or metastatic PD-L1-selected non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* 2015; 26 (Suppl 6): 16LBA.
61. Galon J, Klitnick B, Bindea G et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014; 232(2): 199–209. doi: 10.1002/path.4287.
62. Donnem T, Kleve TK, Andersen S et al. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2016; 27(2): 225–232. doi: 10.1093/annonc/mdv560.
63. Antonia SJ, Larkin J, Ascierto PA. Immuno-oncology combinations: a review of clinical experience and future prospects. *Clin Cancer Res* 2014; 20(24): 6258–6268. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1457.
64. Robert C, Thomas L, Bondarenko I et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Eng J Med* 2011; 364(26): 2517–2526. doi: 10.1056/NEJMoa1104621.
65. Formenti SC, Demaria S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(4): 256–265. doi: 10.1093/jnci/djs629.
66. Schilling B, Sucker A, Griewank K et al. Vemurafenib reverses immunosuppression by myeloid derived suppressor cells. *Int J Cancer* 2013; 133(7): 1653–1663. doi: 10.1002/ijc.28168.
67. Wolchok JD, Neyns B, Linette G et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 155–164. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70334-1.
68. Gowrishankar K, Gunatilake D, Gallagher SJ et al. Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF- $\kappa$ B. *PLoS One* 2015; 10(4): e0123410. doi: 10.1371/journal.pone.0123410.
69. Weide B, Martens A, Hassel JC et al. Baseline biomarkers for outcome of melanoma patients treated with pembrolizumab. *Clin Cancer Res*. In press 2016.
70. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Geukes Foppen M et al. Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clin Cancer Res* 2016; 22(12): 2908–2918. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2412.
71. Hinman LM, Huang SM, Hackett J et al. The drug diagnostic co-development concept paper: commentary from the 3rd FDA-DIA-PWG-PhRMA-BIO pharmacogenomics workshop. *Pharmacogenomics J* 2006; 6(6): 375–380.
72. Fda.gov [homepage on the Internet]. Drug-diagnostic co-development concept paper. U.S. Food and Drug Administration, MD; [updated 2016 June 22; cited 2016 June 23]. Available from: [www.fda.gov/downloads/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenomics/ucm116689.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenomics/ucm116689.pdf).
73. Fda.gov [homepage on the Internet]. List of cleared or approved companion diagnostic devices (in vitro and imaging tools). U.S. Food and Drug Administration, MD; [updated 2016 June 22; cited 2016 June 23]. Available from: [www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm301431.htm](http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm301431.htm).

# Nové technologie používané pro *in vivo* diagnostiku nádorů

## New Technologies for *In Vivo* Cancer Diagnostics

Hernychová L.<sup>1</sup>, Coufalová D.<sup>1</sup>, Michalová E.<sup>1</sup>, Nenutil R.<sup>2</sup>, Vojtěšek B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup> Oddělení onkologické patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** K léčbě onkologických onemocnění se používají kombinace postupů založených nejčastěji na chirurgickém odstranění nádoru, radioterapii, chemoterapii či hormonální terapii, přičemž samotný chirurgický zákrok většinou představuje stěžejní krok pro odstranění nádorové masy. Je ovšem často provázen problémy s určením ohraničení nádoru. Chirurg má před operací k dispozici pouze informace z předoperačních vyšetření, která naznačují lokalizaci a rozsah nádoru, ale neurčí jasné hranice mezi nádorovou a zdravou tkání. Tuto oblast ve většině případů nelze rozeznat zrakem či hmatem, a pokud není nádor zcela odstraněn, musí pacient podstoupit reoperaci. **Cíl:** Nové technologie vyvíjené ve výzkumných centrech umožňují operatérovi získat informace o stavu nádorové tkáně v reálném čase přímo na operačním sále v průběhu chirurgického zákroku. Patří mezi ně přístroje MarginProbe, Spectropen a spektroskopický tkáňový skener. Další skupinu tvoří zobrazovací techniky využívající hmotnostní spektrometrii k určování tkáňové specifičnosti. V posledních letech prošla obrovským vývojem technika intraoperativní hmotnostní spektrometrie (REIMS). Využívá elektronický skalpel, kterým chirurg provádí řez tkáně, přičemž vznikající aerosol je odváděn do hmotnostního spektrometru, jenž během několika desetin sekund získá hmotnostní spektra fosfolipidů specifických pro operovanou tkáň (nádorovou či zdravou). V České republice se již tato technologie využívá ve výzkumu k detekci koncentrace léčiva deponovaného v nádorové a zdravé tkáni myší trpících melanomem. Získané výsledky ukazují, že pomocí tohoto přístroje by bylo možné zásadním způsobem ovlivnit léčbu i její účinnost u onkologických onemocnění. O těchto nových technologiích vás v článku budeme podrobněji informovat a seznamovat s jejich principy a využitím.

### Klíčová slova

chirurgie – rakovina – nádory – molekulární diagnostika – hmotnostní spektrometrie – databáze

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



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

Obdrženo/Submitted: 17. 5. 2016

Přijato/Accepted: 6. 9. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164588>



## Summary

**Background:** The treatment of oncological diseases is based on the combination of surgery, representing the key step for the removal of the tumor tissue, radiotherapy, chemotherapy, and hormone therapy. However, the surgery is often accompanied by issue of determining the boundaries of the tumor. Prior the operation, the surgeon has information on preoperative findings, which indicate the location and extent of the tumor, but does not specify a clear boundary between the tumor and healthy tissue. This area cannot be recognized visually or by touch in most cases and when the tumor is not removed completely the patient has to undergo reoperation. **Aim:** Therefore, a number of research centers began to deal with the development of technology that would provide information about the state of the tissue in real time directly during surgery and would not require the collection or storage of tissue samples. These include MarginProbe, Spectropen tissue and spectroscopic scanner devices. Another group consists of imaging techniques using mass spectrometry approaches to determine the tissue specificity. Recently, the intraoperative mass spectrometry (REIMS) technique has undergone tremendous development. It uses an electronic scalpel using by the surgeon for cutting the tissue, when the resulting aerosol is discharged into the mass spectrometer that in tenths of seconds measures mass spectra of phospholipids, which are specific to the operated tissue (tumor or healthy). In the Czech Republic this technology has been already used for research purposes for the detection of drug deposited in the tumor and healthy tissue of mice suffering from melanoma. The obtained results show that with this apparatus it would be possible fundamentally affect the treatment and its efficacy in oncology as well. We will inform you about these new technologies and elucidate their principles and utilization.

## Key words

surgery – cancer – tumors – molecular diagnostics – mass spectrometry – database

## Úvod

V současné době je léčba solidních nádorů založena na kombinaci chirurgického zákroku, chemoterapie, radioterapie a biologické léčby. Cílem chirurgické léčby je odstranění celého nádoru nebo alespoň jeho převážné části. Ponechání zbytku nádoru může mít různé důvody, jako je např. velikost, rozložení či umístění v blízkosti orgánů a v neposlední řadě nemožnost rozeznání nádorové tkáně od zdravé. Zbývající nádor je pak eliminován jiným postupem, např. radioterapií či chemoterapií v závislosti na histologickém typu, avšak v některých případech musí být provedena reoperace k jeho odstranění. Při samotné operaci nastává v řadě případů problém s určením hra-

nice nádoru a chirurg je odkázán pouze na své zkušenosti podložené vizuálními nebo hmatovými vjemy. Ohraničení nádoru není často makroskopicky zřetelné, není známo, zda okraje resekátu obsahují nádorové buňky či nikoliv a jestli je třeba odstranit další tkáň a v jakém rozsahu. Závažné rozhodování nastává např. při operacích nádorů mozku, při nichž je radikalita zákroku jedním ze zásadních prognostických faktorů. Základním problémem většiny zhoubných mozkových nádorů je jejich infiltrativní charakter růstu, kdy nádorové buňky prorůstají mezi zdravými a hranice nádoru nejsou ostré. Neurochirurg tak při snaze o co nejradikálnější výkon může odstranit i zdravé buňky, nebo naopak musí ponechat část

nádorové tkáně z důvodu jejího umístění v blízkosti důležitých nervových drah, jejichž přerušení by mělo pro pacienta vážné následky. Obdobná situace může nastat při operacích infiltrujících nádorů měkkých tkání nebo pankreatu, případně u některých lézí v prsu, kde je kritické zejména šíření nádorové složky ve vývodech. Chirurg tedy provádí zákrok na základě předoperačních vyšetření a obvykle nemá během operace informace o tom, zda byla odstraněna veškerá nádorová masa. Tyto údaje získá z histopatologického vyšetření celého resekátu a teprve potom se rozhoduje o následné léčbě či případné reoperaci. Histologické vyšetření materiálu z resekční linie je samozřejmě možné provést i pooperačně. Pokud však má být provedeno v přijatelném časovém limitu, má významná omezení ve smyslu malého objemu vyšetřené tkáně a nižší kvality morfolgie ve zmrazených řezech. Proto se v poslední době řada výzkumných center začala zabývat touto problematikou a vyvíjet technologie, které by operátorovi daly informace o stavu tkáně v reálném čase přímo na operačním sále a nevyžadovaly odběr ani skladování vzorků.

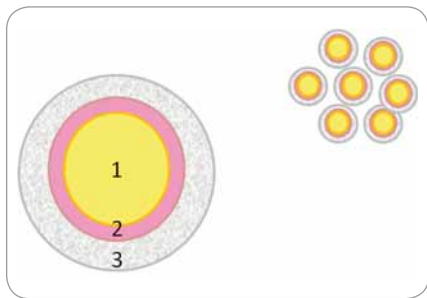
## Technologie používané pro detekci nádorových buněk v průběhu operace

### MarginProbe

Mezi nové technologie, které se v současné době vyvíjejí pro urychlení vy-



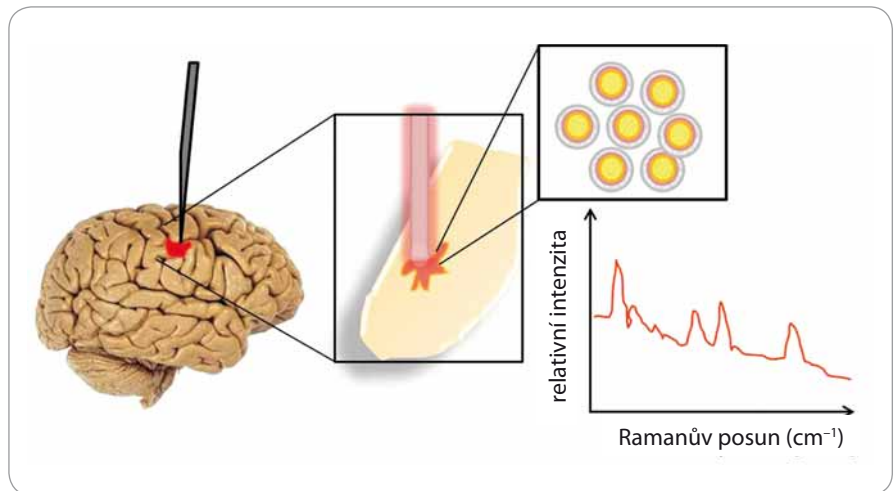
Obr. 1. MarginProbe System. Převzato z [1].



**Obr. 2. Schematické znázornění zlaté nanočástice.**

1 – jádro z inertního zlata, 2 – aktivní vrstva pro Ramanovo záření (4,4'-dipyridyl), 3 – křemenný obal

šetření tkáně, patří MarginProbe. Vývoj zařízení byl uskutečněn firmou Dune Medical Devices, Izrael (obr. 1) [1] pro *in situ* detekci invazivního ductálního a lobulárního nádoru prsu. Princip je založen na radiofrekvenční spektroskopii využívající elektromagnetické vlny k rozlišení nádorové a zdravé tkáně. Sterilní jednorázový senzor spojený se sondou vysílá radiofrekvenční signál do tkáně a zachycené zpětné signály odesílá do spektroskopu, kde jsou porovnávány se signály uloženými v databázi. Aplikuje se u lumpektomie [2] a pomáhá chirurgovi se rozhodnout, kolik tkáně má odstranit kolem nádoru (tzv. lem nádoru). Přímo na sále je *in situ* tkáň z lemu nádoru testována na nepřítomnost nádorových buněk a během krátkého času (3 s) se chirurg podle výsledku rozhodne, jestli má být odstraněna další část tkáně nebo je zákrok dostačující. Využití MarginProbe snížilo o 57 % počet reoperací [1,3], čímž se snížily jak finanční prostředky vynaložené na následnou operaci, tak i emoční stres pacientů. V Německu proběhla prospektivní klinická studie pacientek s nádorem prsu, v rámci níž u jedné skupiny byla během operace MarginProbe technika použita a u druhé nebyla. Následně byl sledován počet provedených reoperací a ukázalo se, že s aplikací MarginProbe techniky jejich počet výrazně klesl [4]. MarginProbe systém byl schválen v roce 2013 americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Tato technika je komerčně dostupná a je používána zejména při operacích nádoru prsu [5].



**Obr. 3. Detekce nádorových buněk mozku pomocí Ramanova skeneru.**

Inertní zlaté nanočástice se kumulovaly v mozku v místě nádoru, byly detekovány sondou a zobrazeny v Ramanově spektru.

#### SpectroPen

Dalším nástrojem je SpectroPen nazývaný jako Ramanův skener. Jedná se o ruční sondu vyvinutou vědci z Emory University a Georgia Institute of Technology, USA, používanou k lokalizaci nádorových buněk před i po operaci. Dokáže přesně rozlišit pozitivní nebo negativní okraje nádoru. Sonda má zabudovanou diodu vysílající laser s blízkým infračerveným zářením (near infrared radiation – NIR) do určitého místa v tkáni a je spojena s jednotkou pro excitaci a zachycení záření. Během operace NIR zobrazuje a rozlišuje nádorovou a zdravou tkáň. Technologie kombinuje laser s NIR a detektor fluorescenčního barviva a rozptýleného světla vysílaného částicemi zlata, které byly navrženy tak, aby se zachytily pouze na nádorových buňkách. Tyto částice se skládají z polymerního povlaku obsahujícího zlato, reportérového barviva a protilátky, která zajistí vazbu částice na vnější stranu nádorových buněk. Zlato značně zesiluje signál z reportérového barviva, a tím umožňuje detekci nádorů menších než 1 mm. SpectroPen je připojen optickým kabelem jak k Ramanovu spektroskopu, který zaznamenává vibrační frekvence molekul, tak k detektoru fluorescence. Vazba a detekce těchto nanočástic byla testována v *in vitro* i *ex vivo* uspořádáních. V *in vivo* experimentech byla myším s nádorem podána i.p. suspenze nanočástic a pomocí SpectroPeny byl během operace precizně de-

tekován okraj nádoru – přechod nádorové a zdravé tkáně [6]. V další práci je popisováno využití nanočástic pro předoperační vyšetření magnetickou rezonancí pro zobrazení lokalizace nádoru v mozku u živých myší [7]. Avšak zobrazení výsledku bylo těžkopádné a pro chirurga vykonávajícího operaci nevhodné. Proto vědci vyvinuli nové uspořádání přístroje, jednoduché na ovládání, schopné zobrazovat výsledky v reálném čase a vyhovující podmínkám umístění na operačním sále. Zdokonalená verze Ramanova skeneru byla použita při operacích nádoru myšího mozku (glioblastom, průměr 2–5 mm). Myším byly před operací injekčně aplikovány zlaté nanočástice, které se nechaly 24 hod cirkulovat v těle za účelem jejich kumulace v nádoru. Následně byly myši rozděleny do skupin, přičemž u jedné skupiny byla provedena operace při bílém osvětlení a u další skupiny byl použit SpectroPen. Následná imunohistochemická vyšetření prokázala, že vizualizace nádoru pomocí zlatých nanočástic umožnila odoperovat i malá rezidua nádoru, která nebyla rozpoznatelná pouhým okem (obr. 2, 3). Zároveň byla provedena rozsáhlá cytotoxická studie testující vlastnosti zlatých nanočástic, která potvrdila jejich inertní chování v organismu [8]. SpectroPen byl také využit ve studii s jinou zobrazovací technikou nádorové masy. Do této studie bylo začleněno osm psích a pět lidských pacientů, jimž byla plánována ope-

race k odstranění nádoru za použití NIR zobrazování. Pacientům byla 16–24 hod před operací injekčně podána indocyaninová zeleň (FDA schválené specifické preceptorové NIR barvivo hromadí se v hyperpermeabilních nádorových tkáních), která umožnila pomocí Spectro-Penu rozlišit nádorovou tkáň od nenádorové u všech pacientů během chirurgické operace. Nevýhodou této technologie je její nefunkčnost u edematózní tkáně či tkáně se zánětem [9].

### **Spektroskopický tkáňový skener**

Spektroskopický tkáňový skener detekuje přítomnost nádorových buněk a vyšetřuje vyoperovanou tkáň *ex situ*. Je umístěn na operačním sále a je schopný podat operatérovi informaci do 20 min. Dokáže skenovat větší plochu tkáně (do rozměru 20 × 20 cm) s vysokým rozlišením (0,25 mm). Pracuje na principech difuzní reflektance (diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy – DRIFT) a vnitřní fluorescenční spektroskopie. Ty využívají známá fakta používaná při diagnostice nádoru prsu, tedy přirozenou absorpci proteinů hemoglobinu a  $\beta$ -karotenu a fluorescenci NADH a kolagenu přítomných ve vyšších koncentracích v nádorové tkáni oproti zdravé tkáni prsu. Získaná spektra jsou následně zpracována do obrazové formy, která odráží metabolický, biochemický a morfologický stav tkáně. Výhodou této technologie je její jednoduchost, přesnost a získání digitálního obrazu tkáně. Následně tedy není třeba provádět histologické vyšetření. Využití přístroje se plánuje především při operacích solidních nádorů [10].

### **NIVI**

Mezi další nadějně techniky využívající barevného mikroskopického zobrazování tkáně patří NIVI (non-linear interferometric vibrational imaging), která byla vyvinuta týmem doktora Stephena Bopparta z University of Illinois, USA [11]. Její výhodou je, že se na rozdíl od histologického hodnocení nesoustředí jen na buněčnou strukturu vzorku tkáně, ale vyhodnocuje a vytváří obrazy založené na molekulárním složení v reálném čase. Princip techniky je založen na faktu, že každý typ molekuly má ve svých vazbách

unikátní vibrační stav energie, který je měřen a převeden na vibrační spektra. Konstrukteři NIVI vycházeli z předpokladu, že nádorové buňky produkují více určitých bílkovin s danou vibrací než tkáň zdravá. Přístroj vysílá laserový svazek na vyšetřovanou tkáň, v níž dojde k excitaci elektronů, které vyzáří Stokesovy fotony, jejichž vlnová délka přímo souvisí s analyzovanou tkání. Na základě posuvu vlnových délek je pak možné rozlišit zdravou tkáň od nádoru či prekancerózní oblasti pomocí barevně kódovaného obrazu analyzované tkáně. Technika byla vyzkoušena na krysích nádorových buňkách i tkáních a umožnila detekovat jasné hranice nádoru s více než 99% spolehlivostí za dobu kratší než 5 min [12].

### **Zobrazovací techniky využívající hmotnostní spektrometrii**

V následujících odstavcích budou detailněji popsány technologie využívající hmotnostní spektrometrii (mass spectrometry – MS) k určování tkáňové specifčnosti.

#### **Historie přímého vyšetření biologické tkáně pomocí MS**

Již v roce 1970 byla MS využívána k analýze nativní tkáně, avšak v té době nebyly dostačující technické parametry přístrojů k tomu, aby byly získány uspokojivé informace o chemickém složení testovaných vzorků. První průlom přišel v letech 1985–1988 s desorpčními ionizačními technikami, mezi něž patří ionizace/desorpce za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization – MALDI) [13] a MS sekundárních iontů (secondary ion mass spectrometry – SIMS) [14]. Následovala je další ionizační technika, desorpční ionizace elektrosprejem (desorption electrospray ionization – DESI), která jako první umožňovala neinvazivní testování vzorku bez přípravy a bez ohledu na jeho tvar nebo mechanické vlastnosti [15–17]. Pomocí těchto ionizačních metod bylo možné analyzovat složení povrchů pevných anorganických a organických látek, detekovat jejich chemické složení i prvky přítomné v nízkých koncentracích v nanometrových oblastech vyšetřovaných vzorků (např. metodou SIMS bylo možné

zjistit  $10^{12}$ – $10^{16}$  atomů většiny stopových prvků v  $1 \text{ cm}^3$ ). MALDI ionizace našla mimo jiné uplatnění v hmotnostně spektrometrickém zobrazování (mass spectrometry imaging – MSI), které bylo poprvé popsáno Spenglerem a jeho kolegy v roce 1994 [18]. Teoreticky lze touto technikou zobrazovat jakékoli sloučeniny, které je možné z povrchu vzorku desorbovat a převést do plynné fáze. MALDI je společně s dalšími typy ionizací (DESI, NALDI a SIMS) stále se rozvíjející technikou.

### **Hmotnostně spektrometrické zobrazování (MSI)**

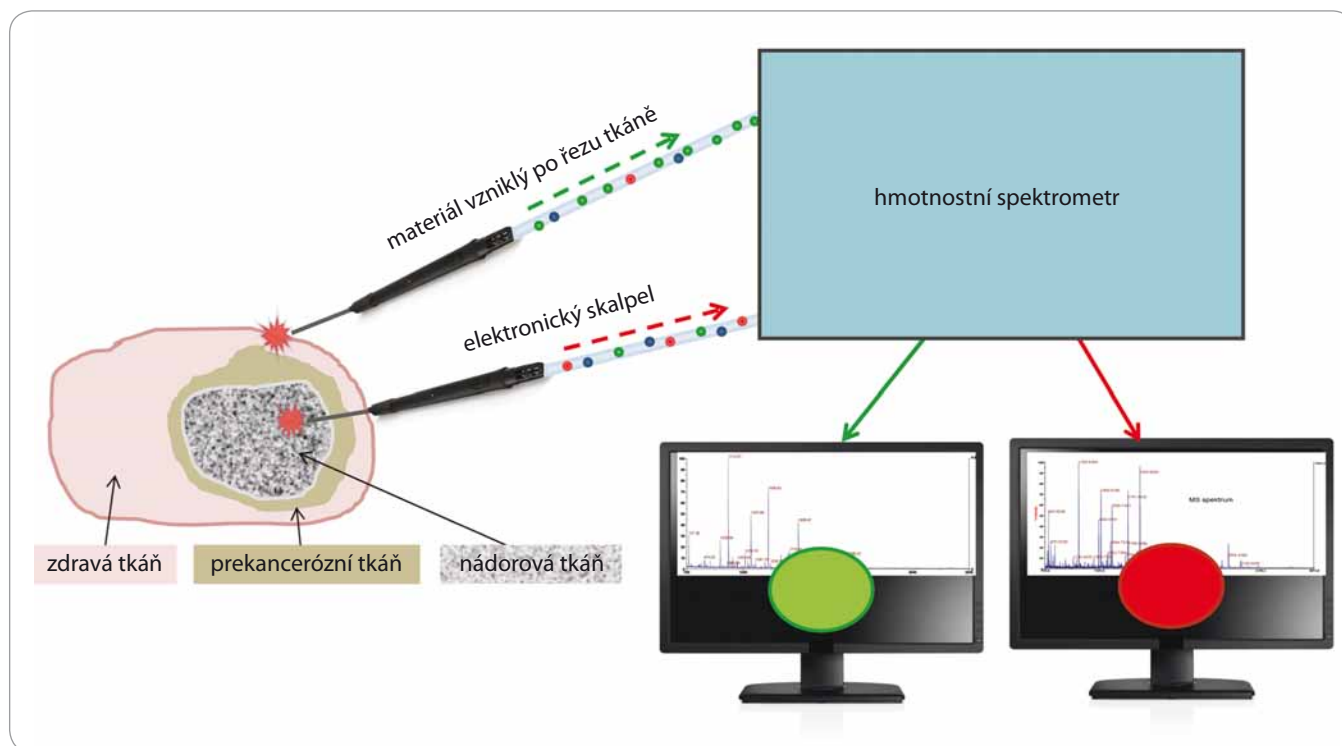
Koncem roku 1990 se ukázalo, že hmotnostně spektrometrická data v zobrazovacích studiích vykazují vysoký stupeň tkáňové specifčnosti. Pomocí MSI bylo možné získat informace z řezů tkání stejně jako histologickými metodami [13]. Hmotnostně spektrometrická detekce složek buněčných membrán a tkání (např. očních čoček) [19] poukazuje na přítomnost komplexních lipidů, přičemž distribuce lipidů je ve velmi dobré shodě s distribučními vzory získanými imunohistochemickými metodami. Tyto poznatky vedly ke vzniku nové éry studia molekulárního složení biologických vzorků.

Prostorové zobrazení MSI spočívá v kombinaci detekce látek přítomných na povrchu vzorku v daném místě, kdy každý pixel ve MSI představuje patřičné hmotnostní spektrum obsahující ionty přítomných sloučenin. Ke znázornění zastoupení jednotlivých iontů ve studovaném řezu je používána barevná nebo černobílá stupnice, kdy intenzita barvy vyjadřuje kvantitativní zastoupení daného iontu na povrchu analyzované oblasti. Takto získaný obraz je vícerozměrný, proto jsou ke zpracování experimentálních dat využívány vhodné programy umožňující obrazovou rekonstrukci a statistickou analýzu spolu s archivací dat, prováděnou pomocí velice výkonných počítačů s vysokou paměťovou kapacitou [20–23].

### **Intraoperativní hmotnostní spektrometrie (REIMS)**

#### **Vývoj REIMS techniky**

Další zobrazovací technikou, která prošla v posledních letech obrovským vývojem, je technika intraoperativní hmot-



**Obr. 4. Schematický náčrt intraoperativní hmotnostní spektrometrie (REIMS).**

Elektronický nůž po dotyku s tkání vytváří aerosol částic, které jsou vysušeny, ionizovány a vedeny do hmotnostního spektrometru, kde jsou analyzovány. Naměřená hmotnostní spektra jsou porovnávána s příslušnou databází a výsledek je signalizován na obrazovce. Pokud se elektronický skalpel pohybuje v oblasti nádoru, svítí na monitoru červené světlo. Když se posune do oblasti zdravé tkáně, signalizace na obrazovce se změní na zelené světlo. Chirurg tak získává informaci v reálném čase, že oblast nádoru je odstraněna.

nostní spektrometrie (rapid evaporative ionization mass spectrometry – REIMS). Poprvé byla popsána v roce 2009 maďarským chemikem Zoltanem Takátssem ze Semmelweis University v Budapešti [24]. Ve svém výzkumu pak pokračoval v Imperial College v Londýně a v letech 2010–2012 byla tato technika již testována přímo v nemocnicích. Získaná REIMS data byla použita pro budování databáze hmotnostních spekter, do které bylo zahrnuto 1 624 vzorků nádorové tkáně a 1 309 vzorků zdravé tkáně. Ke všem vzorkům byla k dispozici zdravotní dokumentace vyšetřovaných jedinců a výsledky imunohistologických analýz. Tímto způsobem se podařilo propojit chirurgickou praxi s MS, která je schopná podat online informaci o stavu tkáně [25]. REIMS metoda byla také aplikována na *in vivo* analýzu nádorů gastrointestinálního traktu s cílem rozlišit zdravou stěvnou tkáň, nádor a adenomatózní polyp [26]. Mezi další využití metody lze zařadit i detekci metastáz v lymfatických uzlinách během operace

hrudníku [27]. Unikátnost celého procesu spočívá v použití elektronického skalpelu, kterým chirurg provádí řez tkáně. Při tom je vytvořený aerosol odváděn pomocí Venturiho trubice do hmotnostního spektrometru, jenž musí konstrukčně vyhovovat podmínkám práce přímo v prostorách operačních sálů. Dr. Takáts očekává, že REIMS metoda bude připravena k reálnému využití již v roce 2016.

#### Princip REIMS techniky

Látky přítomné v aerosolu jsou většinou intaktní membránové lipidy či fosfolipidy, které se snadno detekují MS a dobře charakterizují daný typ tkáně [24]. Navíc poskytují další důležité informace oproti molekulám metabolomu nebo proteinům používaným při imunohistologické (IHC) detekci. Velkou výhodou je tedy specifčnost údajů získaných z MS a jejich komplementarita s IHC. Zásadním přínosem je však analýza aerosolu v reálném čase, která dává chirurgovi kontinuální informaci o tom,

zda operovaná tkáň obsahuje rakovinné buňky či nikoli. Během několika desetin sekund jsou získána hmotnostní spektra fosfolipidů specifických pro operovanou tkáň (nádorovou, či zdravou), což chirurgovi umožňuje se za méně než 2 s rozhodnout o dalším postupu chirurgického zákroku. Analýza získaných spekter probíhá pomocí vyhodnocovacího programu, který průběžně porovnává příchozí data v průběhu chirurgického zákroku, porovnává experimentální data s hmotnostními spektry uloženými v databázi, statisticky hodnotí a v jednoduchém formátu signalizuje výsledek pro chirurga. Informace pro chirurga může být vytvořena i pomocí zvukového signálu [28]. Výrazně se tím zrychluje samotná operace a zvyšuje se záruka na odstranění prakticky všech nádorových buněk.

#### Popis funkce REIMS techniky

Elektronický skalpel, který drží chirurg v ruce, je navržen tak, aby byl vznikající materiál při řezu tkáně od-

sáván a veden do hmotnostního spektrometru. V tomto přístroji jsou přivedené látky ionizovány, děleny podle své hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), detekovány a zobrazovány v počítači ve formě hmotnostního spektra (závislost  $m/z$  na intenzitě píků). Tím se v reálném čase získá molekulární informace z místa řezu v tkáni. Chirurg tedy nesleduje složité hmotnostně spektrometrické informace, ale má na monitoru semafor, jenž mění barvy podle typu tkáně. Červená barva signalizuje nádorovou či poškozenou tkáň a zelená barva tkáň zdravou. Přístroj tedy dokáže přesně mapovat histologický stav tkáně v průběhu operace (obr. 4) [29].

### Využití REIMS techniky v ČR

V roce 2016 byl elektronický skalpel spolu s hmotnostním spektrometrem nainstalován a testován v Laboratoři charakterizace molekulární struktury (Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha). Průběh představení tohoto systému je uveden v reportáži České televize [30]. ČR je tak v pořadí již čtvrtou zemí na světě, která se zapojila do využívání a testování techniky REIMS. První analýzy provedené pomocí elektronického skalpelu byly součástí výzkumu zabývajícího se detekcí koncentrace léčiva deponovaného v nádorové a zdravé tkáni myši trpící melanomem. Získané informace mohou zcela zásadním způsobem ovlivnit léčbu i její účinnost u onkologických onemocnění.

### Výhody REIMS techniky

Technologie nevyžaduje žádnou přípravu vzorků ani *in vivo* značení nádorové tkáně. Je spojena s konstrukcí unikátní databáze obsahující fingerprinty hmotnostních spekter vzniklých analýzou par tvořících se při řezu elektronickým skalpelem u přesně definovaných tkání a je úzce propojena s následně provedenou histologickou analýzou. Vzniklá data jsou odbornými pracovníky zpracovávána do databázového formátu se statistickou analýzou. Identifikace neznámé tkáně je pak založena na hledání podobnosti hmotnostního spektra vyšetřované tkáně s tkáněmi uloženými v databázi. Tím jsou chirurgovi poskytnuty informace v reálném čase o tom, zda nádorová tkáň byla zcela odstraněna. Cenné

jsou tyto informace zejména u nádorů, u nichž nelze pouhým okem nebo hmatem rozeznat okraj nádoru. To vše snižuje riziko reoperace i finanční náklady na léčbu pacientů. Výsledky této techniky lze kombinovat s jinými přístupy schopnými charakterizovat (identifikovat, kvantifikovat atd.) jednotlivé analyzované látky a dosáhnout tak globálního přístupu profilování. Lze také dosáhnout poznání molekulárních markerů odpovědných za rozdíly v nádorové a zdravé tkáni.

### Závěr

V posledních letech byly vyvinuty a popsány nové ionizační metody spojené *in situ* a *in vivo* hmotnostní spektrometrií biologických tkáňových vzorků. Technický rozvoj umožnil přenést tyto techniky do praxe a využívat je přímo na operačních sálech. Jsou schopné v reálném čase poskytovat cenné informace o histologickém stavu tkáně, pomáhají k určení a odstranění tkáně obsahující rakovinné buňky, a tím snižují nutnost provádění následných operací.

Elektronický skalpel byl primárně vyvinut pro nádorovou chirurgii. V současné době se jeho uplatnění rozšiřuje i do dalších odvětví, např. potravinářského průmyslu a mikrobiologie [31].

### Literatura

1. Medgadget.com [online]. MarginProbe FDA cleared to help remove entire breast cancer lumps. Available from: [www.medgadget.com/2013/01/marginprobe-fda-cleared-to-help-remove-entire-breast-cancer-lumps.html](http://www.medgadget.com/2013/01/marginprobe-fda-cleared-to-help-remove-entire-breast-cancer-lumps.html).
2. Schnabel F, Boolbol SK, Gittleman M et al. A randomized prospective study of lumpectomy margin assessment with use of MarginProbe in patients with nonpalpable breast malignancies. *Ann Surg Oncol* 2014; 21(5): 1589–1595. doi: 10.1245/s10434-014-3602-0.
3. Rivera RJ, Holmes DR, Tafra L. Analysis of the impact of intraoperative margin assessment with adjunctive use of MarginProbe versus standard of care on tissue volume removed. *Int J Surg Oncol* 2012; 2012: 868623.
4. Blohmer JU, Tanko J, Kueper J et al. MarginProbe® reduces the rate of re-excision following breast conserving surgery for breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2016; 294(2): 361–367. doi: 10.1007/s00404-016-4011-3.
5. MargineProbe [homepage on the Internet]. *Breastcancer.org*, PA; c2016, [updated 2015 Oct 23; cited 2016 May 30]. Available from: [www.breastcancer.org/symptoms/testing/types/marginprobe](http://www.breastcancer.org/symptoms/testing/types/marginprobe).
6. Mohs AM, Mancini MC, Singhal S et al. Hand-held spectroscopic device for *in vivo* and intraoperative tumor detection: contrast enhancement, detection sensitivity, and tissue penetration. *Anal Chem* 2010; 82(21): 9058–9065. doi: 10.1021/ac102058k.
7. Kircher MF, de la Zorda A, Jokerst JV et al. A brain tumor molecular imaging strategy using a new triple-modality

- MRI-photoacoustic-Raman nanoparticle. *Nat Med* 2012; 18(5): 829–834. doi: 10.1038/nm.2721.
8. Karabeber H, Huang R, Iacono P et al. Guiding brain tumor resection using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles and a hand-held Raman scanner. *ACS Nano* 2014; 8(10): 9755–9766.
9. Holt D, Okusanya O, Judy R et al. Intraoperative near-infrared imaging can distinguish cancer from normal tissue but not inflammation. *PLoS One* 2014; 9(7): e103342. doi: 10.1371/journal.pone.0103342.
10. Lue N, Kang JW, Yu CC et al. Portable optical fiber probe-based spectroscopic scanner for rapid cancer diagnosis: a new tool for intraoperative margin assessment. *PLoS One* 2012; 7(1): e30887. doi: 10.1371/journal.pone.0030887.
11. Chowdary PD, Jiang Z, Chaney EJ et al. Molecular histopathology by spectrally reconstructed nonlinear interferometric vibrational imaging. *Cancer Res* 2010; 70(23): 9562–9569. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1554.
12. Ahlberg L. New imaging technique accurately finds cancer cells. [online]. Illinois.edu. University of Illinois at Urbana-Champaign, IL; c2015 [updated 2010 Nov 24; cited 2016 May 5]. Available from: <https://news.illinois.edu/blog/view/6367/205473>.
13. Römpf A, Spengler B. Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space. *Histochem Cell Biol* 2013; 139(6): 759–783. doi: 10.1007/s00418-013-1097-6.
14. Boxer SG, Kraft ML, Weber PK. Advances in imaging secondary ion mass spectrometry for biological samples. *Annu Rev Biophys* 2009; 38: 53–74. doi: 10.1146/annurev.biophys.050708.133634.
15. Pal R, Singh OM, Talwar GP et al. Active immunization of baboons (*Papio anubis*) with the bovine LH receptor. *J Reprod Immunol* 1992; 21(2): 163–174.
16. Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 2004; 306(5695): 471–473.
17. Zimmerman TA, Monroe EB, Tucker KR et al. Chapter 13: imaging of cells and tissues with mass spectrometry: adding chemical information to imaging. *Methods Cell Biol* 2008; 89: 361–390. doi: 10.1016/S0091-679X(08)00613-4.
18. Spengler B, Hubert M, Kaufmann R. MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe. *Proc 42nd Annu Conf Mass Spectrom Allied Top*, Chicago, Illinois, 1994; abstr. 1041.
19. Pol J, Faltyskova H, Krasny L et al. Age-related changes in the lateral lipid distribution in a human lens described by mass spectrometry imaging. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* 2015; 21(3): 297–303. doi: 10.1255/ejms.1350.
20. Barceló-Coblijn G, Fernández JA. Mass spectrometry coupled to imaging techniques: the better the view the greater the challenge. *Front Physiol* 2015; 6: 3. doi: 10.3389/fphys.2015.00003.
21. Pól J, Strohal M, Havlíček V et al. Molecular mass spectrometry imaging in biomedical and life science research. *Histochem Cell Biol* 2010; 134(5): 423–443. doi: 10.1007/s00418-010-0753-3.
22. Vidová V, Volný M, Lemr K et al. Surface analysis by imaging mass spectrometry. *Collect Czechoslov Chem Commun* 2009; 74: 1101–1116.
23. Svatos A. Mass spectrometric imaging of small molecules. *Trends Biotechnol* 2010; 28(8): 425–434. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.05.005.
24. Balog J, Szaniszló T, Schaefer KC et al. Identification of biological tissues by rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2010; 82(17): 7343–7350. doi: 10.1021/ac101283x.
25. Balog J, Sasi-Szabó L, Kinross J et al. Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass

spectrometry. *Sci Transl Med* 2013; 5(194): 194ra93. doi: 10.1126/scitranslmed.3005623.

26. Balog J, Kumar S, Alexander J et al. In vivo endoscopic tissue identification by rapid evaporative ionization mass spectrometry (REIMS). *Angew Chem Int Ed Engl* 2015; 54(38): 11059–11062. doi: 10.1002/anie.201502770.
27. Enyedi A, Csongor V, Szabó K et al. Real-time detection of metastases in lymph nodes during thoracic surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2014; 18 (Suppl 1): S11.
28. Heath N. The intelligent knife that helps surgeons sniff out cancer [online]. CBS Interactive; c2016 [updated 2014 Nov 11; cited 2016 May 30]. Available from: <http://www.techrepublic.com/blog/european-technology/the-intelligent-knife-that-helps-surgeons-sniff-out-cancer>.
29. Balog J, Sasi-Szabó L, Kinross J et al. Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Sci Transl Med* 2013; 5(194): 194ra93. doi: 10.1126/scitranslmed.3005623.

30. Čeští lékaři testují chytrý skalpel, který pozná zdravou tkáň od poškozené. TV, ČT24. [aktualizováno 3. dubna 2016; citováno 30. května 2016]. Dostupné z: <http://www.ceskatelevize.cz/ct24/domaci/1739080-cesti-lekari-testuji-chytry-skalpel-ktery-pozna-zdravou-tkan-od-poskozene>.

31. Strittmatter N, Jones EA, Veselkov KA et al. Analysis of intact bacteria using rapid evaporative ionisation mass spectrometry. *Chem Commun* 2013; 49(55): 6188–6190. doi: 10.1039/c3cc42015a.

# Pokroky ve vývoji PET radiofarmak pro pacienty v České republice

## Current Progresses in Developing PET Radiopharmaceuticals for Patients in the Czech Republic

Adam J.<sup>1</sup>, Demlová R.<sup>1</sup>, Řehák Z.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup> Oddělení nukleární medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** V Masarykově onkologickém ústavu v Brně (MOÚ) se za spolupráce projektu RECAMO s aplikační sférou v posledních letech intenzivně pracuje na klinických hodnoceních moderních PET radiofarmak vedoucích k jejich budoucímu zpřístupnění pro české lékaře a jejich pacienty. Na základě této spolupráce byla v uplynulých letech vyvinuta mimo jiné radiofarmaka [<sup>11</sup>C]methionin či [<sup>18</sup>F]fluorocholin, látky s důležitým uplatněním v onkologické diagnostice pomocí PET. [<sup>11</sup>C]methionin, značený izotopem uhlíku-11 s poločasem přeměny 20 min, je markerem proteosyntézy, sloužícím v drtivé většině k vizualizaci mozkových tumorů, zatímco [<sup>18</sup>F]fluorocholin, značený izotopem fluoru-18 s poločasem přeměny 109 min, je markerem syntézy buněčných membrán a proliferace, jehož největší využití spočívá v PET diagnostice karcinomu prostaty. **Cíl:** Pomocí výsledků získaných provedením klinických hodnocení PET radiofarmak ve spolupráci MOÚ a RECAMO s výrobcem radiofarmak na základě předem dohodnutých a schválených parametrů má být demonstrována účinnost a vhodnost těchto látek k onkologické PET diagnostice daných tumorů. V obou případech byla radiofarmaka hodnocena ve vztahu k jejich majoritnímu využití. **Závěr:** Výsledky získané v rámci těchto klinických hodnocení prokazují přínos a efektivitu obou látek v PET diagnostice příslušných nádorů. V podobě souhrnných zpráv z klinického hodnocení budou výsledky využity v aplikační sféře coby součást dokumentace potřebné k registraci daného radiofarmaka pro používání v České republice.

### Klíčová slova

pozitronová emisní tomografie – radiofarmaka – L-methyl-<sup>11</sup>C-methionin – <sup>18</sup>F-fluorocholin

### Summary

**Background:** In Masaryk Memorial Cancer Institute (MMCI), there is a long-running intensive joint effort of the RECAMO project and commercial entities, involving mainly clinical evaluations of state-of-the-art PET radiopharmaceuticals leading to their future availability for Czech physicians and their patients. Recently, the PET tracers [<sup>11</sup>C]methionine and [<sup>18</sup>F]fluorocholine, among others, were developed in this cooperation, both of them tracers with high importance for oncologic positron emission tomography diagnostics. [<sup>11</sup>C]methionine, labeled by carbon-11 with a half-life of 20 min, is a proteosynthesis marker used primarily for brain tumor visualization, whereas [<sup>18</sup>F]fluorocholine, labeled by fluorine-18 with a half-life of 109 min, is a marker of synthesis of cellular membranes and cell proliferation, its primary use being PET diagnostics of prostate carcinoma. **Aim:** The results of clinical evaluations of both PET radiopharmaceuticals, performed on the basis of parameters agreed and approved beforehand in cooperation of MMCI, RECAMO and the manufacturer of said radiopharmaceuticals, aimed to prove the efficiency and suitability of both compounds for oncologic PET diagnostics for said tumors. In both cases, the radiopharmaceuticals were evaluated in regard to their major use. **Conclusion:** The obtained results prove the benefits and efficiency of both compounds in PET diagnostics of respective tumors. The results, in the form of clinical evaluation reports, will be used as part of the documentation required for marketing authorization of these compounds for use in the Czech Republic.

### Key words

positron emission tomography – radiopharmaceuticals – L-methyl-<sup>11</sup>C-methionine – <sup>18</sup>F-fluorocholine

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Ing. et Ing. Jan Adam, Ph.D.  
Regionální centrum aplikované  
molekulární onkologie  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: adam@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 10. 6. 2016

Přijato/Accepted: 17. 6. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164595>

## Úvod

Pozitronová emisní tomografie (PET) je jednou z nejmodernějších metod molekulárního zobrazování, neinvazivní *in vivo* metodou umožňující lékařům studovat procesy v lidském těle prostřednictvím radioaktivně značených radiofarmak a velmi přesně tak diagnostikovat rozličné poruchy a neobvyklé úkazy. V kombinaci s výpočetní tomografií (CT) patří již přes 10 let k páteřním zobrazovacím metodám nejen onkologické diagnostiky. PET je nejen v onkologických aplikacích metodou s velmi výhodným poměrem ceny a efektivity, přispívá nejen ke stanovení nebo určení diagnóz, ale i ke stanovování vhodné terapie či odezvy na léčbu, a je tak důležitým faktorem pro koncept takzvané personalizované medicíny. Vyniká především na poli určování metabolické aktivity nádorů, zhodnocení proliferace, zhodnocení hypoxie tkáně, zejména nádorové, či posouzení hustoty receptorů expri-movaných v buňkách.

Hlavním využívaným PET radiofarmakem, jakýmsi tažným koněm metody, zůstává [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglukóza (FDG), metabolický marker, díky němuž je možno v těle identifikovat místa s nepřírozně zvýšenou či naopak sníženou metabolickou aktivitou. FDG PET je v současnosti prakticky nenahraditelnou diagnostickou metodou pro detekci primárních tumorů a metastáz [1–4]. FDG nicméně trpí určitou nespecifičností – zvýšený příjem vykazují také např. místa s probíhajícím zánětlivým procesem, někdy je její příjem vyšší v hypoxických oblastech, některé orgány mají přirozeně vyšší příjem energie atd. Omezena je i její schopnost posoudit odezvu na léčbu – nemusí odlišit hojící se tkáň od viabilního proliferujícího nádoru. I to je důvodem, proč jsou vyvíjena specifičtější radiofarmaka, která širokospektrálnosti glukózy sice nedosahují, nicméně se hodí lépe pro některé specifičtější aplikace. Vhodnou volbou značené látky lze monitorovat prakticky jakýkoli z hlediska onkologického pacienta zajímavý děj v organizmu. Při vývoji nových radiofarmak je nicméně zapotřebí uvážit mnoho dílčích faktorů – vhodně zvolit radionuklid s ohledem na chemismus látky, její farmakokinetiku, bio-

logické chování, poločas interakce, ale také s ohledem na snadnost a výtěžek syntézy či dostupnost prekursoru. Drtivá většina využívaných radiofarmak je proto značena fluorem-18, nuklidem relativně snadno připravitelným a žijícím dostatečně dlouho, aby umožňoval transport hotového radiofarmaka na místo potřeby.

V roce 2007 bylo v areálu Masarykova onkologického ústavu (MOÚ) uvedeno do provozu druhé produkční PET Centrum ÚJV Řež, a.s. V souvislosti se spoluprací byl v roce 2009 publikován krátký přehledový článek o možnostech metody PET [5]. V následujících letech byly ve spolupráci s ÚJV Řež, a.s., odborníků z MOÚ a výzkumníků projektu RECAMO realizovány výzkumně vývojové projekty zaměřené na vývoj a zpřístupnění dalších PET radiofarmak lékařům oboru nukleární medicíny a zejména jejich pacientům. Produktem této spolupráce byla mimo jiné realizace klinických hodnocení radiofarmak [<sup>11</sup>C]methionin, látky sloužící k vizualizaci mozkových tumorů, a [<sup>18</sup>F]fluorocholin, látky určené k diagnostice karcinomu prostaty.

## [<sup>11</sup>C]methionin

Radiofarmakum [<sup>11</sup>C]methionin (chemickým názvem kyselina 2-amino-4-[<sup>11</sup>C]metylsulfanylbutanová, resp. L-[S-mety]<sup>11</sup>C]methionin) je příkladem radioaktivně značené aminokyseliny, která se v těle vyskytuje přirozeně. Většina aminokyselin je tumorovými buňkami přijímána skrze energeticky nezávislý „L-type amino acid transporter“ systém A či Na<sup>+</sup> dependentním systémem B0 [6]. Nádorové buňky mají většinou zvýšené nároky na příjem aminokyselin coby zdroje energie a stavebního materiálu pro nové proteiny. Bylo doloženo, že u nich dochází ke zvýšené expresi příslušných transportních systémů [7]. Díky tomu, že se po chemické stránce methionin značený <sup>11</sup>C nijak neliší od svého neznáčeného analogu, má radiofarmakum totožné chování jako přirozená aminokyselina. V literatuře bylo popsáno využití tohoto radiofarmaka pro detekci mozkových tumorů [8], jejich gradingu [9–11], odhadu prognózy [12–14], vyhodnocení reakce na léčbu [15–18] a pro rozlišování mezi relapsem tumoru a radiační nekró-

zou [19,20], a to i v porovnání s jinými PET radiofarmaky [21,22].

[<sup>11</sup>C]methionin je značen uhlíkem-11, tedy radionuklidem s poločasem rozpadu 20 min. Využití tohoto izotopu ke značení je tudíž striktně vázáno na centra, která zahrnují výrobní i zobrazovací zařízení v minimální vzdálenosti od sebe. Praktická transportovatelnost takového radiofarmaka je v řádu jednotek kilometrů, tedy pouze v rámci jednoho města. Realizace klinického hodnocení této látky v letech 2011–2014 tak byla umožněna blízkou spoluprací MOÚ se společností ÚJV Řež, a.s., která látku pro klinické hodnocení vyráběla ve svých laboratořích.

## Syntéza a kontrola jakosti radiofarmaka

Nuklid [<sup>11</sup>C] byl připraven na cyklotronu PET Centra Brno ÚJV Řež, a.s., ozařováním plynné směsi kyslíku a dusíku. Reakcí <sup>14</sup>N(p, α)<sup>11</sup>C se v plynné fázi vytvořila směs oxidů uhlíku obsahujících [<sup>11</sup>C]. Obsah terče byl následně veden do syntézního zařízení Tracerlab FXC firmy GE Healthcare osazeného ve stíněném boxu (obr. 1). V dalším kroku byla směs oxidů redukována na niklovém katalyzátoru na uhlovodík metan. Za vysoké teploty a přítomnosti jodu bylo vyrobeno metylační činidlo – metyljodid ([<sup>11</sup>C]H<sub>3</sub>I). Toto bylo vedeno do samotného reaktoru, kde bylo rozpuštěno v acetonu. Takto rozpuštěný metyljodid dále reagoval v bazickém prostředí (vodný roztok NaOH) s prekurzorem léčivé látky, L-homocysteintiolaktonem. Po reakci byl odpařen aceton, reakční směs neutralizována HCl a injektována na semipreparativní HPLC (vysokoúčinná kapalínová chromatografie) kolonu vestavěnou v syntézním zařízení. Elucí vodným roztokem NaCl byl následně z reakční směsi jímáním příslušného chromatografického peaku získán roztok [<sup>11</sup>C]methioninu. V souladu s požadavky Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL) byla provedena analýza jakosti radiofarmaka – kontrola vzhledu, kontrola totožnosti (gamma spektrometrie, kapalínová chromatografie), radiochemická čistota (kapalínová chromatografie), chemická čistota (kapalínová chromatografie), enantiomerní čistota (kapalínová chromatografie), radionuk-



lidová čistota (gamma spektrometrie), objemová aktivita, kontrola pH a po potvrzení vyhovujících parametrů byla látka předána na Oddělení nukleární medicíny, MOÚ.

#### Organizace vyšetření

Všechna [ $^{11}\text{C}$ ]methionin-PET vyšetření byla prováděna u pacientů s recidivou mozkového nádoru na hybridním PET/CT skeneru PET/CT Biograph 64 (Siemens, Erlangen, Německo). Aplikovaná aktivita byla pro první skupinu pacientů připravována v cílové dávce 500 MBq, v druhé pak 350 MBq. Snímání v rozsahu mozku bylo prováděno v 5., 20. a 35. min. Vyhodnocování studií probíhalo na konzolích Syngo MultiModality WorkPlace (Siemens). CT bylo snímáno jen v režimu low-dose CT, k upřesnění anatomické orientace byla využívána „off-line“ fúze s MRI mozku.

Vzhledem k tomu, že [ $^{11}\text{C}$ ]methionin není registrovaným diagnostickým léčivým přípravkem, probíhaly veškeré úkony spojené s aplikací a hodnocením v rámci akademicky iniciované klinické studie schválené SÚKL (EudraCT Number 2011-004877-10). Zadávatel klinické studie byl MOÚ a aplikace hodnoceného radiofarmaka probíhala na Oddělení nukleární medicíny, MOÚ. Do klinické studie byli zařazováni pacienti s primárními high-grade gliomy nebo extrakraniálně uloženými nádory se sekundárním postižením mozku, a to vždy po potvrzení MRI vyšetřením. Primárním cílem studie bylo



Obr. 1. Syntézní modul GE Tracerlab FXC používaný k syntéze [ $^{11}\text{C}$ ]methioninu. Zdroj [36].

prokázání akumulace radiofarmaka podaného v dávce 500 MBq, případně 350 MBq a jejich srovnání, sekundárním cílem studie bylo hodnocení bezpečnosti aplikovaného radiofarmaka. Celkově bylo do klinického hodnocení zařazeno 18 pacientů, výsledně hodnotitelných bylo 16 pacientů.

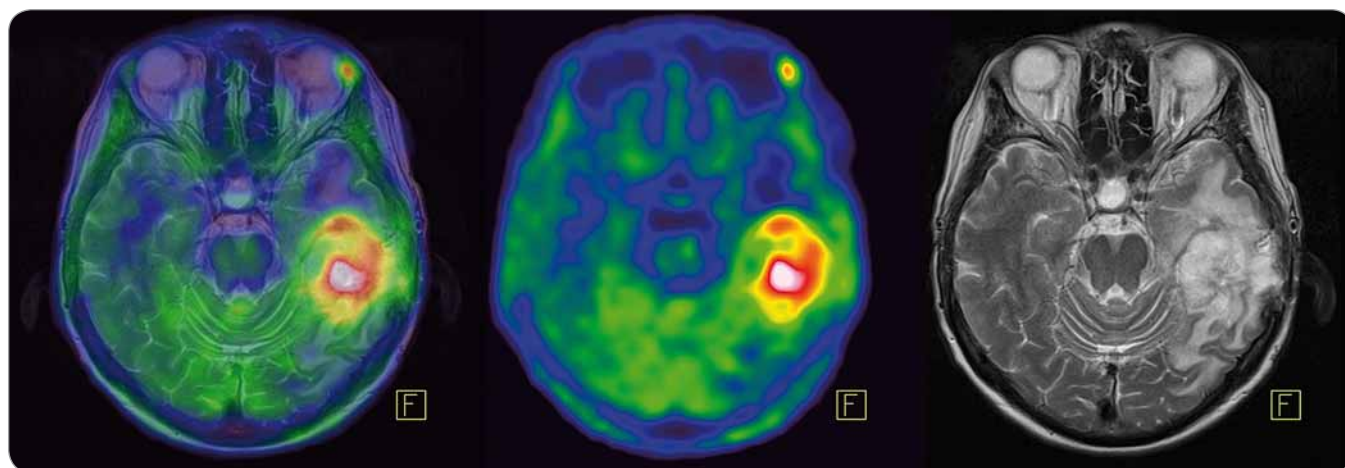
#### Výsledky

Výsledky provedeného klinického hodnocení potvrdily očekávané schopnosti radiofarmaka [ $^{11}\text{C}$ ]methionin v diagnostice high-grade gliomů mozku pomocí PET vyšetření kombinovaného

s CT či MRI obrazy vyšetřované oblasti (obr. 2). K dostatečnému zobrazení nádorové tkáně dostačovala intravenózní aplikace 350 MBq radiofarmaka (max. 500 MBq) v době aplikace. Radiofarmakum [ $^{11}\text{C}$ ]methionin je možné použít i k diagnostice jiných primárních mozkových nádorů nebo sekundárních nádorových procesů v mozku, pokud jiná vyšetření nevedou k jednoznačným výsledkům.

#### [ $^{18}\text{F}$ ]fluorocholin

[ $^{18}\text{F}$ ]fluorocholin (chemickým názvem [ $^{18}\text{F}$ ]fluorometyl-dimetyl-2-hydroxy-



Obr. 2. [ $^{11}\text{C}$ ]methionin-PET a fúze s MRI mozku.

Recidiva gliomu temporálně vlevo vykazuje vysokou akumulaci [ $^{11}\text{C}$ ]methioninu.



Obr. 3. Sestava modulů Synthera V2 a Synthera HPLC s osazenými integrovanými fluidními procesory (IFP). Zdroj [37].

etylammonium; resp. [ $^{18}\text{F}$ ]fluorometylcholin) je typickým příkladem specializovaného radiofarmaka značeného fluorem-18. Karcinom prostaty v posledních letech rapidně nabývá na významu – s prodlužující se očekávanou dobou dožití narůstá množství mužů, již touto chorobou trpí. V posledních 20 letech došlo v ČR ke zvýšení incidence tohoto typu nádoru přibližně o 70 % a vzhledem k současnému prodlužování očekávané doby dožití lze očekávat, že počet pacientů s touto diagnózou bude do budoucna i nadále narůstat. Pravděpodobnost výskytu karcinomu prostaty u pacienta prudce stoupá s věkem – hlavní skupinu pacientů reprezentují muži od 70 do 80 let věku (až 80 %) a v případě dožití se 90 a více let je pravděpodobnost onemocnění karcinomem prostaty pro muže prakticky 100 %. Onemocnění se může ale objevit i u mužů mladšího věku, pravidelný screening hraje proto nezastupitelnou úlohu pro časný záchyt tohoto onemocnění. Ročně je diagnostikováno různými metodami kolem 7 000 nových případů. Nicméně primární PET radiofarmakum, FDG, není pro účely vyšetření prostaty pomocí PET vhodné [23,24]. Faktorů je několik – malá velikost cílového orgánu, většinou nízká metabolická aktivita buněk karcinomu prostaty, značná variabilita v míře akumulace FDG u jednotlivých pacientů s karcinomem prostaty a zejména bezprostřední blízkost orgánu s výrazným fyziologickým příjmem radiofarmaka, močového měchýře. [ $^{18}\text{F}$ ]fluorocholin však tyto nedostatky eliminuje.

Fluorocholin je fluorem značeným analogem cholinu, základního stavebního kamene fosfolipidických membrán. Cholin je prekurzorem pro biosyntézu fosfolipidů a do buňky proniká skrze cholinové transportéry. Takzvanou Kennedyho dráhou je z něj posléze syntetizován fosfatidylcholin [25]. Krokem limitujícím rychlost této dráhy je hned krok první, kdy je pomocí cholin kinázy katalyzována fosforylace cholinu na fosfocholin [26]. V buňkách karcinomu prostaty je cholin kináza zvýšeně exprimována. DeGrado et al v roce 2001 doložili, že [ $^{18}\text{F}$ ] značený fluorocholin je *in vitro* fosforylován cholin kinázou, stejně jako jeho neznačený analog [27]. To zavdalo podnět k využití fluorocholinu jako zobrazovacího PET agens pro karcinom prostaty [28–33]. Specifické vlastnosti fluorocholinu ale motivují výzkumníky i k využití u jiných typů nádorů, např. hepatocelulárního karcinomu či nádorů příštích tělísek [34–35].

#### Syntéza a kontrola jakosti radiofarmaka

Nuklid [ $^{18}\text{F}$ ] byl připraven na pracovišti PET Centra Brno ozařováním tzv. obohacené vody,  $\text{H}_2[^{18}\text{O}]$ , vody obohacené o izotop kyslíku-18. Ostřelováním protonovým paprskem se část kyslíku-18 přeměnila jadernou reakcí  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$  na fluor-18, izotop s poločasem přeměny 109 min. Vodný roztok fluoridových [ $^{18}\text{F}$ ] iontů byl veden do syntézního zařízení IBA Synthera využívajícího technologie takzvaných integrovaných fluidních procesorů (IFP), *de facto* jednorázových chemických aparatur (obr. 3). V prvním kroku byly z roztoku na separační kolonce izolovány samotné ionty [ $^{18}\text{F}$ ] $^-$ . V první fázi syntézy byl pak na destilačním IFP fluorací dibrommetanu připraven vysoce těkavý [ $^{18}\text{F}$ ]fluorobrommetan. Tato látka byla izolována destilací, přečištěna a vedena k druhému, tzv. alkylačnímu IFP. Zde probíhala přímo na koloně alkylační reakce [ $^{18}\text{F}$ ]fluorobrommetanu s dimethylaminoetanolem za vzniku [ $^{18}\text{F}$ ]fluoro(metyl)cholinu. Po dalším přečištění od vedlejších produktů a zbylých reaktantů byla finální léčivá látka eluována fyziologickým roztokem.

V souladu s požadavky SÚKL byla provedena analýza jakosti radiofarmaka –

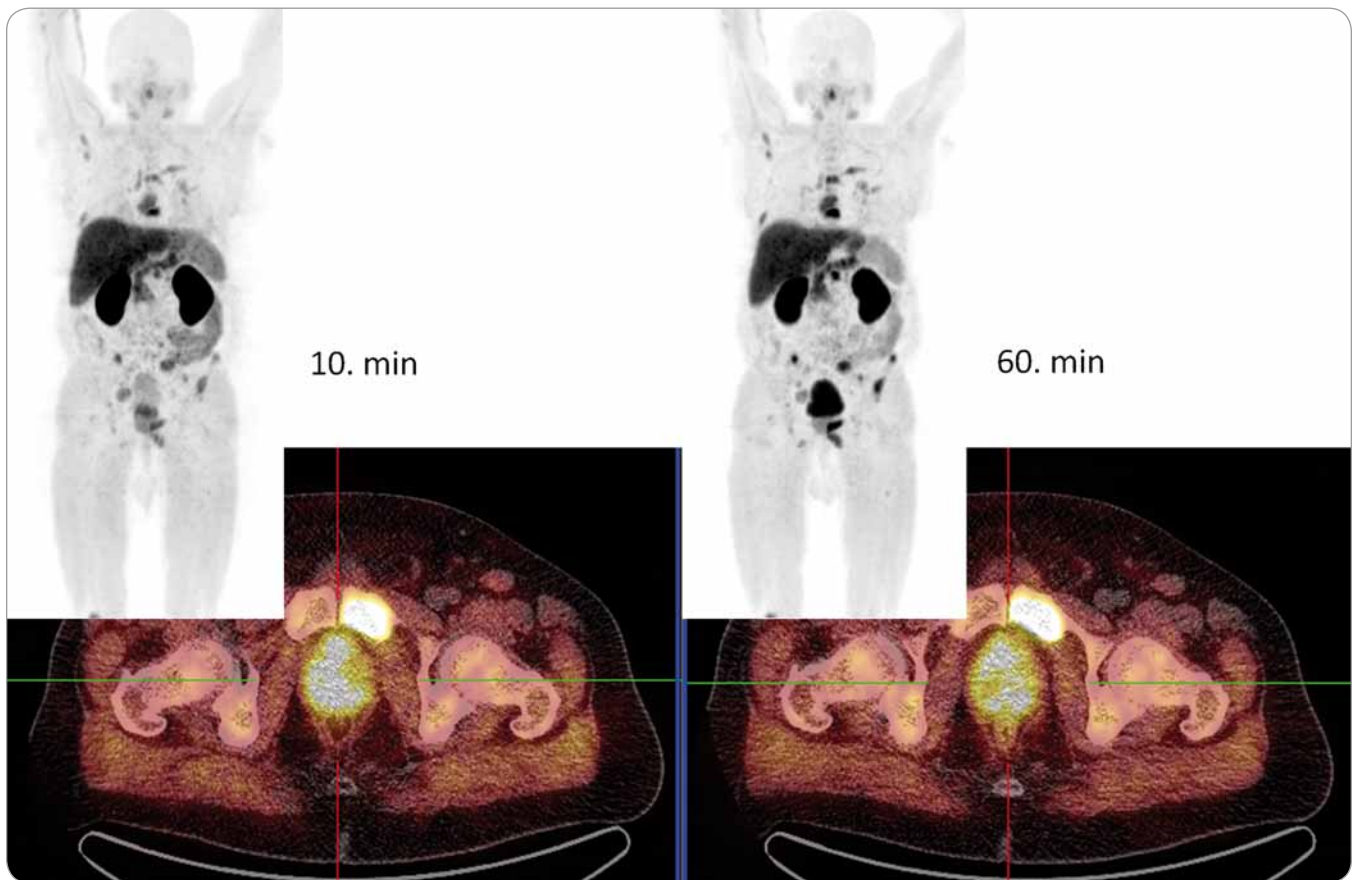
kontrola vzhledu, kontrola totožnosti (gamma spektrometrie, iontová chromatografie), radiochemická čistota (iontová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie), chemická čistota (iontová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie), radionuklidová čistota (gamma spektrometrie), objemová aktivita, hodnota pH a po potvrzení vyhovujících parametrů byla látka předána na Oddělení nukleární medicíny, MOÚ.

#### Vyšetření a organizace klinické studie

Všechna [ $^{18}\text{F}$ ]fluorocholin-PET vyšetření byla prováděna u pacientů s histologicky prokázaným karcinomem prostaty na hybridním PET/CT skeneru PET/CT Biograph 64 (Siemens, Erlangen, Německo), a to v rámci akademicky iniciované klinické studie schválené SÚKL (EudraCT Number 2014-005345-50). Zadavatelem klinické studie je MOÚ, standardní monitoring a farmakovigilance je prováděna ve spolupráci s infrastrukturou pro klinická hodnocení CZECRIN. Do klinické studie jsou zařazováni pacienti s lokalizovaným nebo lokálně pokročilým karcinomem prostaty s vysokým rizikem, a to před zvažovanou kurativní léčbou, nebo pacienti s diseminovaným onemocněním k posouzení rozsahu postižení. Všichni pacienti zařazení do klinického hodnocení souhlasili s účastí ve studii podepsáním informovaného souhlasu schváleného Etickou komisí MOÚ. Primárním cílem klinického hodnocení je prokázání akumulace radiofarmaka v nádorové tkáni karcinomu prostaty, sekundárními cíli studie pak hodnocení bezpečnosti a srovnání akumulace radiofarmaka v časových intervalech 10 a 60 min po aplikaci. Aplikovaná aktivita byla připravována v cílové dávce 4 MBq/kg. Snímání v rozsahu od kolen k loktům vzpažených horních končetin vč. hlavy bylo prováděno v 10. a 60. min po aplikaci radiofarmaka. Vyhodnocování studií probíhalo na konzolích Syngo MultiModality Workplace (Siemens). CT bylo snímáno jen v režimu low-dose CT, k upřesnění anatomické orientace byla využívána „off-line“ fúze s MRI mozku.

#### Výsledky

Klinické hodnocení a aplikace hodnoceného radiofarmaka v rámci klinické



Obr. 4. [ $^{18}\text{F}$ ]fluorocholin-PET/low-dose CT.

Vyšetření v 10. min od aplikace radiofarmaka lépe prokazuje zvýšenou akumulaci fluorocholinu v primárním karcinomu prostaty (lokalizační kříž), naopak mnohočetné kostní metastázy jsou lépe patrné při vyšetření v 60. min.

studie je v současné době prováděno na Oddělení nukleární medicíny, MOÚ. K 31. 5. 2016 bylo do studie zařazeno celkově 26 pacientů z celkově plánovaného počtu 30–35 hodnotitelných pacientů. Z průběžných výsledků (obr. 4) lze říct, že u zařazených pacientů došlo k zobrazení nádorové tkáně jak v primárních karcinomech prostaty, tak i v ložiscích recidiv v lůžku po prostatektomii či uzlinových i kostních metastázách. Vyšetření nebyla provázena žádnými závažnými nežádoucími účinky testovaného radiofarmaka a byla pacienty dobře tolerována. Výsledky klinického hodnocení s vyhodnocením primárních i sekundárních cílů studie bude provedeno do konce roku 2016.

### Závěr

Společné úsilí RECAMO, MOÚ, a výrobce PET radiofarmak ÚJV Řež, a.s., vedlo v uplynulých letech k přípravě a realizaci dvou klinických hodnocení PET ra-

diofarmak pro diagnostiku mozkových tumorů ( $[^{11}\text{C}]$ methionin) a karcinomu prostaty ( $[^{18}\text{F}]$ fluorocholin). Výsledky získané v rámci těchto klinických hodnocení prokazují přínos a efektivitu obou látek v PET diagnostice příslušných nádorů. V podobě souhrnných zpráv z klinického hodnocení budou výsledky využity v aplikační sféře coby součást dokumentace potřebné k registraci daného radiofarmaka pro používání v ČR.

### Literatura

- Gallagher BM, Ansari A, Atkins H et al. Radiopharmaceuticals XXVII. 18F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose as a radiopharmaceuticals for measuring regional myocardial glucose metabolism in vivo: tissue distribution and imaging studies in animals. *J Nucl Med* 1977; 18(10): 990–996.
- Schirrmeyer H, Kühn T, Guhlmann A et al. Fluorine-18 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose PET in the preoperative staging of breast cancer: comparison with the standard staging procedures. *Eur J Nucl Med* 2001; 28(3): 351–358.
- Votrubova J, Belohlavek O, Jaruskova M et al. The role of FDG-PET/CT in the detection of recurrent colo-

rectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33(7): 779–784.

4. Chessin DB, Kiran RP, Akhurst T et al. The emerging role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the management of primary and recurrent rectal cancer. *J Am Coll Surg* 2005; 201(6): 948–956.

5. Adam J, Andres P, Bolčák K et al. Nová radiofarmaka a aplikace pozitronové emisní tomografie na Masarykově onkologickém ústavu v Brně. *Klin Onkol* 2009; 22(3): 94–97.

6. Langen KJ, Jarosch M, Muhlensiepen H et al. Comparison of fluorotyrosines and methionine uptake in F98 rat gliomas. *Nucl Med Biol* 2003; 30(5): 501–508.

7. Saier MH Jr, Daniels GA, Boerner P et al. Neutral amino acid transport systems in animal cells: potential targets of oncogene action and regulators of cellular growth. *J Membr Biol* 1988; 104(1): 1–20.

8. Herholz K, Hölzer T, Bauer B et al. 11C-methionine PET for differential diagnosis of low-grade gliomas. *Neurology* 1998; 50(5): 1316–1322.

9. Ceysens S, van Laere K, de Groot T et al. [ $^{11}\text{C}$ ]methionine PET, histopathology, and survival in primary brain tumors and recurrence. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27(7): 1432–1437.

10. Singhal T, Narayanan TK, Jacobs MP et al. 11C-methionine PET for grading and prognostication in gliomas: a comparison study with 18F-FDG PET and contrast enhancement on MRI. *J Nucl Med* 2012; 53(11): 1709–1715. doi: 10.2967/jnumed.111.102533.

11. Hatakeyama T, Kawai N, Nishiyama Y et al. 11C-methionine (MET) and 18F-fluorothymidine (FLT) PET in pa-

- tients with newly diagnosed glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35(11): 2009–2017. doi: 10.1007/s00259-008-0847-5.
12. Kaschten B, Stevenaert A, Sadzot B et al. Preoperative evaluation of 54 gliomas by PET with fluorine-18-fluorodeoxyglucose and/or carbon-11-methionine. *J Nucl Med* 1998; 39(5): 778–785.
13. Ribom D, Eriksson A, Hartman M et al. Positron emission tomography 11C-methionine and survival in patients with low-grade gliomas. *Cancer* 2001; 92(6): 1541–1549.
14. van Laere K, Ceysens S, van Calenbergh F et al. Direct comparison of 18F-FDG and 11C-methionine PET in suspected recurrence of glioma: sensitivity, inter-observer variability and prognostic value. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32(1): 39–51.
15. Nariai T, Tanaka Y, Wakimoto H et al. Usefulness of L-[methyl-11C] methionine-positron emission tomography as a biological monitoring tool in the treatment of glioma. *J Neurosurg* 2005; 103(3): 498–507.
16. Ribom D, Engler H, Blomquist E et al. Potential significance of 11C-methionine PET as a marker for the radiosensitivity of low grade gliomas. *Eur J Nucl Med* 2002; 29(5): 632–640.
17. Nuutinen J, Sonninen P, Lehtikainen P et al. Radiotherapy treatment planning and long-term follow-up with [11C]methionine PET in patients with low-grade astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48(1): 43–52.
18. Galldiks N, Kracht LW, Burghaus L et al. Use of 11C-methionine PET to monitor the effects of temozolomide chemotherapy in malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33(5): 516–524.
19. Tsuyuguchi N, Takami T, Sunada I et al. Methionine positron emission tomography for differentiation of recurrent brain tumor and radiation necrosis after stereotactic radiosurgery – in malignant glioma. *Ann Nucl Med* 2004; 18(4): 291–296.
20. Terakawa Y, Tsuyuguchi N, Iwai Y et al. Diagnostic accuracy of 11C-methionine PET for differentiation of recurrent brain tumors from radiation necrosis after radiotherapy. *J Nucl Med* 2008; 49(5): 694–699. doi: 10.2967/jnumed.107.048082.
21. Roelcke U, Radü EW, von Ammon K et al. Alteration of blood-brain-barrier in human brain-tumors – comparison of [F-18]fluorodeoxyglucose, [C-11]methionine and Rb-82 using PET. *J Neurol Sci* 1995; 132(1): 20–27.
22. Hatakeyama T, Kawai I, Nishiyama Y et al. C-11-methionine (MET) and F-18-fluorothymidine (FLT) PET in patients with newly diagnosed glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35(11): 2009–2017. doi: 10.1007/s00259-008-0847-5.
23. Morris MJ, Akhurst T, Osman I et al. Fluorinated deoxyglucose positron emission tomography imaging in progressive metastatic prostate cancer. *Urology* 2002; 59(6): 913–918.
24. Sanz G, Robles JE, Gimenez M et al. Positron emission tomography with 18fluorine-labelled deoxyglucose: utility in localized and advanced prostate cancer. *BJU Int* 1999; 84(9): 1028–1031.
25. Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* 1956; 222(1): 193–214.
26. Kent C. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Prog Lipid Res* 1990; 29(2): 87–105.
27. DeGrado TR, Baldwin SW, Wang S et al. Synthesis and evaluation of (18F)-labeled choline analogs as oncologic PET tracers. *J Nucl Med* 2001; 42(12): 1805–1814.
28. Bauman G, Belhocine T, Kovacs M et al. 18F-fluorocholeline for prostate cancer imaging: a systematic review of the literature. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2012; 15(1): 45–55. doi: 10.1038/pcan.2011.35.
29. Soyka JD, Muster MA, Schmid DT et al. Clinical impact of 18F-choline PET/CT in patients with recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39(6): 936–943. doi: 10.1007/s00259-012-2083-2.
30. Kwee SA, Coel MN, Lim J. Detection of recurrent prostate cancer with 18F-fluorocholine PET/CT in relation to PSA level at the time of imaging. *Ann Nucl Med* 2012; 26(6): 501–507. doi: 10.1007/s12149-012-0601-8.
31. Hodolič M. Role of (18F)-choline PET/CT in evaluation of patients with prostate carcinoma. *Radiol Oncol* 2011; 45(1): 17–21. doi: 10.2478/v10019-010-0050-8.
32. Fabbri C, Galassi R, Moretti A et al. Radiation dosimetry of 18F-fluorocholeline PET/CT studies in prostate cancer patients. *Phys Med* 2014; 30(3): 346–351. doi: 10.1016/j.ejmp.2013.10.007.
33. Umbehr MH, Müntener M, Hany T et al. The role of 11C-choline and 18F-fluorocholeline positron emission tomography (PET) and PET/CT in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2013; 64(1): 106–117. doi: 10.1016/j.eururo.2013.04.019.
34. Quak E, Lheureux S, Reznik Y et al. F18-choline, a novel PET tracer for parathyroid adenoma? *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(8): 3111–3112. doi: 10.1210/jc.2013-2084.
35. Bieze M, Klumpen HJ, Verheij J et al. Diagnostic accuracy of 18F-methyl-choline PET/CT for intra- and extrahepatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014; 59(3): 996–1006. doi: 10.1002/hep.26781.
36. GE Healthcare [homepage on the Internet]. Available from: [www3.gehealthcare.com.sg](http://www3.gehealthcare.com.sg).
37. Iba Radiopharma Solutions [homepage on the Internet]. Available from: [www.iba-radiopharmasolutions.com](http://www.iba-radiopharmasolutions.com).

# KLINICKÁ ONKOLOGIE

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

## REDAKČNÍ RADA

### Výkonná redakční rada (Brno)

#### vedoucí redaktor

doc. MUDr. Vuk Fait, CSc.

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

#### výkonný redaktor

doc. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

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

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

### Širší redakční rada

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

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

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

### Čestní členové redakční rady

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

prof. Jan Klasterský, Brusel  
prof. MUDr. Josef Koutecký, DrSc., Praha  
prof. RNDr. Jan Kovařík, DrSc., Brno  
prof. MUDr. Ivan Koza, DrSc., Bratislava  
doc. MUDr. Jozef Mardiak, CSc., Bratislava

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

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2016

## KLINICKÁ ONKOLOGIE

Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně.

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

On-line verze je přístupná na adrese [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz) nebo [www.klinickaonkologie.cz](http://www.klinickaonkologie.cz).

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

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

Odpovědná redaktorka: Mgr. Simona Nováková, e-mail: [simona.novakova@ambitmedia.cz](mailto:simona.novakova@ambitmedia.cz).

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

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

Vychází 6krát ročně. Předplatné na rok 2016 činí 540 Kč (22 eur).

Informace o předplatném podává a objednávky předplatitelů přijímá: e-mail: [předplatne@ambitmedia.cz](mailto:předplatne@ambitmedia.cz).

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

Rukopisy vkládejte do redakčního systému: <http://redakce.ambitmedia.cz/ko>; případně dotazy směřujte na e-mail [klinickaonkologie@mou.cz](mailto:klinickaonkologie@mou.cz)

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

Pokyny pro autory naleznete na [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz) v sekci časopisu nebo na [www.klinickaonkologie.cz](http://www.klinickaonkologie.cz).

Toto číslo vychází 15. 11. 2016.

