



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**KRAS signální dráha ve vztahu k duktálnímu
adenokarcinomu pankreatu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Dominika Flašarová
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. MUDr. Beatrice Mohelníková Duchoňová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Dominika Flašarová
Název práce	KRAS signální dráha ve vztahu k duktálnímu adenokarcinomu pankreatu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Onkologická klinika FN a UP v Olomouci
Vedoucí práce	doc. MUDr. Beatrice Mohelníková Duchoňová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Tato práce je zaměřená na studium exprese 41 genů účastnících se KRAS signální dráhy, jejíž deregulace ovlivňuje rozvoj duktálního adenokarcinomu pankreatu (PDAC). Karcinom pankreatu je závažné a téměř ve všech případech smrtelné onemocnění, kterému každoročně podlehe okolo 230 000 pacientů po celém světě. Nebezpečnost čtvrté nejčastější příčiny úmrtí spojené s nádorovým onemocněním spočívá především v pozdní diagnostice a neefektivnosti léčby pokročilých stádií onemocnění.

V experimentální části práce byly zkoumány metodou qPCR hladiny exprese mRNA klíčových genů zapojených do KRAS signální dráhy v nádorových buňkách pankreatu u buněčných linií (PaCa-44, MIA PaCa-2, BxPC-3), a možné ovlivnění této dráhy podáním cytostatik (taxanů) modelovým nádorovým xenograftům *in vivo*. KRAS aktivující mutace udržují trvale aktivní KRAS protein, nicméně v naší studii se nepotvrdilo, že by vedly obecně k zvýšené expresi genů signálních drah, které se nacházejí v buněčné signalizaci pod tímto onkogenem. Navíc, po chemoterapii experimentálním taxanem nedošlo k inhibici genové exprese KRAS signální dráhy *in vitro*, ani *in vivo*.

Pochopení fungování KRAS signální dráhy u onkologických pacientů s pokročilým adenokarcinomem slinivky je důležitým aspektem pro nalezení nových léčebných možností.

Klíčová slova	duktální adenokarcinom pankreatu (PDAC), KRAS, genová exprese, taxan
Počet stran	68
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Dominika Flašarová
Title of thesis	KRAS signalling pathway in relation to pancreatic ductal adenocarcinoma
Type of thesis	Master
Department	Department of Oncology of University Hospital and Palacky University in Olomouc
Supervisor	doc. MUDr. Beatrice Mohelníková Duchoňová, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

This work is focused on the study of expression of 41 genes of KRAS signaling pathway whose deregulation affects the progress of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Pancreatic cancer is a serious and almost always fatal illness that is every year responsible for the deaths of almost 230,000 patients around the world. The dangerousness of the fourth most common cause of cancer-related deaths lies above all in the later diagnosis and ineffectiveness of the treatment of advanced stages of the disease.

In the experimental part, the expression levels of mRNA key genes involved in the KRAS signaling pathway in pancreatic tumor cells in cell lines (PaCa-44, MIA PaCa-2, BxPC-3) were examined by qPCR method and possible influence of this pathway by the administration of cytostatics (taxanes) to model tumor xenografts *in vivo*. KRAS activating mutations keeps a permanently active KRAS protein, however in our study it has not been confirmed that it would generally lead to increased expression of signaling pathways's genes which are located in cell signalization under this oncogene. Moreover, after experimental taxane chemotherapy, there was no inhibition of gene expression of KRAS signaling pathway neither *in vitro* nor *in vivo*.

Understanding the function of the KRAS signaling pathway in oncology patients with advanced pancreatic adenocarcinoma is an important aspect of finding new treatment options.

Keywords

pancreatic ductal adenocarcinoma
(PDAC), KRAS, gene expression, taxane

Number of pages

68

Language

Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 11. 5. 2018

Na tomto místě bych v první řadě ráda poděkovala doc. MUDr. Beatrice Mohelníkové Duchoňové, Ph.D., za cenné rady, trpělivost, zájem a čas který mi věnovala při vedení mé diplomové práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Ondřeji Strouhalovi, za velkou pomoc při práci v laboratoři a mým rodičům za podporu během studia.

Obsah

Seznam použitých zkratk	10
1 Úvod	13
2 Teoretická část	14
2.1 Karcinom pankreatu	14
2.1.1 Epidemiologie	15
2.1.2 Diagnostika	16
2.1.3 Léčba	16
2.1.4 Molekulární onkologie	17
2.2 Postavení taxanů v terapii karcinomu pankreatu	17
2.3 KRAS protoonkogen a signální dráhy s ním spojené	19
2.3.1 RAS/RAF/MAPK signální dráha	22
2.3.2 PI3K/PDK1/AKT signální dráha	25
2.3.3 RAL guanine nucleotide exchange factor signální dráha	27
2.3.4 RIN1/ABL signální dráha	27
2.4 Úloha KRAS u karcinomu pankreatu	28
2.4.1 Pankreatické prekancerózy	28
2.4.2 Onkogenní forma KRAS při progresi karcinomu pankreatu	29
2.4.3 Prognostický a prediktivní význam KRAS	30
2.4.3 Metabolismus nádoru	30
2.4.4 Mikroprostředí PDAC	31
2.4.5 Autofagie a progrese PDAC řízeném KRAS	31
2.4.6 Potenciální léčba?	32
3 Praktická část	33
3.1 Použité buněčné kultury	33
3.2 Xenografty	34
3.3 Izolace RNA	34

3.3.1 Chemikálie.....	34
3.3.2 Přístroje.....	34
3.3.3 Postup	34
3.4 Testování integrity a kvantity RNA	35
3.4.1 Přístroje.....	36
3.4.2 Kit.....	36
3.4.3 Postup	37
3.5 Syntéza cDNA.....	37
3.5.1 Chemikálie.....	37
3.5.2 Přístroje.....	37
3.5.3 Postup	38
3.6 Kontrola kvality cDNA	38
3.6.1 Chemikálie.....	39
3.6.2 Přístroje.....	39
3.6.3 Postup	40
3.7 Měření hladiny exprese genů pomocí real-time PCR	40
3.7.1 Chemikálie.....	41
3.7.2 Přístroje.....	41
3.7.3 Postup	41
3.7.4 Analýza míry exprese genů	44
4 Výsledky	45
4.1 Porovnání exprese genů KRAS signální dráhy mezi jednotlivými liniemi	45
4.2 Exprese genů u xenograftů.....	48
4.3 Exprese genů jednotlivých linií léčených taxanem vzhledem k neléčeným.....	49
4.3.1 Exprese genů buněčné linie PaCa-44 léčenou taxanem SBT-1216	49
4.3.2 Exprese genů buněčné linie MIA PaCa-2 léčenou taxanem SBT-1216	51
4.3.3 Exprese genů buněčné linie BxPC-33 léčenou taxanem SBT-1216	52

5 Diskuze	55
6 Závěr	58
Použitá literatura	59

Seznam použitých zkratek

ABL	Abelson tyrozin kináza
AKT1; AKT2	<i>angl.</i> AKT serine/threonine kinas 1; 2
APC	<i>angl.</i> adenomatosis polyposis coli
ARAF	<i>angl.</i> A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
BRAF	<i>angl.</i> B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
BRCA	tumor supresorový gen rakoviny prsu; <i>angl.</i> breast cancer
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAS	<i>angl.</i> cellular apoptosis susceptibility protein
CDKN2A	cyklin dependentní inhibitor kinázy 2A; <i>angl.</i> cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CT	výpočetní tomografie; <i>angl.</i> computed tomography
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor; <i>angl.</i> epidermal growth factor receptor
EIF2B1	<i>angl.</i> eukaryotic translation initiation factor 2B subunit α
ELF1	<i>angl.</i> E74 like ETS transcription factor 1
ERK	extracelulárně regulovaná kináza; <i>angl.</i> extracellular signal-regulated kinase
EUS	endoskopická ultrasonografie
FNAB	aspirační biopsie tenkou jehlou; <i>angl.</i> fine needle aspiration biopsy
GAP	GTPázou aktivovaný protein; <i>angl.</i> GTPase activating protein
GDP	guanosindifosfát
GEF	<i>angl.</i> guanin nucleotide exchange factor
GPCR	receptor spřažený s G proteinem; <i>angl.</i> G protein-coupled receptor
GRB2	receptor růstového faktoru vázící protein 2; <i>angl.</i> growth factor receptor-bound protein 2
GSK3B	<i>angl.</i> glycogen synthase kinase 3 β
GTP	guanosintrifosfát
HIF	transkripční faktor indukovaný hypoxií; <i>angl.</i> hypoxia-induced factor

HRAS	<i>angl.</i> Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IPMN	intraduktální papilární mucinózní neoplazii
JNK	<i>angl.</i> c-Jun NH2-terminal kinase
KRAS	<i>angl.</i> Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MADH4	<i>angl.</i> Mothers against decapentaplegic homolog 4
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza; <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase
MAP2K1	<i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAP3K1	<i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MCM	mucinózní cystickou neoplazii
MEK	mitogenem aktivovaná proteinkináza; <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase
MKNK1	<i>angl.</i> MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1
MRI	magnetická rezonance
MRPL19	<i>angl.</i> mitochondrial ribosomal protein L19
mSIN1	<i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase-associated protein 1
MTOR	<i>angl.</i> mechanistic target of rapamycin kinase
Nab-paclitaxel	nanoparticle albumin-bound paclitaxel
NF- κ B	nukleární faktor κ B
NRAS	Neuroblastoma-RAS
PAK1	<i>angl.</i> p21 activated kinase 1
PanIN	pankreatická intraepiteliální neoplazie
PDAC	duktální adenokarcinom pankreatu; <i>angl.</i> pancreatic ductal adenocarcinoma
PDPK1	<i>angl.</i> 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1
PET	pozitronová emisní tomografie
PHB	Prohibitin
PIK3CA	<i>angl.</i> phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α
PIK3CG	<i>angl.</i> phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit γ
PLK3	<i>angl.</i> polo like kinase 3
POP4	<i>angl.</i> POP4 homolog, ribonuclease P/MRP subunit
PRAS40	<i>angl.</i> proline-rich Akt substrate 40 kDa

PRKCA	<i>angl.</i> protein kinase C α
PROTOR	<i>angl.</i> proline rich 5
PRSS1	<i>angl.</i> protease, serine 1
PTEN	<i>angl.</i> phosphatase and tensin homolog
PTK2	<i>angl.</i> protein tyrosine kinase 2
PTK2B	<i>angl.</i> protein tyrosine kinase 2 β
RAC1	<i>angl.</i> Rac family small GTPase 1
RAF1	<i>angl.</i> Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
RAGE	receptor pro konečné produkty pokročilé glykace; <i>angl.</i> receptor for advanced glycation end products
RALA	<i>angl.</i> RAS like proto-oncogene A
RALBP1	<i>angl.</i> ralA binding protein 1
RALGDS	<i>angl.</i> ral guanine nucleotide dissociation stimulator
RHOA	<i>angl.</i> ras homolog family member A
RICTOR	<i>angl.</i> Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin
RIN	RNA integrity number
RIN1	Ras a Rab interaktor 1
RPS6KA2	<i>angl.</i> ribosomal protein S6 kinase A2
Shc	SHC-transformující protein; <i>angl.</i> SHC-transforming protein
SOS	<i>angl.</i> son of sevenless
SRC	<i>angl.</i> SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
STK11	serin/threonin kináza 11
TKR	tyrozinkinázový receptor
TP53	tumor protein p53

1 Úvod

Duktální adenokarcinom pankreatu je čtvrtá nejčastější příčina úmrtí na nádorová onemocnění a do roku 2030 se pravděpodobně stane druhou nejčastější příčinou. Vysoká mortalita pramení především z pozdní diagnózy a neefektivnosti léčby pokročilých nádorů (Ying *et al.*, 2016). Nejčastěji mutovaným onkogenem karcinomu pankreatu je *KRAS*. Somatické mutace v *KRAS* se vyskytují u více než 90 % těchto nádorů, a to často již v ranných stádiích pankreatické tumorigeneze (Kanda *et al.*, 2012).

Cílem teoretické části této práce bylo vypracování literární rešerše se zaměřením na současný stav poznání *KRAS* signální dráhy v karcinogenezi, progresi a terapii duktálního adenokarcinomu pankreatu. Teoretická část práce tedy shrnuje informace o etiologii, rizikových faktorech, diagnostice a terapii karcinomu pankreatu a *KRAS* signální dráze, jednotlivých proteinech účastnících se přenosu signálu, se zaměřením na úlohu v karcinogenezi a progresi karcinomu pankreatu, a dále také na potenciální možnosti jejího ovlivnění v onkologické léčbě, a to chemoterapii a cílené terapii.

V druhé části, která je prakticky zaměřená, bylo cílem podrobné studium exprese signální dráhy *KRAS* v nádorových buňkách pankreatu u buněčných linií, a jejího ovlivnění podáním cytostatik (taxanů) modelovým nádorovým xenograftům *in vivo*. Cílem této práce bylo porovnání hladiny transkriptů 41 klíčových genů *KRAS* signální dráhy mezi jednotlivými buněčnými liniemi, lišícími se jak genetickým profilem (včetně přítomnosti *KRAS* aktivující mutace), tak i biologickým chováním, agresivitou a přežíváním. Změny v expresi u buněčných linií s přítomnou *KRAS* mutací (MIA PaCa-2 a PaCa-44) byly srovnávány s kontrolní *KRAS* divokou buněčnou linií BxPC-3. Dále byly studovány změny v genové expresi této dráhy způsobené podáním cytostatik (experimentálních taxanů) u parentálních buněčných linií *in vitro* i *in vivo* v nádorech chemo-naivních xenograftů a xenograftů léčených cytostatiky.

Pochopení významu *KRAS* signální dráhy pro průběh onemocnění může otevřít nové léčebné možnosti pro pacienty s duktálním adenokarcinomem pankreatu. Tato práce navazuje na pilotní projekt analýzy genů *KRAS* signální dráhy, jako potenciálních prognostických biomarkerů u pacientů s duktálním adenokarcinomem, kteří podstoupili radikální chirurgický výkon.

2 Teoretická část

2.1 Karcinom pankreatu

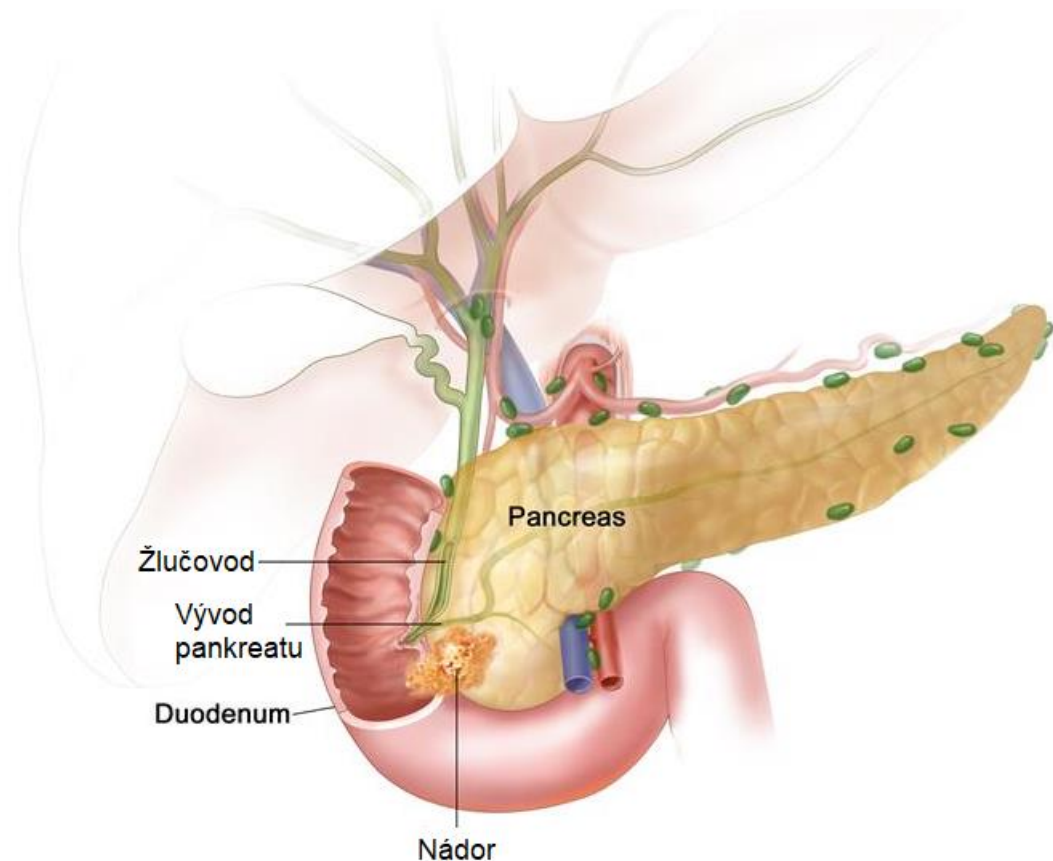
Duktální adenokarcinom pankreatu (PDAC) je závažné onemocnění, kterému ročně podlehe více než 227 000 lidí po celém světě (Raimondi *et al.*, 2009). Klíčová je zde včasná diagnostika, avšak u většiny pacientů dochází k určení diagnózy pozdě, kdy už je onemocnění v pokročilém inoperabilním stádium a tvoří se vzdálené metastázy. Průměrná doba přežití s pokročilým karcinomem pankreatu činí 6-12 měsíců. Léčba časných stadií, zahrnující chirurgickou resekci a následnou adjuvantní onkologickou léčbu, může pacientovi navýšit dobu přežití v průměru o 2 roky (Spalding, 2011).

Je známa řada rizikových faktorů, které přispívají k rozvoji karcinomu pankreatu. Jde převážně o onemocnění starších osob s mediánem 73 let. Jedním z uváděných rizikových faktorů je kouření cigaret, které až zdvojnásobuje riziko vzniku rakoviny pankreatu. Dalšími publikovanými faktory jsou obezita, diabetes mellitus, chronická pankreatitida a *Helicobacter pylori* (Lowenfels *et Maisonneuve*, 2006; Maitra *et Hruban*, 2008).

Na rozvoj karcinomu pankreatu mají vliv i dědičné predispoziční faktory. Minimálně 5-10 % PDAC je způsobeno vrozenými mutacemi (Brand *et al.*, 2007). Nejčastěji se mutace nachází v genu *BRCA2*. Lidé s mutací v tomto genu mají až dvakrát vyšší pravděpodobnost výskytu rakoviny pankreatu (Klein *et al.*, 2004). Zvýšené riziko je spojené i s *BRCA1* mutacemi. Genetické syndromy, jako je dědičná pankreatitida způsobená mutacemi v *PRSS1* (Rebours *et al.*, 2009), Peutz-Jeghersův syndrom způsobený mutacemi zárodečné linie v *STK11* (Giardiello *et al.*, 1987) nebo familiární adenomatózní polypóza způsobená mutacemi zárodečné linie v *APC* (adenomatosis polyposis coli) také zvyšují riziko rozvoje tohoto onemocnění (Giardiello *et al.*, 1993).

Nejčastějším histologickým typem zhoubného nádoru pankreatu je duktální adenokarcinom, který se může rozvinout buď z pankreatické intraepiteliální neoplazie, což je nejčastější možnost, nebo z intraduktální papilární mucinózní neoplazie či pankreatické mucinózní cystické neoplazie (Vincent *et al.* 2011).

Duktální adenokarcinom pankreatu nejčastěji vzniká v hlavě pankreatu odkud se šíří do lymfatických tkání, peritoneálních dutin, sleziny a hematogenně do vzdálených orgánů, nejčastěji jater a plic. Charakteristické je pro něj nízké zastoupení nádorových buněk v poměru k výraznému okolnímu vazivovému stromatu (výrazná desmoplazie), s hojným výskytem fibroblastů, zánětlivých buněk a stelátových buněk (Jaster, 2004).



Obrázek 1. Karcinom v oblasti hlavy pankreatu. Stádium IIA zasahující do duodena (Převzato a upraveno z webové stránky National Cancer Institute).

2.1.1 Epidemiologie

V roce 2012 bylo celosvětově nově diagnostikováno 338 000 lidí, čímž se karcinom pankreatu řadí na 12. místo v žebříčku nejčastějších nádorů a je 7. nejčastější příčinou úmrtí na zhoubná onemocnění (Ferlay *et al.*, 2012). 94 % pacientů umírá do pěti let od diagnózy (Rossi *et al.*, 2014). V České republice v roce 2015 dosahovala incidence 9.34 na 100 000 lidí a s mortalitou 8.05 na 100 000 se řadí na 4. místo mezi zhoubnými nádory. Ve srovnání s ostatními zeměmi světa se Česká republika svou vysokou incidencí PDAC řadí na 2. místo po Arménii. S vyšším věkem člověka se i zvyšuje pravděpodobnost rozvoje karcinomu pankreatu.

Procento nově diagnostikovaných PDAC je proto nejvyšší ve věku 70-74 let (internetový zdroj: SVOD).

2.1.2 Diagnostika

Karcinom pankreatu se obvykle klinicky manifestuje až v pokročilé fázi nemoci. Mezi časté příznaky nádorů slinivky břišní patří žloutenka (ikterus) způsobená obstrukcí žlučových cest, jež má za následek zvýšené množství konjugovaného bilirubinu a absenci urobilinogenu, což se projeví tmavou močí a světlou stolicí. Další časté příznaky pokročilého onemocnění jsou bolesti epigastria a zad, úbytek na váze, nauzea a zvracení (Freelove *et* Walling, 2006). Všechny tyto symptomy jsou nespecifické, poukazují na závažný problém, ale nediodagnostikují karcinom pankreatu. K diagnostice se využívají zobrazovací metody, jako je ultrasonografie, endoskopická ultrasonografie (EUS) s aspirační biopsií (FNAB; fine needle aspiration biopsy), vypočetní tomografie (CT), magnetická rezonance (MRI) či pozitronová emisní tomografie (PET) (Spalding, 2011), v kombinaci s laboratorním vyšetřením onkomarkerů, jako je karbohydrátový antigen 19-9 (CA19-9). Pro stanovení definitivní diagnózy s následnou terapií je nezbytná histologická verifikace nádoru.

2.1.3 Léčba

Prognóza tohoto onemocnění je velmi špatná. Jediná potenciálně kurativní léčba je radikální resekce tumoru. Bohužel pouze u 15-20 % pacientů je možné operativní odstranění (Li *et al.* 2004). Odstranění nádoru se provádí Whippleovou operací, při které je kromě hlavy pankreatu odstraněna i distální část žaludku a duodenum (Freelove *et* Walling, 2006). V případě, že se nádor nachází v těle a ocasu pankreatu je prováděna distální pankreatektomie spolu se splenektomií. V následné adjuvantní léčbě se využívají režimy založené na nukleosidových analogích (gemcitabin, 5-fluorouracil), eventuálně v kombinaci s radioterapií (Rossi *et al.*, 2014).

U většiny nemocných s inoperabilním onemocněním je prvním cílem léčby zajištění hepatobiliární drenáže (zavedení stentu). Výběr paliativní onkologické léčby závisí na výkonnostním stavu nemocného a rozsahu onemocnění.

U nemocných s lokálně pokročilým či generalizovaným onemocněním v dobrém celkovém stavu je indikována kombinovaná chemoterapie (FOLFIRINOX, gemcitabin/nab-paclitaxel), či monoterapie gemcitabinem. Další léčebnou možností je i radioterapie, eventuálně konkomitantní chemoradioterapie. U všech nemocných je léčebný záměr plánován nejen v závislosti na rozsahu nádorového onemocnění (stádium), ale také na výkonnostním stavu (Lemstrova *et al.* 2016).

2.1.4 Molekulární onkologie

V nádorové tkáni karcinomu pankreatu bylo nalezeno více než 60 genetických alterací (Jones *et al.*, 2008). Až v 90 % karcinomů pankreatu se nacházejí mutace v onkogenu *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), velmi časté jsou také somatické mutace a homozygotní delece vedoucí k inaktivaci tumor supresorových genů jako je *CDKN2A*, *TP53*, *MADH4* a *BRCA2* (Caldas *et Kern*, 1995; Li *et al.*, 2004). Genetické abnormality byly nalezeny i u genů kódující růstové faktory a zejména jejich receptory, což vede k ovlivnění signálních drah zapojených do kontroly růstu a diferenciace buněk. Ve tkáních karcinomu pankreatu dochází často k vysoké expresi epidermálního růstového faktoru, vaskulárního endoteliálního růstového faktoru a cytokinů jako je interleukin 1, interleukin 8 či tumor nekrotizující faktor α (Li *et al.*, 2004).

2.2 Postavení taxanů v terapii karcinomu pankreatu

Taxany, chemicky diterpeny, jsou získávány z různých druhů tisů. Využívají se jako cytostatika, především pak paclitaxel a docetaxel. Jedná se o toxické látky, často také označované jako vřeténkové jedy, jelikož narušují funkci mitotického vřeténka vazbou na mikrotubuly (Fauzee *et al.*, 2011).

Mikrotubuly jsou častým strategickým cílem při léčbě nádorových onemocnění. Jsou složeny ze dvou proteinových podjednotek, α a β tubulinu, jež obsahují vazebné místo pro guanosintrifosfát (GTP). Jejich hlavní funkcí je tvorba mitotického vřeténka během buněčného dělení. Další, neméně důležitou funkcí je intracelulární transport. Podílí se také na udržování tvaru a pohyblivosti buňky. Mechanismus působení taxanů tedy spočívá v navázání na β podjednotku tubulinu, což zapříčiní polymeraci a inhibici depolymerace mikrotubulů. Z dynamického nestabilního mikrotubulu se tímto stává stabilní, čímž dochází k narušení

přirozené rovnováhy, inhibici mitózy a apoptóze buňky (Schiff *et* Horwitz, 1981; Pronk *et al.*, 1995).

Paclitaxel (Taxol) byl poprvé izolován a charakterizován v roce 1971 z tisů tichomořského (*Taxus brevifolia*) (Wani *et al.*, 1971). Analog paclitaxelu, docetaxel (Taxotere; RP 56976) je semisyntetická látka, připravena z 10-deacetylbaecatinu III, jež se nachází v jehlicích tisů červeného (*Taxus baccata*) (Lavelle, Gueritte-Voegelein *et* Guenard, 1993). Oba taxany jsou metabolizovány v játrech cytochromem P450 a vylučovány žlučí. Mezi těmito dvěma taxany jsou také určité rozdíly. Docetaxel vykazuje vyšší afinitu k β tubulinu, také je 2x více účinnější při inhibici depolymerace mikrotubulů a indukuje fosforylaci proteinu Bcl 2 vedoucí ke smrti buňky při 100x nižší koncentraci, než je vyžadována při použití paclitaxelu (Halder *et al.*, 1997; Gligorov *et* Lotz, 2004).

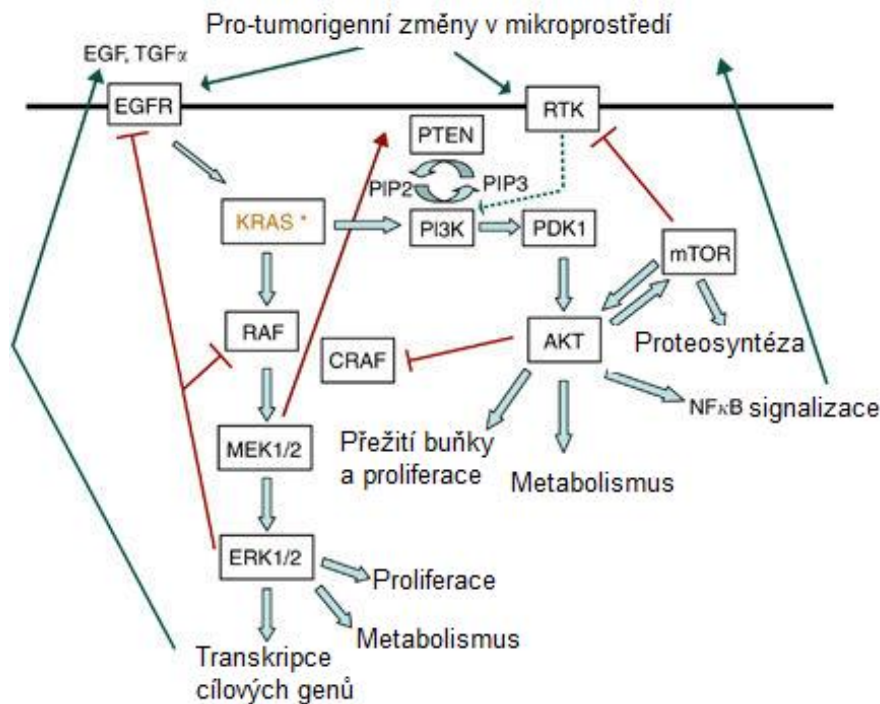
Taxany jsou v klinické praxi podávány pacientům intravenózně. Jelikož se však jedná o látky hydrofóbní, je jejich rozpustnost ve vodě zajištěna polyoxyetylovaným ricinovým olejem (cremofor EL; CreEL). Použití cremoforu EL však s sebou přináší řadu vedlejších účinků jako hypersenzitivní reakci, poruchy lipidového metabolismu, agregaci erytrocytů či periferní neuropatii (Gelderblom *et al.*, 2001). Z hlediska lepšího profilu toxicity a protinádorové účinnosti byly tedy navrženy nové strategie pro zlepšení rozpustnosti a farmakologie taxanů, včetně albuminových nanočástic, emulzí a liposomů. Pro eliminaci toxicity spojené s rozpouštědlem polyetylovaného ricinového oleje byla vyvinuta nová kompozice paclitaxelu, nab-paclitaxel (nanoparticle albumin-bound paclitaxel). Jedná se o částici o velikosti 130 nm, tvořenou z paclitaxelu homogenizovaného spolu s lidským sérovým albuminem (Thota *et al.*, 2014).

U karcinomu pankreatu se uvádí účinnost kombinovaných chemoterapeutických režimů s využitím taxanu a nukleosidového analoga či platinového derivátu 20-60 % (Lemstrova, Melichar *et* Mohelníková-Duchoňová, 2016). Od roku 2013 se stal nab-paclitaxel v kombinaci s gemcitabinem novou léčebnou možností pro pacienty s metastatickým karcinomem slinivky břišní, a to na podkladě výsledků klinické studie IMPACT (Von Hoff *et al.*, 2013). Tato studie prokázala, že přidáním taxanu k monoterapii gemcitabinem se významně prodlužuje doba celkového přežívání (OS, overall survival) pacientů. Tyto povzbudivé výsledky oživily diskusi o potenciálním využití taxanů v léčbě karcinomu pankreatu, a v současnosti jsou z tohoto hlediska intenzivně studovány.

2.3 KRAS protoonkogen a signální dráhy s ním spojené

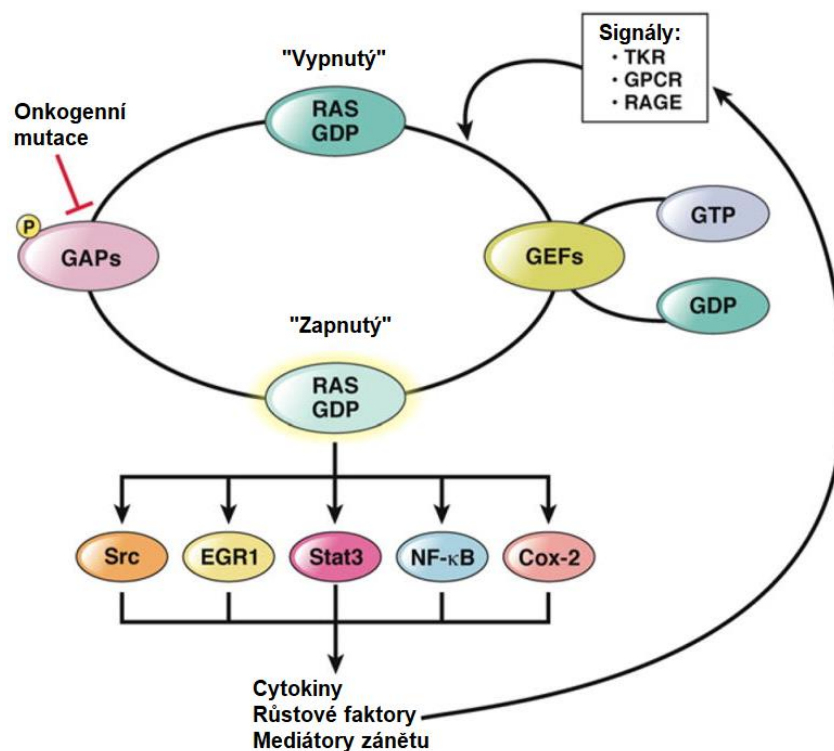
Onkogeny jsou mutačně aktivované geny (protoonkogeny), jež přispívají k onkogenezi. Mohou být aktivovány prostřednictvím několika mechanismů včetně bodové mutace nebo amplifikace genu. Právě bodové mutace v onkogenu *KRAS* mají za následek permanentní aktivaci proteinu RAS, jenž vede k zvýšené proliferaci, angiogenezi a migraci buněk, a zároveň k potlačení apoptózy a diferenciaci a tím k rozvoji ductálního adenokarcinomu pankreatu (Maertens *et al.*, 2014; Mann *et al.*, 2016).

KRAS gen kóduje protein P21 RAS, což je malá guanosintrifosfatáza (GTPáza), která propojuje extracelulární signály pro intracelulární efektorové dráhy. P21 RAS je lokalizován na vnitřním povrchu buněčné membrány a interaguje s více než dvaceti efektorovými proteiny (Bournet *et al.*, 2016). RAS proteiny společně se svými dvěma klíčovými regulátory GEF (Guanin nucleotide exchange factor) a GAP (GTPase activating protein) tvoří molekulární „přepínač“, který je spuštěný či vypnutý dle navázání buď GTP, nebo GDP. GEF aktivuje RAS výměnou GDP za GTP, naproti tomu GAP deaktivuje RAS hydrolyzou GTP na GDP (Bos *et al.*, 2007). Tato aktivace RAS je stimulována pomocí receptorů růstových faktorů jako je například EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor; epidermal growth factor receptor). Po navázání příslušných ligandů (v tomto případě epidermálního růstového faktoru; EGF) dochází k homodimerizaci receptorů a je zahájena fosforylační kaskáda, čímž dojde k aktivaci proteinu GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2; receptor růstového faktoru vážící protein 2) a GEF, který odstraní GDP z RAS a tím je umožněna vazba GTP a následná aktivace RAS. V případě mutace *KRAS* genu dochází ke konstitutivní trvalé vazbě s GTP, což má za následek trvalou aktivaci *KRAS* nezávislou na ligandu a deregulaci čtyř nejvýznamnějších efektorových signálních drah nacházejících se níže pod RAS proteinem, konkrétně RAF/MAPK, PI3K/PDK1/AKT, RAL guanine nucleotide exchange factor a RIN1/ABL dráhy (Obrázek 2).



Obrázek 2. Přehled signálních drah Raf/MAPK a PI3K/PDK1/Akt řízených onkogenním KRAS u rakoviny pankreatu. Aktivace pro-tumorigenních signalizačních spojení jsou zobrazeny jako zelené šipky, inhibiční anti-tumorigenní dráhy jsou zobrazeny jako plně červené čáry vedené svislou čarou a červené šipky znázorňují aktivační anti-tumorigenní zpětné smyčky (Převzato a upraveno od Eser *et al.*, 2014).

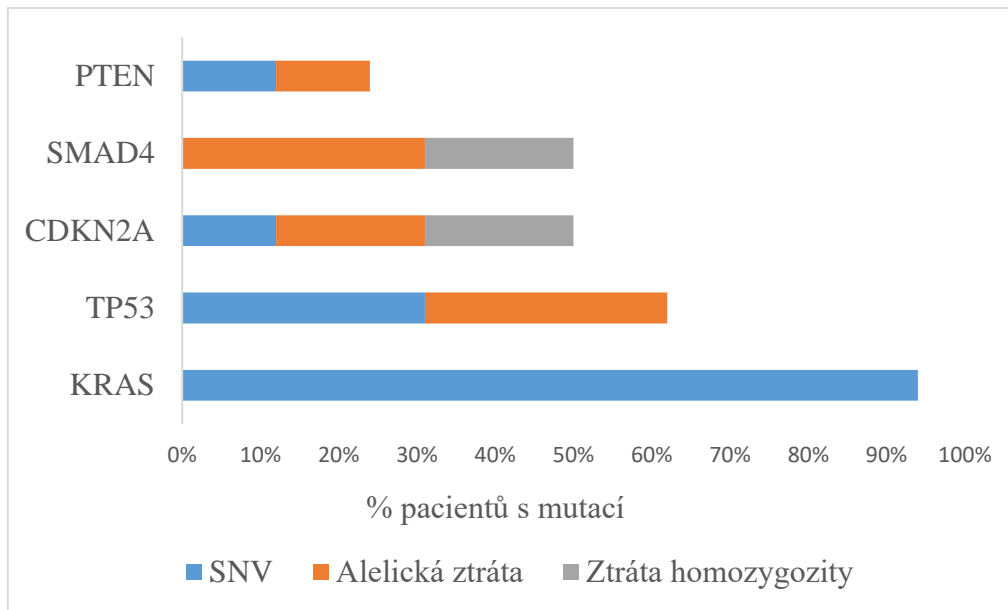
„Zapnutý“ KRAS tedy reaguje s velkým množstvím downstream signálních drah. Některé z těchto signálních drah vedou ke tvorbě signálů, které aktivují KRAS prostřednictvím pozitivní zpětnovazební smyčky. Například mediátory zánětu, které jsou aktivovány prostřednictvím KRAS, následně vedou k další aktivaci KRAS. GAP za normálních podmínek zajišťuje velmi rychlou inaktivaci KRAS, v přítomnosti onkogenní formy KRAS ovšem dochází k opoždování inaktivace, což může vést k rozvoji rakoviny. Celý tento mechanismus je schématicky znázorněn na obrázku 3.



Obrázek 3. Fungování KRAS a zpětnovazební smyčka mezi KRAS a zánětem (Převzato a upraveno od Di Magliano *et* Logsdon, 2013). TKR (tyrozinkinázový receptor), GPCR (G protein-coupled receptor; receptor spřažený s G proteinem), RAGE (receptor for advanced glycation end products; receptor pro konečné produkty pokročilé glykace).

U více než 90 % PDAC je nalezena bodová mutace v *KRAS* genu, jedná se tedy o nejfrekventovanější změnu v *KRAS* genu v lidských nádorech vůbec. Mutace postihují zejména kodony 12, 13 a 61 a jsou nalézány v časných stádiích, včetně prekanceróz. Ve většině případů se však mutace vyskytují ve dvanáctém kodonu, kde v jejich důsledku dochází k záměně glycinu na aspartát (G12D) nebo valin (G12V), vzácně však byly nalezeny i mutace v kodonu G13 a Q61. (Almoguera *et al.*, 1988; Hruban *et al.*, 1993; Koorstra *et al.*, 2008b; Mann *et al.*, 2016). Nádory nesoucí *KRAS* Q61 mutaci, vykazují nižší MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza; mitogen-activated protein kinase) aktivitu oproti nádorům s mutacemi na kodonech G12 nebo G13 a jsou také spojeny s lepší prognózou (Witkiewicz *et al.*, 2015).

V grafu 1. je uvedeno pět genů, u nichž dochází velmi často buď k bodovým mutacím nebo k homozygotní či heterozygotní ztrátě v počtu kopií v průběhu karcinogeneze PDAC. Výskyt mutací je uváděn na procento pacientů, u kterých k mutaci došlo. Z grafu je také patrné, že nejčastěji se mutace vyskytuje v *KRAS* genu, jak již bylo uvedeno výše.



Graf 1. Přehled nejčastěji zasažených genů bodovou mutací a heterozygotní nebo homozygotní ztrátou počtu kopií (Di Marco *et al.*, 2015). SNV (single-nucleotide variant; jednonukleotidová varianta).

2.3.1 RAS/RAF/MAPK signální dráha

2.3.1.1 RAS

RAS je rodina malých GTPáz, neboli G-proteinů s molekulovou hmotností 20-40 kDa. Jsou známy tři malé G-proteiny, které jsou schopny transformace savčích buněk bodovou mutací: HRAS (Harvey-RAS), NRAS (Neuroblastoma-RAS) a KRAS (Kirsten-RAS). Všechny tyto proteiny váží jak GDP, tak GTP a vykazují GTPázovou aktivitu, která je mnohdy nezbytná k ukončení funkce proteinů, není ovšem nutně potřebná pro plnění jejich funkce. RAS proteiny vykazují různou schopnost aktivace jak RAF/MAPK, tak PI3K/PDK1/AKT dráhy (Yan *et al.*, 1998).

K aktivaci RAS dochází, když je tyrozinkinázový receptor (např. EGFR) obsazen ligandem, což vede k fosforylaci receptoru a k interakci se signalizačními prvky jako je SHC (SHC adaptor protein), které se poté vážou s GRB2 a nakonec s GEF SOS (Son of sevenless). Působením SOS dochází k nahrazení GDP za GTP, který mění konformaci RAS a tím umožní RAS komunikaci s více efektorů (např. PI3K, Raf, Tiam1 nebo Ral GEF) (Matallanas *et al.*, 2010).

V rámci ERK signalizace RAS zaujímá funkci adaptoru, který se váže s Raf efektořem s vysokou afinitou. To má za následek jejich translokaci do buněčné membrány, kde je Raf aktivován prostřednictvím PHB (Prohibitin) (Jelinek *et al.*, 1996; Rajalingam *et al.*, 2005).

Pro správnou funkci RAS proteinu je nutné jeho ukotvení na vnitřní stranu buněčné membrány, čehož je dosaženo prenylací. Prenylace představuje připojení izoprenylového lipidového řetězce k cysteinovému reziduu C-konce proteinu RAS a je zprostředkována enzymy farnesyltransferázou či geranylgeranyltransferázou. Farnesylová skupina představuje lineární seskupení tří izoprenových jednotek. Geranylová skupina vzniká lineárním spojením dvou izoprenových jednotek, a geranylgeranylace tak znamená připojení lineárního seskupení čtyř izoprenových jednotek. RAS přednostně prochází farnesylací, je-li však přítomen inhibitor farnesylace, NRAS a KRAS mohou projít geranylgeranylací. Tyto posttranslační modifikace mohou být potenciálně využity k terapii (Křížková, 2014; McCubrey *et al.*, 2007). Lokalizace RAS na vnitřní straně membrány umožňuje interakci s výměnným proteinem SOS.

2.3.1.2 RAF

Raf kinázy, zahrnující A-Raf, B-Raf a Raf-1 (C-Raf), jsou efektořy KRAS, zprostředkovávající aktivaci MAP kinázy. Gen A-Raf se nachází u člověka na chromozomu X. Nejvíce je exprimován u dospělého člověka v urogenitálním traktu a je nejslabší Raf kinázou, co se týče aktivace ERK.

B-Raf gen je lokalizován na chromozomu 7q34 a nejvyšší exprese je ve varlatech a nervové tkáni. Aktivita B-Raf a Raf-1 je negativně regulována fosforylací Akt. B-Raf je nejsilnějším Raf z hlediska indukce MEK aktivity. Raf-1 je lokalizován na 3p25 chromozomu, je exprimován v lidských tkáních, především pak ve svalech a v mozečku (Steelman *et al.*, 2004). Zajímavostí je, že tvorba plicních nádorů u myši je nepřítomností Raf-1 blokována, na vývoj karcinomu pankreatu má však absence Raf-1 minimální vliv (Eser *et al.*, 2013).

Raf proteiny mají tři různé funkční domény: CR1, CR2 a CR3. CR1 je důležitá pro vazbu s RAS a následnou aktivaci, CR2 je regulační doména a CR3 je kinázová doména. Delece domény CR1 a CR2 má za následek konstitutivní aktivaci Raf proteinu (Steelman *et al.*, 2004). Aktivace tří Raf izoform je složitý proces. Dochází k aktivaci B-Raf prostřednictvím RAS nezávisle na Src (SRC protoonkogen, nereceptorická tyrosinkináza) aktivitě, zatímco pro úplnou aktivaci Raf-1 a A-Raf je Src aktivita vyžadována (Marais *et al.*, 1997; Chong *et al.*, 2001).

B-Raf může být aktivován pomocí interakce s Rap-1, což může sloužit zároveň jako inaktivace Raf-1. B-Raf lze také aktivovat díky Raf-1 přes interakci s RAS-GTP (Mizutani *et al.*, 2001). Akt a SGK mohou fosforylovat B-Raf, což má pro změnu za následek jeho inaktivaci. Aktivovaný Raf následně fosforyluje kinázy MEK1 a MEK2, což zase vede k aktivaci serin/threonin kináz ERK1 a ERK2.

2.3.1.3 MEK

MEK proteiny jsou primárním cílem Raf. Rodina genů MEK má pět genů: *MEK1*, *MEK2*, *MEK3*, *MEK4* a *MEK5*. Rodina má duální, serin/threonin a tyrosin kinázovou aktivitu. Struktura MEK se skládá z regulační, amino-terminální domény a karboxy-terminální domény, jež váže MAPK. Karboxy-terminální doména je také nezbytná pro vazbu a aktivaci ERK. Delece v regulační oblasti MEK1 má za následek konstitutivní aktivaci MEK1 a ERK (Huang *et al.*, 1995; Tanoue *et al.*, 2001; Crews *et al.*, 1992). MEK1 je protein složený z 393 aminokyselin, s molekulovou hmotností 44 kDa. Jeho největší exprese je v mozkové tkáni (Crews *et al.*, 1992).

Různé izoformy Raf rozdílně aktivují MEK1 a MEK2. A-Raf je slabým aktivátorem, B-Raf aktivuje MEK1 přednostně a Raf-1 účinně aktivuje MEK1 i MEK2 (Koloch, 2000).

2.3.1.4 ERK

Do rodiny ERK spadají čtyři různé rodiny kináz: ERK, JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase), p38MAPK a ERK5. Existují také kinázy ERK3, ERK4, ERK6, ERK7 a ERK8, které ačkoli jsou příbuzné s ERK1 a ERK2, mají jiný způsob aktivace. MAP kinázy ERK1 a ERK2 jsou 44 a 42 kDa serin/threonin kinázy. ERK1 i ERK2 jsou exprimovány téměř ve všech savčích tkáních, obecně je však ERK2 ve vyšším množství. ERK jsou aktivovány duální fosforylací tyrosinových a threoninových zbytků prostřednictvím MEK1. Po fosforylaci následuje dimerizace ERK, která udržuje ERK aktivované. Fosforylované ERK jsou přenášeny z cytoplasmy do jádra, aby mohli fosforylovat celou řadu transkripčních faktorů včetně Ets-1, c-Jun a c-Myc. Navíc může ERK nepřímo vést k aktivaci transkripčního faktoru NF-κB (nukleární faktor κB). ERK mohou fosforylovat i mnoho proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu. Zvýšená aktivita ERK2 je asociována s buněčnou proliferací, zatímco

aktivita ERK1 může v určitých buňkách inhibovat účinek ERK2 (Steelman et al., 2004; Pouyssegur et al., 2002; McCubrey et al., 2007).

2.3.2 PI3K/PDK1/AKT signální dráha

2.3.2.1 PI3K

Druhou neméně významnou efektorovou dráhou KRAS je PI3K/PDK1/AKT dráha, jejíž alterace nacházíme u řady nádorů, včetně karcinomu pankreatu. Jde o dráhu důležitou pro regulaci buněčného cyklu. PI3K je to rodina proteinů, jenž katalyzuje přenos fosfátu z ATP do fosfoinositidů. PI3K molekuly jsou složeny z různých katalytických podjednotek, které patří do jedné ze tří tříd (I, II a III). Molekuly třídy I jsou p110 podjednotky (α , β , γ a δ) a jsou kódovány čtyřmi různými geny (*PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CG* a *PIK3CD*) (Castellano *et al.*, 2011). Třída I je regulována aktivací receptoru růstového faktoru. Třída II je jeden peptid o velikosti 170-210 kDa s karboxy-terminální C2 doménou nezbytnou pro vazbu fosfolipidů a kinázovou aktivitu (Misawa *et al.*, 1998).

K aktivaci PI3K třídy I dochází translokací k plazmatické membráně a spojením s aktivovaným tyrosin-kinázovým receptorem (Van der Geer *et al.*, 1994). Aktivaci lokalizace PI3K na membráně má na svědomí IL-3 receptor, RAS nebo místa bohatá na prolin například u Shc, Grb2, v-Src a dalších (Steelman *et al.*, 2004). Tyto interakce vedou k aktivaci produkce fosfatidylinositolového-3-fosfátu a/nebo fosfatidylinositolového-3,4,5-trifosfátu. První zmíněný je degradován fosfatázou, stejně tak tumor-supresorový gen PTEN. Kinázová aktivita PI3K je inhibována cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) (Kim *et al.*, 2001). Fosfolipidové produkty PI3K aktivují PDK, Akt a PKC (Proteinkináza C). Aktivní PI3K tedy stimuluje produkci PIP3 z PIP2, který váže a odvádí Akt i PDK1 na membránu, prostřednictvím čehož je Akt aktivován přes fosforylaci.

PDK je serin/threonin kináza o hmotnosti 63 kDa. Rodina PDK má dva členy, konkrétně PDK1 a PDK2. PDK1 je exprimován ve všech lidských tkáních a obsahuje důležitou doménu PH (pleckstrin homology), stejně jako Akt-kináza, která jim umožňuje vazbu s fosfoinositidy a dostává je tak to do vzájemné blízkosti. PDK1 fosforyluje Akt, ale pouze na Threoninu³⁰⁸, pro úplnou aktivaci Akt je však nezbytná i fosforylace na Serinu⁴⁷³, kterou zajišťuje PDK2 (Alessi *et al.*, 1996; Křížková, 2014; Nicholson *et al.*, 2002; Vanhaesebroeck *et al.*, 2000).

2.3.2.2 AKT

Akt neboli proteinkináza B, se skládá ze tří domén, a to z PH domény, kinázové domény a regulační domény. PH doména interaguje s lipidy a zaměřuje se na aktivované membránové proteiny. Rodina Akt genů zahrnuje tři geny: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) a Akt3 (PKB γ). Akt1 se nachází na chromozomu 14q32, Akt2 byl mapován v chromozomální oblasti 19q13.1-q13.2. Nejvyšší exprese Akt1 a Akt2 je v mozku, brzlíku, srdci a játrech. Akt3 je nejvíce exprimován v mozku a varlatech (Nicholson *et al.*, 2002).

Akt má vliv na buněčný cyklus, proliferaci prostřednictvím cyklinů, transkripci prostřednictvím transkripčních faktorů FOX (Forkhead box) a také na přežití buňky. Antiapoptotické účinky Akt jsou zajištěny fosforylací celé řady molekul. Jednou z nich je i BAD, člen Bcl-2 (B-cell lymphoma) rodiny, kterému fosforylace umožňuje interakci s proteiny, jenž podporují přežití buňky (Datta *et al.*, 1997). Interakce BAD s těmito proteiny, zároveň inhibuje jeho schopnost interakce s Bcl-2 a Bcl-XL, což umožňuje Bcl-XL vázat se s pro-apoptickou molekulou Bax a zabránit tak tvorbě pro-apoptických Bax homodimerů, čímž je inhibována apoptóza (Steelman *et al.*, 2004). Aktivace Akt může být negativně regulována defosforylací PIP3 prostřednictvím PTEN (Morimoto *et al.*, 2000). Akt má také na svědomí aktivaci mTORC1 komplexu.

2.3.2.3 mTOR

mTOR (mammalian target of rapamycin) je serin/threonin kináza, která prezentuje dva rozdílné komplexy. mTOR komplex 1 (mTORC1) reaguje na růstové faktory, energetický stav, buněčný stres a aminokyseliny (Sengupta *et al.*, 2010). Komplex mTORC1 obsahuje kromě mTOR také protein RAPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) a PRAS40 (Proline-rich Akt substrate 40 kDa). mTORC1 řídí buněčný růst tím, že řídí celou řadu procesů, které regulují syntézu a degradaci proteinů. V případě, že je Akt neaktivní, TSC1/2 inhibuje RHEB, zatímco PRAS40 inhibuje mTORC1. Poté, co je Akt aktivován, fosforyluje TSC1/2 a PRAS40, což má za následek vazbu RHEB s GTP, který přímo aktivuje mTORC1, čímž je negativní zpětnou vazbou inhibován Akt (Mendoza *et al.*, 2011; Guertin *et al.*, 2007).

mTORC2 obsahuje také mLST8, v komplexu se už ale nenachází RAPTOR a PRAS40, ale RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin), mSIN1 (mitogen-activated protein kinase-associated protein 1) a PROTOR. mTORC2 může regulovat

PKC α fosforylaci a v PI3K dráze se podílí na buněčném růstu, proliferaci a přežití buňky (Guertin *et Sabatini*, 2007).

2.3.3 RAL guanine nucleotide exchange factor signální dráha

Ral GTPáza vykazuje téměř 60 % podobnost s RAS. Stejně jako RAS, Ral proteiny vykazují velmi vysokou afinitu s GDP a GTP. Obě skupiny proteinů se také nachází výlučně na buněčných membránách (Frech *et al.*, 1990; Bhullar *et al.*, 1990). V řadě důležitých aspektů se však od sebe RAS a Ral liší. Každý z nich například interaguje s rozdílným GAP. Mají také rozdílný vliv na buňky. Konstantně aktivní Ras má za následek onkogenní transformaci, zatímco Ral nikoli. Odlišnosti jsou pravděpodobně důsledkem rozdílných efektorových domén u těchto GTPáz (Urano *et al.*, 1996). Zprostředkovatelem komunikace mezi RAS a Ral je Ral-GEF, který může u Ral proteinů vyvolat ztrátu GDP a navázání GTP. Interakce mezi Ral-GEF a RAS má za následek konformační změnu v Ral-GEF, která aktivuje GEF, dochází tedy k přenosu GTP na Ral a aktivaci RalA a RalB GTPáz (Weinberg, 2013).

2.3.4 RIN1/ABL signální dráha

ABL (Abelson tyrozin kináza) proteiny regulují cytoskeletární remodelaci v průběhu adheze a motility, obsahují díky tomu vazebná místa pro aktin a fosforylují proteiny kontrolující dynamiku cytoskeletu (Van Etten *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2004). Aktivace ABL kinázy je usnadněna autofosforylací nebo fosforylací zprostředkovanou kinázou SRC (Plattner *et al.*, 1999).

RIN1 (Ras a Rab interaktor 1) je RAS efektorový protein (Han *et al.*, 1997), který organizuje downstream signály podílející se na adhezi a migraci buněk. Je to také vazebný partner pro ABL1 a ABL2.

Interakce mezi RIN1 a ABL je iniciována mezi motivem bohatým na prolin na RIN1 a doménou SH3 na ABL. ABL následně fosforyluje RIN1 a dochází k vazbě SH2 domény ABL na pY (RIN1). RIN1 podporuje fosforylaci ABL substrátů CRK a CRKL, které koordinují funkci CAS (cellular apoptosis susceptibility protein) a dalších proteinů. (Hu *et al.*, 2005). Tyrosinová fosforylace CRK/CRKL vede k intramolekulární interakci SH2-pY, která narušuje intermolekulární interakci s CAS a inhibuje buněčnou motilitu (Feller, 2001).

2.4 Úloha KRAS u karcinomu pankreatu

Jak už bylo výše uvedeno, *KRAS* je protoonkogen, patřící do RAS rodiny kódující proteiny vážící GDP nebo GTP. Zprostředkovává řadu buněčných funkcí včetně proliferace, diferenciaci, apoptózy nebo buněčné migrace. *KRAS* gen kóduje lidský buněčný homolog genu izolovaného z Kirstenova viru sarkomu krysy. Zatímco nemutovaný divoký typ (wildtype) *KRAS* hraje důležitou roli v normální tkáňové signalizaci, mutovaný gen se vyskytuje u mnoha onkologických onemocnění. Mutace v *KRAS* jsou detekovány v 30 % benigních pankreatických lézích a až v 90 % plně rozvinutého PDAC (Weinberg, 1982; Moskaluk *et al.*, 1997; Kranenburg, 2005; Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2009). *KRAS* signální dráha je tedy jedna z klíčových signálních drah pro patogenezi PDAC, nicméně přesný mechanismus, kterým vznik a další průběh PDAC ovlivňuje, není doposud plně objasněn.

2.4.1 Pankreatické prekancerózy

Karcinom pankreatu se vyvíjí z prekursorových prekancerózních lézí. Nejběžnější a nejlépe prozkoumaná je pankreatická intraepiteliální neoplazie (PanIN), může však také postupovat skrze makroskopické léze, mucinózní cystickou neoplazii (MCM) a intraduktální papilární mucinózní neoplazii (IPMN) (Cooper *et al.*, 2013). Léze jsou většinou asymptomatické.

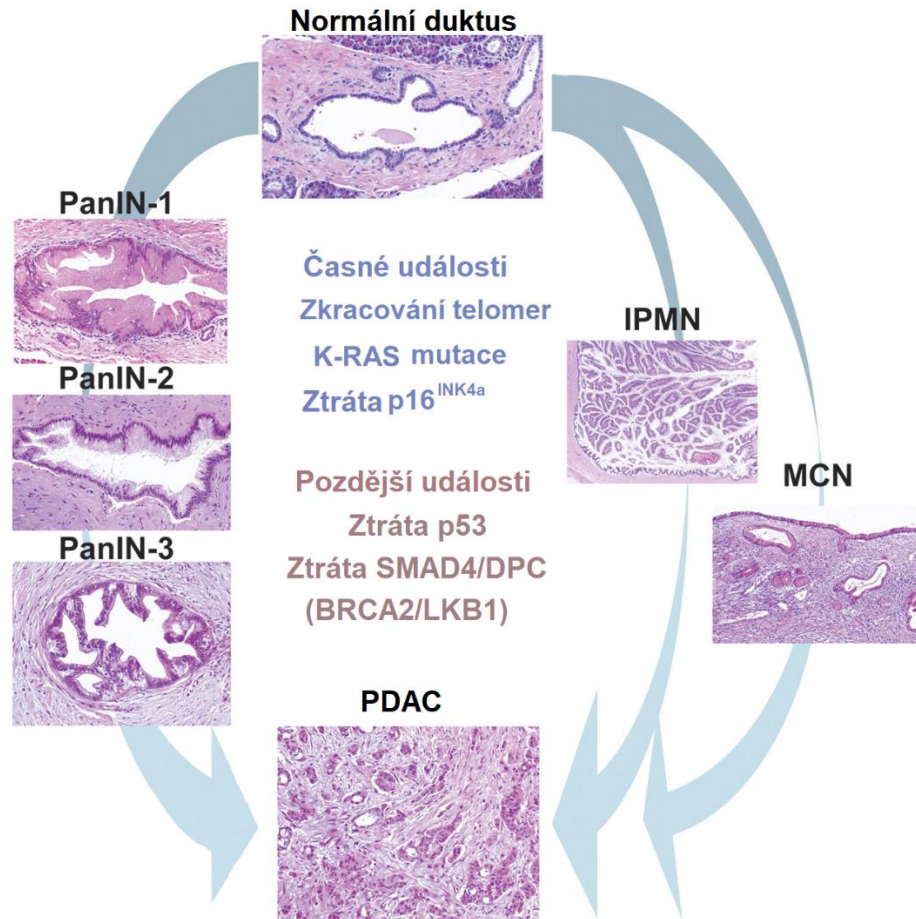
K progresi z PanIN až k metastatickému tumoru je zapotřebí řada specifických genetických změn zahrnujících zkrácení telomer, aktivaci *KRAS* a inaktivaci tumor supresorových genů jako *CDKN2A*. (Almoguera *et al.*, 1988; Smit *et al.*, 1988).

PanIN jsou mikroskopické, ploché nebo papilární léze, složené z buněk obsahujících různé množství mucinu (Zamboni *et al.*, 2013; Distler *et al.*, 2014). PanIN se rozděluje na tři stupně: PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2 a PanIN-3. PanIN-1A a PanIN-1B mají minimum cytologických a strukturních atypií. PanIN-2 již vykazuje mírnou až střední cytologickou a architektonickou atypii. Nejvyšší stupeň představuje PanIN-3 (Koorstra *et al.*, 2008a; Zamboni *et al.*, 2013).

Méně časté jsou prekursorové MCN a IPMN. MCN jsou velké mucin-produkující epiteliální cystické léze. *KRAS* mutace byly detekovány u MCN s nízkou dysplazií. Jaké molekulární změny jsou však základem pro tvorbu a progresy MCN není zcela známo.

IPMN jsou potenciálně maligní epiteliální novotvary, tvořené buňkami sloupcovitého tvaru, produkující mucin (Longnecker *et al.*, 2005; Hruban *et al.*, 2004).

Dělí se na dva typy, IPMN hlavního pankreatického vývodu a IPMN postranních větví (Ikeuchū *et al.*, 2010). Četnost výskytu *KRAS* mutací se u IPMN různí od 38,5 % až po 100 % (Yonezawa *et al.*, 2008).



Obrázek 4. Pankreatické prekursorové léze a genetické události při progresi PDAC. Na obrázku jsou histologické snímky tří prekursorových lézí duktálního adenokarcinomu pankreatu: PanIN, MCM a IPMN. Jsou zde také uvedeny různé genetické změny vedoucí k progresi PDAC (Převzato a upraveno od Hezel *et al.*, 2006).

2.4.2 Onkogenní forma *KRAS* při progresi karcinomu pankreatu

Přítomnost onkogenní formy *KRAS* ještě samo o sobě nemusí nutně vést k rozvoji rakoviny. Lze proto předpokládat, že na zahájení karcinogeneze mají značný podíl i genetické nebo epigenetické faktory a vlivy vnějšího prostředí. Zásadní vliv má i úroveň aktivity *KRAS* (Lu *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2005; Parsons *et Meng*, 2009).

Nejčastěji se mutace v *KRAS* vyskytují na kodonu 12, což vede k substituci glycinu na kyselinu asparagovou, valin nebo arginin. Tyto mutace se vyskytují v tkáni pankreatu

sporadicky i za fyziologických podmínek. U pokročilého adenokarcinomu pankreatu dosahuje frekvence výskytu mutací téměř k 100 % (Klimstra *et Longnecker* 1994; Rozenblum *et al.*, 1997). Mutace mají za následek akumulaci RAS v aktivním GTP vázaném stavu díky udělení rezistence proteinům aktivujícím GTPázu a narušení GTPázové aktivity (Zenker *et al.*, 2007).

2.4.3 Prognostický a prediktivní význam KRAS

Mutace v *KRAS* se nacházejí až u 90 % pacientů s PDAC (Almoguera *et al.*, 1988). Z toho důvod jsou mutace v *KRAS* zkoumány jako možný prognostický faktor pro adenokarcinom pankreatu. Přestože některé, z již provedených analýz mutovaného *KRAS* naznačují, že se jedná o biomarker s možným prognostickým významem, je jeho vztah k prognóze PDAC pacientů v současnosti velmi kontroverzní (Lee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Kullmann *et al.*, 2011). *KRAS* byl také zkoumán jako prediktivní marker pro odpověď na léčbu. Ukázalo se, že aktivace *KRAS* mutacemi intracelulární cestou, nemá vliv na výsledky léčby gemcitabinem.

Chen (Chen *et al.*, 2010) ve své publikaci uvádí, že mutace v 12 kodonu *KRAS* mohou být detekovány v plazmě pacientů s neoperabilním karcinomem pankreatu a mohla by tedy predikovat nízkou dobu přežití u těchto pacientů. K potvrzení těchto výsledků jsou však zapotřebí další výzkumy.

2.4.3 Metabolismus nádoru

Karcinomy pankreatu vytvářejí hypoxické mikroprostředí, jelikož nejsou příliš dobře vaskularizovány a obsahují desmoplázie (Hidalgo *et Maitra*, 2009; Neesse *et al.*, 2011). Hypoxie stabilizuje aktivitu HIF (hypoxia-induced factor; transkripční faktor indukovaný hypoxií), jenž mění metabolismus rakovinných buněk a tím usnadňuje jejich růst i za nepříznivých podmínek (Chaika *et al.*, 2012). Zvýšená hladina proteinu HIF-1 α , má za následek zvýšený metabolismu glukózy, ale omezený vstup glukózy do Krebsova cyklu (Semenza, 2010). Až 10krát vyšší metabolismus glukózy vůči laktátu oproti normální buňce, tzv. Warburgův efekt (Warburg, 1956) je typickým znakem maligních buněk. Onkogenní *KRAS* způsobuje metabolické přeprogramování buňky zvýšením aerobní glykolýzy například zvýšením exprese glykolytických enzymů, jako je Hk1, Hk2, Glut1, Pfk1 a Ldha. Tyto metabolické změny napomáhají nádorovým buňky ke zvýšené produkci biomasy a tím zvyšují

i celkovou proliferaci. *KRAS* tyto změny reguluje kontrolními faktory, které regulují transkripci genů glykolytických enzymů (Ying *et al.*, 2012).

2.4.4 Mikroprostředí PDAC

Mikroprostředí tumoru je v případě PDAC velmi důležitou složkou a potenciálně ovlivňuje tkáňově-specifickou signalizaci prostřednictvím parakrinní aktivace specifických cytokininových nebo tyrozinkinázových receptorů. Nepřetržitá *KRAS* signalizace v pankreatu vytváří mikroprostředí, které podporuje neoplastickou progresi prostřednictvím parakrinní stimulace aktivovanými fibroblasty, pankreatickými hvězdčovitými buňkami a imunitními buňkami hrajícími klíčovou roli nejen u zánětu, ale také nádorových onemocnění (Erkan *et al.*, 2012; Collins *et al.*, 2012). Tato změna v mikroprostředí je přímo spojena s onkogenní *Kras* signalizací, protože inaktivace onkogenního *Kras* v pankreatické neoplazii v raném stádiu může zvrátit fibrotické a zánětlivé změny (Collins *et al.*, 2012).

Je známo, že lidé s chronickým zánětem způsobeným opakovaným a/nebo trvalým poškozením slinivky, mají podstatně vyšší riziko rozvoje rakoviny pankreatu (Yadav *et Lowenfels*, 2013). Trvale zánětlivé mikroprostředí přispívá k narušení protinádorové imunitní odpovědi skrze infiltraci imunosupresivních regulačních T-buněk a myeloidních supresorových buněk (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011; Steele *et al.*, 2013). Navíc zde může docházet k fibrotické remodelaci pankreatické tkáně, díky aktivaci stelátových buněk a fibroblastů zánětlivými podněty, což nakonec vede k zvýšení onkogenní *Kras* signalizace. Zánětlivé podněty tedy zvyšují onkogenní signalizaci *Kras* a ta zároveň sama vede k zánětu a desmoplazii (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011).

2.4.5 Autofagie a progresse PDAC

Autofagie je mechanismus sloužící k odbourávání intracelulárních složek. Poskytnutím energie ve formě ATP a základních stavebních látek jako jsou aminokyseliny, lipidy, cukry a nukleosidy, podporuje přežití buňky pod metabolickým stresem (Rabinowitz *et White*, 2010). Mechanismus kontroly autofagie je složitý proces, do kterého je zapojeno více než 30 různých genů (Chen *et Klionsky*, 2011). Po aktivaci autofagie dochází k pohlcení cytoplazmatických složek fagoforem, následně se vytvoří autofagozóm s dvojitou membránou. Ten fúzuje s lysozómem, což vede k degradaci obsahu v autolysozomální organele.

Autofagie může tumorigenezi inhibovat, ale také podporovat (Hippert *et al.*, 2006; Kimmelman, 2011). U PDAC autofagie pravděpodobně slouží k udržení růstu nádoru. Dle studie provedené Fujii a kolektivem PDAC vykazuje aktivovanou autofagii a vysokou expresi LC3 proteinu, jakožto komponentou při tvorbě autofagosomu, což koreluje se špatnými výsledky u pacientů (Fujii *et al.*, 2008).

Další studie zkoumaly souvislost mezi autofagní závislostí na nádorových buňkách PDAC s mutací v KRAS a mitochondriální funkci. Výsledky ukázaly, že v buněčných liniích PDAC při inhibici autofagie dochází k poruchám mitochondriálního dýchání, které mohou být napraveny dodáním substrátů pro Krebsův cyklus. PDAC tedy spoléhá na autofagii, která potřebné bioenergetické meziprodukty pro Krebsův cyklus zajistí (Yang *et al.*, 2011).

2.4.6 Potenciální léčba s využitím KRAS inhibice

U myší inhibice aktivity KRAS proteinu zpomaluje růst nebo dokonce způsobuje regresi pankreatických tumorů. Dokonce i některé lidské rakovinné buňky pankreatu vyžadují aktivní KRAS, aby mohlo dojít k vytvoření nádoru. Je tedy snaha o vytvoření strategie pro přímou inhibici KRAS nebo jeho efektorů (Collins *et al.*, 2012). Jednotlivé nádorové buňky však přežívají inaktivaci KRAS proteinu, pravděpodobně díky udržování klidového stavu. Je proto zapotřebí detailně prostudovat mechanismus jakým nádorové buňky přežívají tuto inaktivaci, aby bylo možné docílit úplné eradikace nádoru (Di Magliano *et* Logsdon, 2013).

3 Praktická část

V praktické části této práci byl zkoumán účinek experimentálního taxanu SBT-1216 v koncentraci 30, 100 a 300 nM na tři buněčné linie, konkrétně se jednalo o buněčnou linii BxPC-3 (*KRAS* wild type), MIA PaCa-2 a PaCa-44. Vzorky buněčných linií byly indukované taxanem po dobu 24 a 72 hodin.

Z nádorové tkáně byla nejprve vyizolována RNA, která byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Následovalo měření hladiny exprese genů pomocí real-time PCR. Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru RT² Profiler PCR Array Data Analysis v3.5.

3.1. Použité buněčné kultury

Stanovení exprese genů *KRAS* signální dráhy bylo provedeno ve třech buněčných kulturách adenokarcinomu pankreatu. Buněčné linie se vzájemně lišily genetickými mutacemi klíčových genů kancerogeneze PDAC i biologickým chováním, agresivitou a přežíváním.

Buněčná linie BxPC-3 byla vyizolována z bioptického vzorku primárního adenokarcinomu těla pankreatu 61leté pacientky (Tan *et al.*, 1986). BxPC-3 buněčná linie nemá přítomnou žádnou mutaci v genu *KRAS*, má mutace v genech *TP53*, *CDKN2A/p16INK4A* a *SMAD4/DPC4* (Sipsos *et al.*, 2003).

Buněčná linie MIA PaCa-2 byla získána z nádorové tkáně 65letého muže. Velká nádorová masa byla nalezena v těle a ocasu pankreatu. Buňky této linie jsou velké, vykazují vysoký stupeň aneuploidie a mají tendenci růst na ostatních buňkách (Yunis *et al.*, 1977). MIA PaCa-2 buněčná linie má homozygotní missense mutace v kodonu 12 (G12C; GGT > TGT) *KRAS* genu a v exonu 7 *TP53* genu (CGG > TGG), homozygotní delece zahrnující exony 1, 2 a 3 genu *CDKN2A/p16INK4A* a má neuroendokrinní diferenciaci (Gradiz *et al.*, 2016).

PaCa-44 byla získána z primárního adenokarcinomu pankreatu 44leté pacientky (Elsässer *et al.*, 1993). Vykazuje mutace v kodonu 12 *KRAS* (G12V; GGT > GTT), v genu *TP53* (TGC > AGC) a metylace v *CDKN2A/p16INK4A* (Moore *et al.*, 2001).

Vzorky buněčných linií byly indukované taxanem SBT-1216, a to v koncentracích 30, 100, 300 nM / po dobu 24 a 72 hodin, kontrolní skupina byla inkubována bez taxanu.

3.2 Xenografty

Xenografty byly připraveny na spolupracujícím pracovišti (Institut klinické a experimentální medicíny, Praha), a to subkutánní aplikací suspenze buněčných linií PaCa-44 imunodeficientním nude myším jedincům. Myši byly následně léčeny experimentálním SBT (Stony Brook Taxane) taxanem SBT-1216 v dávce 10 mg/kg i.p. v týdenním intervalu, a usmrceny po aplikaci 2. dávky. Nádory byly ihned poté chirurgicky vyjmuty a zamraženy na -80 °C do doby izolace nukleových kyselin.

3.3 Izolace RNA

3.3.1 Chemikálie

Trizol, ethanol, MilliQ voda, isopropanol

3.3.2 Přístroje

Eppendorf centrifuga 5430

3.3.3 Postup

Nejprve bylo potřeba nádorovou tkáň zhomogenizovat. Zkumavky s kuličkami a 2 ml eppendorfky byly na 15 minut chlazeny. Poté byl do zkumavek s kuličkami přidán 1 ml Trizolu a nádorová tkáň byla centrifugována dle velikosti tkáně, malé kousky při 6500 RPM 20 sekund, větší kousky 2x20 sekund. Rozdrcená tkáň se v Trizolu přepipetovala do čistých 2 ml eppendorfek v laminárním boxu a následovala již samotná izolace RNA.

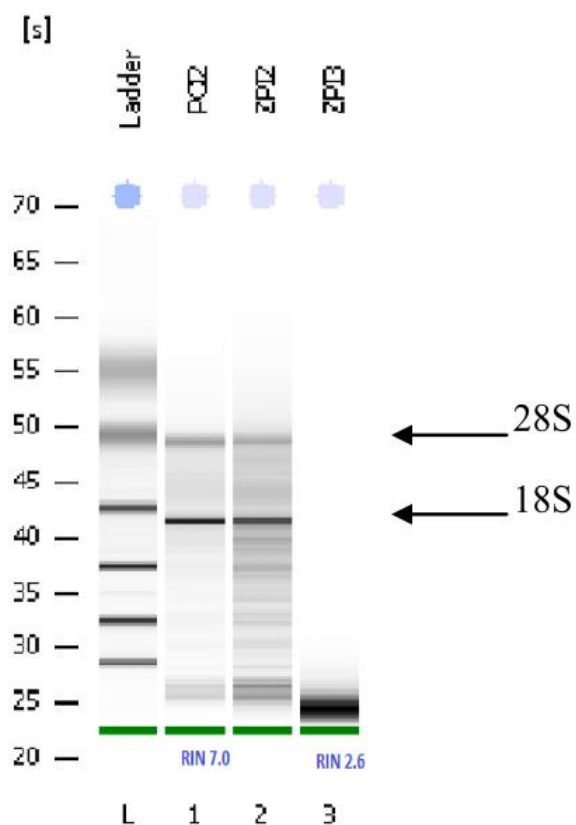
K připraveným buňkám v 1 ml Trizolu bylo připipetováno 200 µl chloroformu, následovalo zvortexování a inkubace na 3 minuty při laboratorní teplotě. Poté byla provedena centrifugace 15 minut při 12000 RPM a 4°C. Po centrifugaci byla přenesena horní fáze do čisté eppendorfky, přidal se stejný objem ledového isopropanolu a inkubovalo se 10 minut při laboratorní teplotě. Opět byla provedena centrifugace po dobu 15 minut, při 12000 RPM a 4°C. Po centrifugaci byl supernatant slit a pelet promyt 500 µl 70 % ethanolu a poté byl ethanol odebrán. Zbytek ethanolu bylo vysušeno při 60 °C v suchém bloku.

Po vysušení bylo přidáno 40 μ l MilliQ vody a zvortexováno. Následovala inkubace 15 minut při 60 °C v suchém bloku, při které byl pelet sledován, zdali dochází k jeho rozpouštění. Posledními kroky bylo zvortexování, centrifugace a přepipetování po 20 μ l do 200 μ l eppendorfkky a zamražení na -80°C.

3.4 Testování integrity a kvantity RNA

RNA je termodynamicky stabilní molekula, která je ovšem velmi snadno a rychle štěpena téměř všudypřítomnými enzymy RNázami. To může ohrozit získané výsledky, proto je potřeba vyhodnotit stupeň degradace (Auer *et al.*, 2003; Witkiewicz *et al.*, 2006). Za účelem hodnocení této degradace RNA se v současné době nejčastěji využívá bioanalyzátor Agilent 2100. Jde o automatizované bioanalytické zařízení, jež v kanálcích mikročipů oddělí vzorky RNA podle molekulové hmotnosti a následně detekuje fluorescenci indukovanou laserem. Výsledkem je elektroforetogram, kde množství naměřené fluorescence koreluje s množstvím RNA dané velikosti. Vyhodnocení integrity vzorků RNA poté probíhá pomocí algoritmu, který se nazývá RNA Integrity Number (RIN), a nabývá hodnot 0-10, přičemž vzorky s RIN=0 jsou zcela degradované, a vzorky s RIN=10 nevykazují známky fragmentace (Schroeder *et al.*, 2006).

Z buněčných linií a tkání tumorů xenograftů byla izolována RNA. Vzorky, které měly dostatečnou integritu RNA, tzn. RIN>7 a kvantitu $n > 1 \mu$ g byly dále použity k syntéze cDNA za pomoci RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).



Obrázek 5. Elektroforetický záznam pro stanovené vzorky 28S a 18S. Agilent 2100 expert software; osa x: počet vzorků; osa y: čas (s). Vzorek PCI2 s RINem 7.0- je vidět mírná degradace proužků odpovídajících 18S a 28S RNA; Vzorek ZPI3 s RINem 2.6- nejsou zachyceny proužky odpovídající svou velikosti 18S a 28S RNA.

3.4.1 Přístroje

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), IKA vortex, Model MS2-S8/MS2-S9 (Agilent Technologies)

3.4.2 Kit

RNA Nano 6000 LabChip kit (Agilent Technologies)

3.4.3 Postup

Všechny reagenty byly nejprve ponechány 30 minut při pokojové teplotě. Následně bylo vloženo 550 μ l Agilent RNA 6000 Nano gelu na filtr zkumavky a byla provedena centrifugace při 4000 RPM po dobu 10 minut. Do 0,5 ml mikrozkuavky byl poté přidán filtrovaný gel v množství 65 μ l. K přefiltrovanému gelu byl přidán 1 μ l barvy RNA 6000 Nano dye concentrate a směs gelu a barvy byla zvortexována a poté centrifugována 10 minut při 14000 RPM. Mix gel-barva byl v množství 9 μ l napipetován na chip do místa označeného písmenem „G“. Do dalších 12 jamek určených pro vzorky a do jamky určené pro ladder byl napipetován v množství 5 μ l Agilent RNA 6000 Nano Marker. Před nanesením vzorků na chip, byla ještě provedena teplotní denaturace při 70 °C na 2 minuty. Poté již byl ladder a vzorky v množství 1 μ l naneseny na příslušná místa na chipu a chip byl vortexován v horizontální poloze 60 sekund při 2400 RPM. Takto připravený chip byl posléze analyzován na Agilent 2100 Bioanalyzeru.

3.5 Syntéza cDNA

Vzorky mRNA s dostatečnou integritou a kvantitou byly reverzní transkripcí s použitím RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) přepsány do cDNA.

3.5.1 Chemikálie

Random Hexamer Primer, nuclease-free voda, mix (5 \times reakční pufr, 10 mM dNTP mix a RiboLock RNase inhibitor), RevertAid reverzní transkriptázy

3.5.2 Přístroje

Implen NanoPhotometer® P360, Eppendorf centrifuga 5430, termoblok

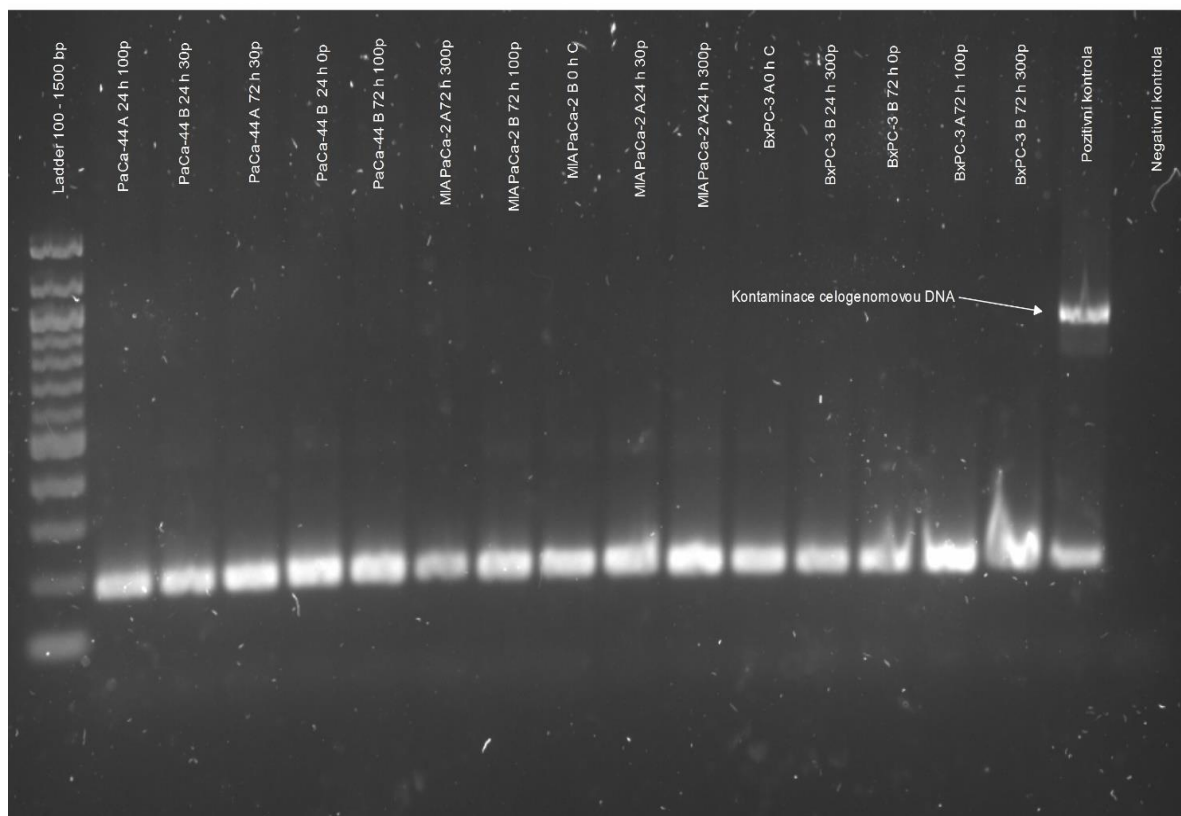
3.5.3 Postup

K 1 µg RNA byly přidány 2 µl Random Hexamer Primeru a nuclease-free voda na celkový objem 28 µl, mikrozkušavky byly promíchány a zcentrifugovány. Poté byly na 5 minut umístěny do termobloku na 70 °C. Následně bylo k vzorkům přidáno 14 µl mixu, který obsahoval 5× Reaction Buffer, 10 mM dNTP mix a RiboLock RNase inhibitor. Obsah zkumavek byl opět zamíchán a centrifugován. Následovalo odebrání 4 µl z každého vzorku jako negativní kontroly kontaminace kitu, ke kterým nebyla přidána transkriptáza.

K ostatním vzorkům byly přidány 2 µl RevertAid reverzní transkriptasy. Všechny zkumavky byly následně inkubovány po dobu 10 minut při pokojové teplotě 25 °C, a poté 60 minut v termobloku o teplotě 42 °C. Následně byla reverzní transkriptasa inaktivována při teplotě 70 °C po dobu 10 minut. Koncentrace získané cDNA byla měřena pomocí nanophotometru.

3.6 Kontrola kvality cDNA

Ke kontrole kvality nasyntetizované cDNA z hlediska kontaminace genomovou DNA byla využita PCR amplifikace fragmentu ubiquitinu C (UBI). Získaná cDNA měla koncentraci v průměru 1247 ng/µl, pro PCR reakci a následnou elektroforézu byla cDNA 13x ředěna. Produkt amplifikace ubiquitinu C cDNA je pouze 190 párů bází velký, protože neobsahuje intron na rozdíl od produktu amplifikace genomové DNA, který obsahuje 1009 párů bází. Všechny vzorky bez kontaminace DNA byly uskladněny při – 20 °C.



Obrázek 6. Elektroforéza náhodně vybraných vzorků cDNA pro kontrolu kvality na 2 % agarosovém gelu při 150 V. V první jamce je ladder o velikosti 100–1500 bp. Předposlední jamka je pozitivní kontrola, tedy cDNA kontaminovaná celogenomovou DNA, v poslední jamce je pak negativní kontrola.

3.6.1 Chemikálie

5x HOT FIREPol Blend Master mix (DNA polymeráza, opravný enzym, pufr, 7,5 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, BSA, modré ~ 4 Kb a žluté ~ 40 bp barvivo pro elektroforézu), UBI primery, nuclease free voda, TAE pufr (800 mM Tris, 400 mM kyselina octová, 20 mM EDTA), deionizovaná voda, agaróza, Gel loading dye, SYBR Safe, 100 bp DNA Ladder

3.6.2 Přístroje

Mastercycler® pro S (Eppendorf, Hamburg, Německo), analytické váhy (Radwag, Polsko), PowerPac™ Universal elektroforéza (Bio-Rad), ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad, USA)

3.6.3 Postup

Prvním krokem bylo provedení PCR reakce, kdy byly připraveny jednotlivé vzorky dle tabulky 1, a následovala PCR reakce. Po počáteční denaturaci trvající 12 minut při 95 °C, následovalo 38 cyklů, během kterých se střídala denaturace po dobu 30 sekund při 95 °C, nasednutí primerů (annealing) při 64 °C po dobu 30 sekund a prodlužování vláken při 72 °C opět po dobu 30 sekund. Posledním krokem byla konečná elongace, která trvala 5 minut při 72 °C.

Amplifikované vzorky byly nanесeny na 2 % agarozový gel a při 125 V po dobu přibližně 70 minut byla provedena elektroforéza. Po skončení elektroforézy, byl gel v přítmí, a při mírném třepání, barven SYBR Safe barvou po dobu 30 minut. Následovala UV vizualizace.

Tabulka 1. Jednotlivé složky směsi pro PCR reakci a jejich množství

Jednotlivé složky směsi	množství [μl]
Nuclease free voda	14,5
5x HOT FIREPol Blend Master Mix	4
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
cDNA	0,5
celkem	20

3.7 Měření hladiny exprese genů pomocí real-time PCR

Real-time qPCR (RT-qPCR), neboli kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase, je vysoce citlivá metoda sloužící k amplifikaci produktů cDNA reverzně transkribovaných z mRNA, a umožňující kvantifikaci transkriptů a malých změn genové exprese (Pfaffl, 2001). Při PCR reakci se využívá DNA polymerázy a specifických oligonukleotidů (primerů) k amplifikaci fragmentů DNA. Dvouřetězcová DNA je denaturována při teplotě 95 °C. Následným snížením teploty na přibližně 60 °C je umožněno komplementárnímu nasednutí primerů. Poté se teplota opět zvýší, aby mohlo dojít k elongaci řetězce z primerů Taq polymerázou. Tento proces se cyklicky opakuje, což má za následek naamplifikování původní molekuly DNA (Pusterla et al., 2006).

Při použití TaqMan® assay se využívá fluorogenní TaqMan sondy, která má připojený reportérový fluorofor na 5'-konci a na 3'-konci se nachází zhášec. Je-li reportér a zhášec v těsné blízkosti, fluorescenci nepozorujeme.

Během elongační fáze PCR je ovšem možné díky exonukleázové aktivitě Taq polymerázy, která oddělí reportérovou molekulu a zhášec, fluorescenci detekovat (Arya et al., 2005).

3.7.1 Chemikálie

TaqMan™ Universal Master Mix II s UNG, TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, USA), Nuclease-free voda

3.7.2 Přístroje

Light Cycler 480 II Real-Time PCR systém (Roche), Eppendorf centrifuga 5430

3.7.3 Postup

Pomocí RT-PCR byla měřena míra exprese 45 genů, a to 41 klíčových genů KRAS signální dráhy (viz tabulka 2.) a čtyř referenčních genů (ELF1, EIF2B1, MRPL19, POP4), které byly dříve popsány jako vhodné referenční geny pro expresní studie na vzorcích PDAC (Mohelnikova-Duchonova et al., 2011). Referenční geny by se měly exprimovat stabilně za všech podmínek a cílové geny jsou k těmto referenčním genům vztahovány.

Tabulka 2. Měřené geny KRAS signální dráhy včetně assay ID. Hvězdičkou jsou označeny referenční geny.

Gen	Název genu	Assay ID
<i>AKT1</i>	AKT serine/threonine kinase 1	Hs00178289_m1
<i>AKT2</i>	AKT serine/threonine kinase 2	Hs01086102_m1
<i>ARAF</i>	A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	Hs00176427_m1
<i>BRAF</i>	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	Hs00269944_m1
* <i>EIF2B1</i>	eukaryotic translation initiation factor 2B subunit α	Hs01106484_m1
* <i>ELF1</i>	E74 like ETS transcription factor 1	Hs00152844_m1
<i>GSK3B</i>	glycogen synthase kinase 3 β	Hs00275656_m1
<i>KRAS</i>	KRAS proto-oncogene, GTPase	Hs00270666_g1
<i>MAP2K1</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 1	Hs00983247_g1
<i>MAP2K2</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 2	Hs04194606_gH
<i>MAP2K7</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 7	Hs00178198_m1

<i>MAP3K1</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	Hs00394890_m1
<i>MAP3K2</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	Hs01109981_m1
<i>MAP3K4</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	Hs00245958_m1
<i>MAP3K7</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	Hs01105682_m1
<i>MAPK1</i>	mitogen-activated protein kinase 1	Hs01046830_m1
<i>MAPK10</i>	mitogen-activated protein kinase 10	Hs00373455_m1
<i>MAPK14</i>	mitogen-activated protein kinase 14	Hs01051152_m1
<i>MAPK3</i>	mitogen-activated protein kinase 3	Hs00946872_m1
<i>MAPK7</i>	mitogen-activated protein kinase 7	Hs00611114_g1
<i>MAPK8</i>	mitogen-activated protein kinase 8	Hs00177083_m1
<i>MAPK9</i>	mitogen-activated protein kinase 9	Hs00177102_m1
<i>MKNK1</i>	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1	Hs00374376_m1
<i>MKNK2</i>	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2	Hs01046586_g1
<i>*MRPL19</i>	mitochondrial ribosomal protein L19	Hs00608519_m1
<i>MTOR</i>	mechanistic target of rapamycin kinase	Hs00234508_m1
<i>PAK1</i>	p21 activated kinase 1	Hs00176815_m1
<i>*POP4</i>	POP4 homolog, ribonuclease P/MRP subunit	Hs00198357_m1
<i>PDPK1</i>	3-phosphoinositide dependent protein kinase 1	Hs00176884_m1
<i>PIK3CA</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α	Hs00907966_m1
<i>PIK3CG</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit γ	Hs00277090_m1
<i>PLK3</i>	polo like kinase 3	Hs00177725_m1
<i>PRKCA</i>	protein kinase C α	Hs00925195_m1
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog	Hs02621230_s1
<i>PTK2</i>	protein tyrosine kinase 2	Hs01056457_m1
<i>PTK2B</i>	protein tyrosine kinase 2 β	Hs01559708_m1
<i>RAC1</i>	Rac family small GTPase 1	Hs01025984_m1
<i>RAF1</i>	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	Hs00234119_m1
<i>RALA</i>	RAS like proto-oncogene A	Hs01564991_g1
<i>RALBP1</i>	ralA binding protein 1	Hs01034988_g1
<i>RALGDS</i>	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	Hs00325141_m1
<i>RHOA</i>	ras homolog family member A	Hs00357608_m1
<i>RIN1</i>	Ras and Rab interactor 1	Hs00182870_m1
<i>RPS6KA2</i>	ribosomal protein S6 kinase A2	Hs00179731_m1
<i>SRC</i>	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase	Hs01082238_g1

Reverzní transkripce získaná cDNA o koncentraci 1247 ng/ μ l byla 22,5x naředěna nuclease-free vodou a následně takto naředěná cDNA byla v množství 4,5 μ l rozpipetována do 96 jamkové PCR destičky dle tabulky 3.

Tabulka 3. Schéma rozpipetování 22,5x naředěné cDNA v množství 4,5 µl. V každém okně tabulky je uvedena testovaná buněčná linie, koncentrace taxanu a kultivační čas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	PaCa-44 A C 24 h	PaCa-44 A 30P 24 h	PaCa-44 A 100P 24 h	PaCa-44 A 300P 24 h	-	MIA PaCa- 2 A C 24 h	MIA PaCa- A-2 A 30P 24 h	MIA PaCa- 2 A 100P 24 h	MIA PaCa- 2 A 300P 24 h	-	-
B	-	PaCa-44 A C 24 h	PaCa-44 A 30P 24 h	PaCa-44 A 100P 24 h	PaCa-44 A 300P 24 h	-	MIA PaCa- 2 A C 24 h	MIA PaCa- 2 A 30P 24 h	MIA PaCa- 2 A 100P 24 h	MIA PaCa- 2 A 300P 24 h	-	-
C	-	PaCa-44 B C 24 h	PaCa-44 B 30P 24 h	PaCa-44 B 100P 24 h	PaCa-44 B 300P 24 h	-	MIA PaCa- 2 B C 24 h	MIA PaCa- 2 B 30P 24 h	MIA PaCa- 2 B 100P 24 h	MIA PaCa- 2 B 300P 24 h	-	-
D	NFW C	PaCa-44 B C 24 h	PaCa-44 B 30P 24 h	PaCa-44 B 100P 24 h	PaCa-44 B 300P 24 h	NFW C	MIA PaCa- 2 B C 24 h	MIA PaCa- 2 B 30P 24 h	MIA PaCa- 2 B 100P 24 h	MIA PaCa- 2 B 300P 24 h	-	-
E	PaCa-44 A - 0 h	PaCa-44 A C 72 h	PaCa-44 A 30P 72 h	PaCa-44 A 100P 72 h	PaCa-44 A 300P 72 h	MIA PaCa- 2 A - 0 h	MIA PaCa- 2 A C 72 h	MIA PaCa- 2 A 30P 72 h	MIA PaCa- 2 A 100P 72 h	MIA PaCa- 2 A 300P 72 h	-	-
F	PaCa-44 A - 0 h	PaCa-44 A C 72 h	PaCa-44 A 30P 72 h	PaCa-44 A 100P 72 h	PaCa-44 A 300P 72 h	MIA PaCa- 2 A - 0 h	MIA PaCa- 2 A C 72 h	MIA PaCa- 2 A 30P 72 h	MIA PaCa- 2 A 100P 72 h	MIA PaCa- 2 A 300P 72 h	-	-
G	PaCa-44 B - 0 h	PaCa-44 B C 72 h	PaCa-44 B 30P 72 h	PaCa-44 B 100P 72 h	PaCa-44 B 300P 72 h	MIA PaCa- 2 B - 0 h	MIA PaCa- 2 B C 72 h	MIA PaCa- 2 B 30P 72 h	MIA PaCa- 2 B 100P 72 h	MIA PaCa- 2 B 300P 72 h	-	-
H	PaCa-44 B - 0 h	PaCa-44 B C 72 h	PaCa-44 B 30P 72 h	PaCa-44 B 100P 72 h	PaCa-44 B 300P 72 h	MIA PaCa- 2 B - 0 h	MIA PaCa- 2 B C 72 h	MIA PaCa- 2 B 30P 72 h	MIA PaCa- 2 B 100P 72 h	MIA PaCa- 2 B 300P 72 h	-	-

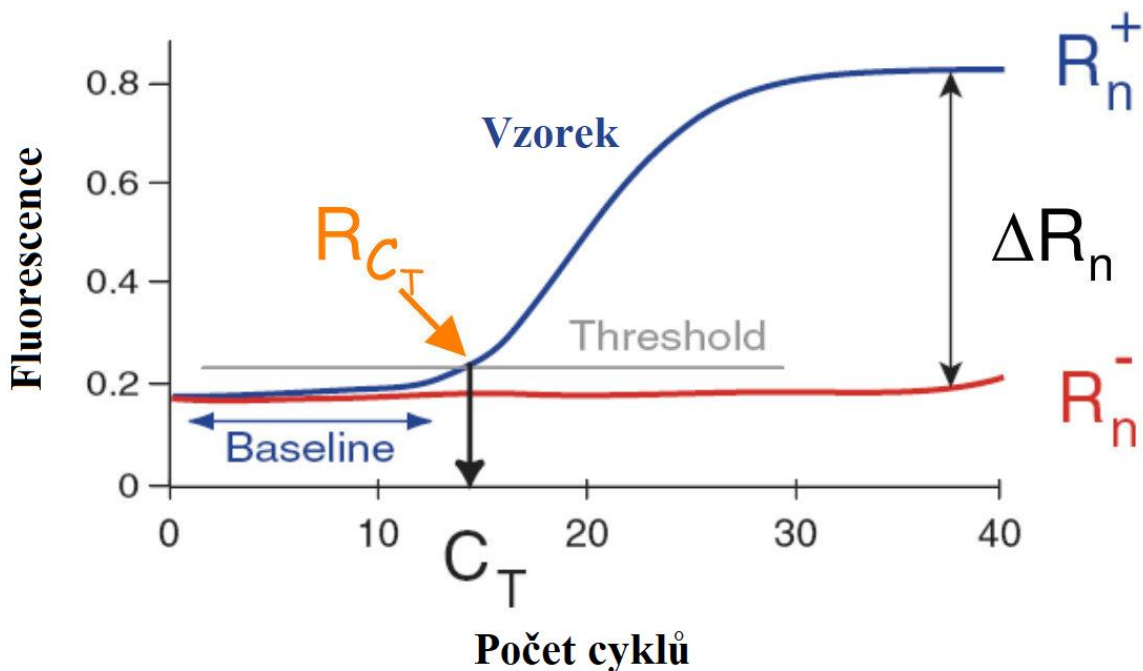
Do každé jamky bylo dále přidáno 5 µl TaqMan™ Universal Master Mix II s UNG (Uracil-DNA Glycosylase) a 0,5 µl TaqMan® Gene Expression Assay. Celkový objem reakční směsi byl tedy 10 µl na jamku. Vzorčky byly nanášeny v duplikátu a pro každou reakci byla vždy jedna negativní kontrola, kde byla cDNA nahrazena nuclease-free vodou k vyloučení kontaminace reakční směsi.

Po rozpipetování všech složek reakční směsi, byla PCR destička zvortexována a krátce ztočena na centrifuze. Následovala samotná PCR reakce, za následujících podmínek: 2 minutami při 50 °C, poté iniciální denaturace 10 minut při 95 °C, a dále 40 cyklů při kterých docházelo ke střídání denaturace po dobu 15 sekund při 95 °C a elongace po dobu 1 minuty při 60 °C.

3.7.4 Analýza míry exprese genů

Výsledky byly statisticky hodnoceny komparativní delta-delta Ct metodou a pomocí softwaru RT² Profiler PCR Array Data Analysis v3.5 (Qiagen, 2014).

Relativní expresi našich zájmových genů ve vztahu k referenčním genům lze vypočítat na základě hodnoty delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), kde $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct \text{ našeho cílového genu} - \Delta Ct \text{ referenčního genu}]$.



Graf 2. – Kvantitativní real-time PCR (Převzato a upraveno z prezentace Real-Time Quantitative PCR Data Analysis; Mosquera, 2012). ΔR_n – nárůst signálu fluorescence; Baseline – cykly, ve kterých se akumuluje signál, ale je pod limity detekce; Threshold – je vypočítána na základě fluorescence pozadí v základní oblasti všech křivek ve skupině; C_t – číslo cyklu, při kterém fluorescence generovaná během reakce překročí fluorescenční prahovou hodnotu (threshold).

Hodnota C_t může být použita pro zjištění relativní úrovně exprese. Pro výpočet jsou potřeba dva vzorky (kontrola a léčený vzorek) a je potřeba měřit úroveň jak cílových genů, tak referenčních genů, tzn. že pro každý vzorek je počítán rozdíl v hodnotách ΔCt pro cílový i referenční gen, čímž získáme hodnotu $\Delta\Delta Ct$. Posledním krokem je získání hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ vyjadřující změnu exprese (Livak *et* Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2006).

4 Výsledky

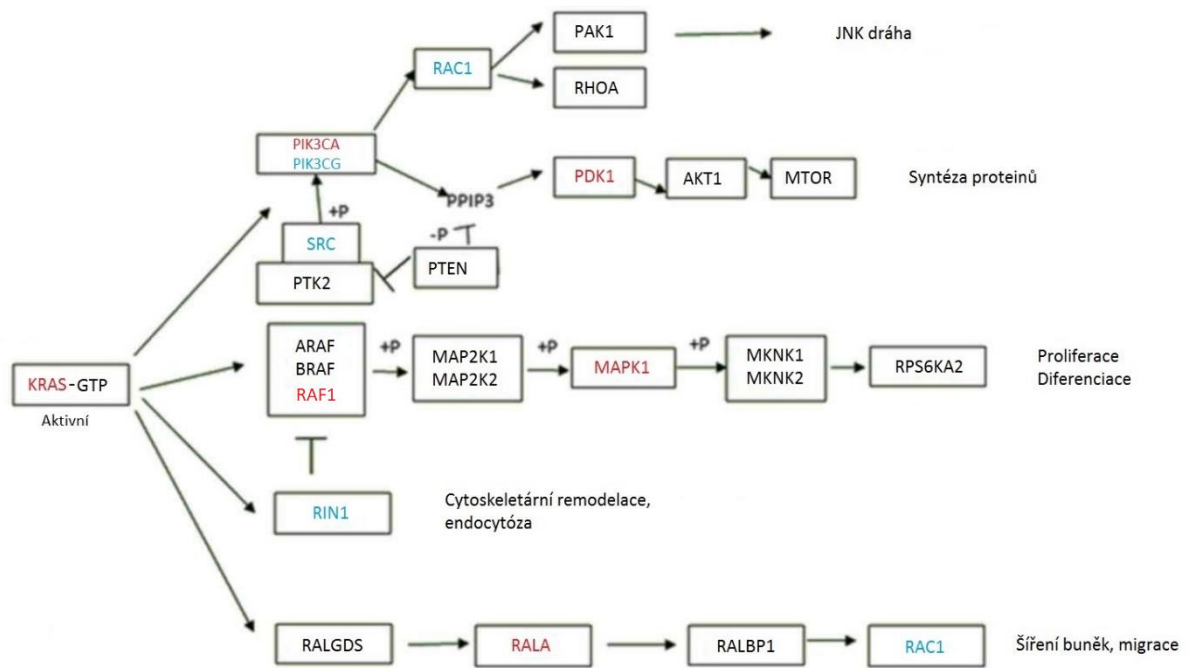
4.1 Porovnání exprese genů KRAS signální dráhy mezi jednotlivými liniemi

V této práci byla studována expresní hladina 41 klíčových genů KRAS signální dráhy mezi buněčnými liniemi PaCa-44, MIA PaCa-2 a BxPC-3. Linie jsou odlišné v mnoha aspektech, včetně biologického chování, genetického profilu či agresivity.

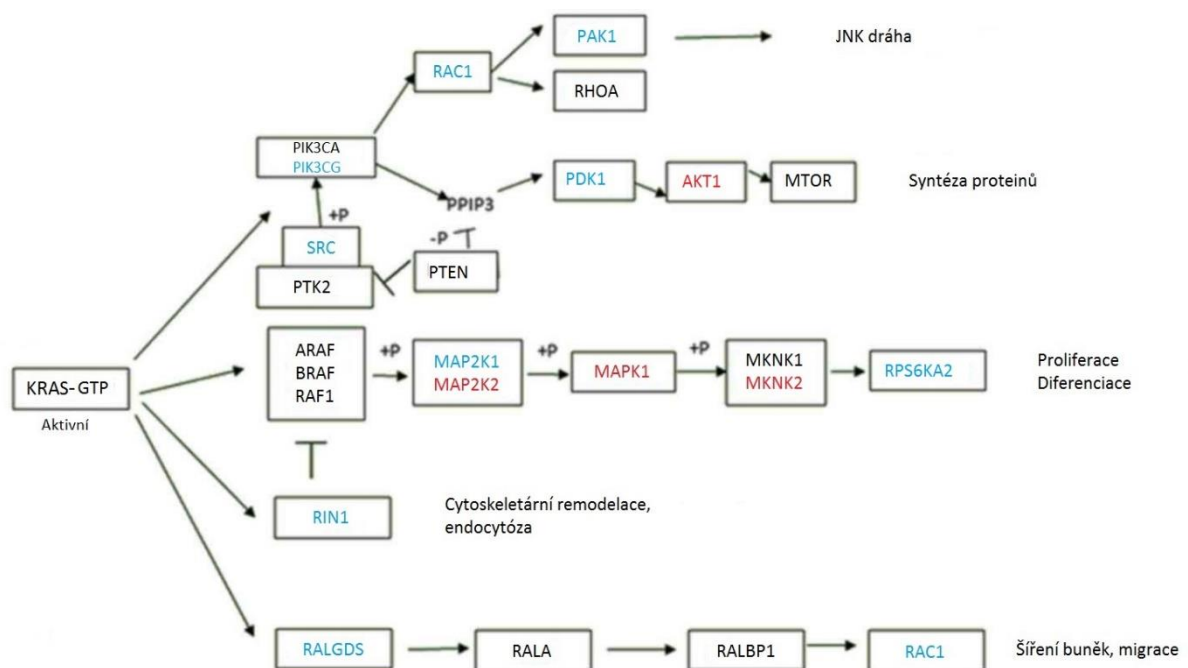
Měřením exprese vybraných genů, byla získána data, která jsou uvedena v tabulce 4. Ke každému testovanému genu je vždy uvedena změna exprese (fold change). V případě zvýšené exprese ($>2,00$) je hodnota označena červeně, modrá barva čísla pak značí expresi sníženou ($<0,50$). Hodnota p-value značí významnost naměřených dat. Tučně jsou zvýrazněny hodnoty s p-value menší než 0,05. Sloupce s intervalem 95 % CI poukazují na statistickou významnost rozdílu exprese vyjádřenou 95 % intervalem spolehlivosti.

Výsledky u buněčné linie PaCa-44 vzhledem ke kontrolní linii BxPC-3 (*KRAS* wild type) byly odlišné, up-regulace byla pozorována u genů *KRAS*, *MAP2K7*, *MAP3K7*, *MAPK1*, *MAPK3*, *MAPK7*, *MAPK9*, *PDPK1*, *PIK3CA*, *RAF1* a *RALA*. Down-regulace byla přítomna u genů *MAP3K1*, *MAPK10*, *PIK3CG*, *RAC1*, *RINI* a *SRC*. Schématické znázornění změn exprese pro PaCa-44 buněčnou linii je na obrázku 7.

U buněčné linie MIA PaCa-2 vzhledem k linii BxPC-3 (*KRAS* wild type) byla rovněž snižená exprese u genu *MAP3K1*, *MAPK10*, *PIK3CG*, *RAC1*, *RINI*, a *SRC*, a oproti PaCa-44 linii navíc i u genů *MAP2K1*, *PAK1*, *PDPK1*, *PLK3*, *PTK2B*, *RALGDS*, a *RPS6KA2*. Naopak zvýšenou expresi vykazovaly geny *AKT1*, *MAP2K2*, *MAP3K7*, *MAPK1*, *MAPK3*, *MAPK9* a *MKNK2*. Schéma deregulace signální dráhy KRAS u buněčné linie MIA PaCa-2 vzhledem k linii BxPC-3 je znázorněno na obrázku 8.



Obrázek 7. Deregulace signální dráhy KRAS u buněčné linie PaCa-44 vzhledem ke kontrolní linii BxPC-3 dle tabulky 4. Modrá barva vyznačuje sníženou expresi a červená barva expresi zvýšenou. Schéma bylo převzato a upraveno od Lemstrova *et al.*, 2017.



Obrázek 8. Deregulace signální dráhy KRAS u buněčné linie MIA PaCa-2 vzhledem ke kontrolní linii BxPC-3 dle tabulky 4. Modrá barva vyznačuje sníženou expresi a červená barva expresi zvýšenou. Schéma bylo převzato a upraveno od Lemstrova *et al.*, 2017.

Tabulka 4. Porovnání exprese genů KRAS signální dráhy u buněčných linií MIA PaCa-2 a PaCa-44 vzhledem ke kontrolní linii BxPC-3. Modrá barva vyznačuje sníženou expresi a červená barva expresi zvýšenou.

gen	MIA PaCa-2			PaCa-44		
	Změna exprese	p-value	95 % CI	Změna exprese	p-value	95 % CI
<i>AKT1</i>	2,08	<0,001	(1,84 - 2,32)	0,85	0,546	(0,58 - 1,13)
<i>AKT2</i>	0,87	0,889	(0,38 - 1,37)	0,91	0,510	(0,69 - 1,13)
<i>ARAF</i>	1,91	0,052	(1,01 - 2,82)	1,10	0,917	(0,56 - 1,63)
<i>BRAF</i>	1,84	0,053	(0,99 - 2,69)	0,87	0,372	(0,59 - 1,15)
<i>GSK3B</i>	1,26	0,185	(0,84 - 1,69)	1,68	0,016	(1,21 - 2,16)
<i>KRAS</i>	0,95	0,216	(0,00001 - 2,32)	3,40	<0,001	(2,31 - 4,49)
<i>MAP2K1</i>	0,36	<0,001	(0,29 - 0,42)	0,56	<0,001	(0,51 - 0,62)
<i>MAP2K2</i>	3,48	<0,001	(2,67 - 4,28)	1,40	0,102	(0,90 - 1,90)
<i>MAP2K7</i>	1,96	0,005	(1,16 - 2,76)	3,97	0,003	(1,81 - 6,13)
<i>MAP3K1</i>	0,16	0,002	(0,09 - 0,23)	0,34	0,007	(0,19 - 0,49)
<i>MAP3K2</i>	1,24	0,272	(0,75 - 1,72)	0,80	0,204	(0,53 - 1,06)
<i>MAP3K4</i>	1,69	0,093	(0,78 - 2,59)	0,77	0,215	(0,47 - 1,08)
<i>MAP3K7</i>	2,40	<0,001	(1,58 - 3,21)	3,45	0,002	(1,98 - 4,92)
<i>MAPK1</i>	3,90	0,001	(2,87 - 4,92)	2,16	0,001	(1,72 - 2,61)
<i>MAPK10</i>	0,01	0,004	(0,00 - 0,01)	0,29	0,028	(0,03 - 0,55)
<i>MAPK14</i>	1,22	0,225	(0,87 - 1,57)	0,70	0,034	(0,53 - 0,87)
<i>MAPK3</i>	4,35	0,003	(2,03 - 6,67)	2,76	0,001	(1,53 - 4,00)
<i>MAPK7</i>	1,64	0,021	(1,09 - 2,19)	4,24	0,042	(1,75 - 6,73)
<i>MAPK8</i>	1,48	0,142	(0,81 - 2,15)	0,88	0,466	(0,60 - 1,17)
<i>MAPK9</i>	6,27	<0,001	(4,44 - 8,11)	4,30	<0,001	(3,60 - 4,99)
<i>MKNK1</i>	1,11	0,491	(0,61 - 1,62)	0,75	0,053	(0,57 - 0,93)
<i>MKNK2</i>	4,79	0,042	(1,12 - 8,45)	0,64	0,649	(0,09 - 1,19)
<i>MTOR</i>	1,26	0,029	(1,05 - 1,47)	0,77	0,332	(0,49 - 1,04)
<i>PAK1</i>	0,36	0,012	(0,21 - 0,50)	1,11	0,821	(0,58 - 1,65)
<i>PDPK1</i>	0,38	<0,001	(0,28 - 0,47)	2,88	0,346	(0,00001 - 8,81)
<i>PIK3CA</i>	0,60	0,139	(0,27 - 0,93)	5,84	0,346	(0,00001 - 22,54)
<i>PIK3CG</i>	0,02	<0,001	(0,01 - 0,02)	0,02	<0,001	(0,01 - 0,03)
<i>PLK3</i>	0,31	0,027	(0,09 - 0,52)	0,66	0,179	(0,32 - 0,99)
<i>PRKCA</i>	1,60	0,092	(0,95 - 2,25)	1,22	0,177	(0,91 - 1,53)
<i>PTEN</i>	1,20	0,683	(0,24 - 2,15)	1,63	0,311	(0,52 - 2,74)
<i>PTK2</i>	1,04	0,697	(0,64 - 1,45)	1,75	0,009	(1,24 - 2,26)
<i>PTK2B</i>	0,04	<0,001	(0,00001 - 0,09)	0,57	0,045	(0,29 - 0,86)
<i>RAC1</i>	0,01	0,310	(0,00001 - 0,04)	0,44	0,355	(0,00001 - 1,20)
<i>RAF1</i>	1,23	0,427	(0,45 - 2,01)	3,87	<0,001	(2,35 - 5,39)
<i>RALA</i>	1,71	0,154	(0,86 - 2,55)	2,67	0,086	(1,24 - 4,11)
<i>RALBP1</i>	1,40	0,249	(0,63 - 2,17)	1,98	0,030	(1,18 - 2,79)
<i>RALGDS</i>	0,37	0,023	(0,13 - 0,61)	0,74	0,455	(0,00001 - 1,96)
<i>RHOA</i>	0,67	0,086	(0,40 - 0,94)	0,70	0,052	(0,48 - 0,93)
<i>RINI</i>	0,34	0,007	(0,13 - 0,54)	0,38	0,040	(0,07 - 0,69)
<i>RPS6KA2</i>	0,07	0,114	(0,00001 - 0,22)	1,96	0,019	(1,14 - 2,79)
<i>SRC</i>	0,12	<0,001	(0,07 - 0,17)	0,02	<0,001	(0,01 - 0,03)

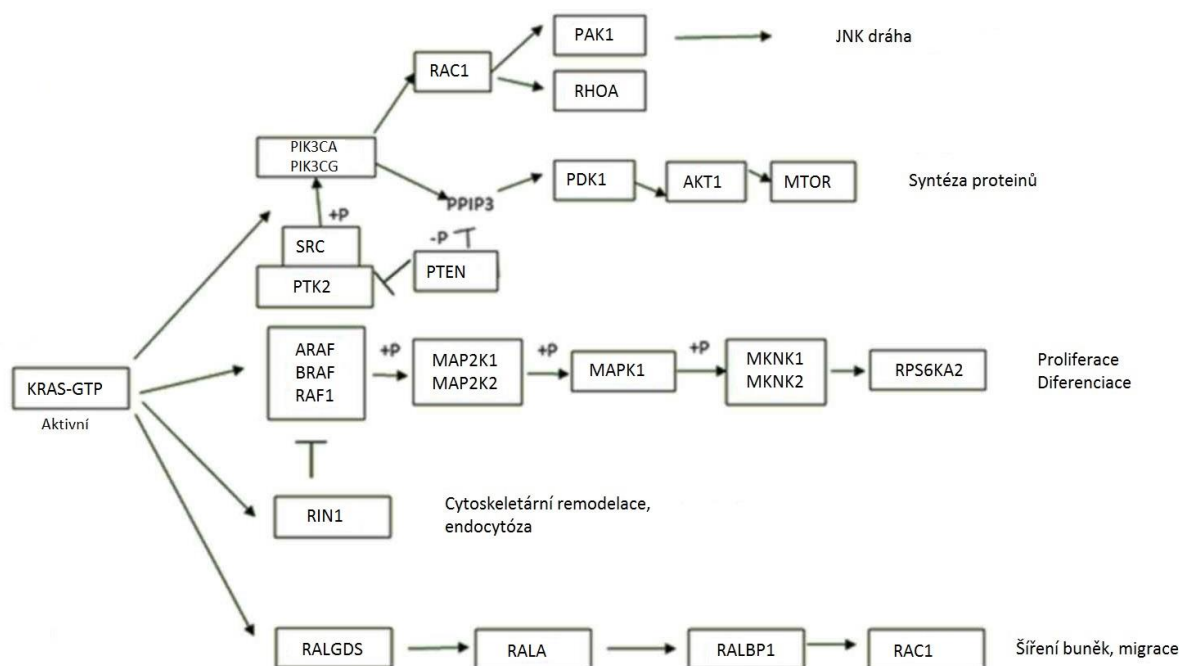
4.2 Exprese genů u xenograftů

Exprese 41 genů KRAS signální dráhy, byly měřeny i v nádorové tkáni xenograftů, kteří byli léčeni taxany a kontrolní skupiny bez léčby. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5 a na obrázku 9 je graficky znázorněna signální dráha KRAS vytvořená dle hodnot v tabulce 5. Jak je z tabulky i grafu patrné, kromě snížené exprese čtyř genů (*MAPK14*, *MKNK1*, *PRKCA* a *PTK2*, $p \leq 0,05$) a zvýšené expresi *RHOA* ($p=0,02$) k žádným dalším statisticky významným deregulacím v KRAS signalizaci po terapii taxany nedošlo. Pouze jeden gen, a to *MAPK14*, zůstal statisticky významný i po Bonferoniho korekci mnohonásobných srovnání.

Tabulka 5. Porovnání exprese genů KRAS signální dráhy u xenograftů vzhledem ke kontrolní skupině. Modrá barva vyznačuje sníženou expresi. Geny s deregulací významnější než $p < 0,05$ jsou vyznačeny tučně.

gen	Xenografty		
	změna exprese	p-value	95 % CI
<i>AKT1</i>	1,31	0,083	(0,84 - 1,78)
<i>AKT2</i>	0,93	0,728	(0,72 - 1,14)
<i>ARAF</i>	0,86	0,357	(0,65 - 1,07)
<i>BRAF</i>	0,88	0,516	(0,66 - 1,10)
<i>GSK3B</i>	1,04	0,616	(0,82 - 1,25)
<i>KRAS</i>	0,85	0,406	(0,63 - 1,08)
<i>MAP2K1</i>	0,85	0,398	(0,63 - 1,07)
<i>MAP2K2</i>	1,19	0,260	(0,75 - 1,63)
<i>MAP2K7</i>	1,03	0,623	(0,71 - 1,34)
<i>MAP3K1</i>	1,03	0,448	(0,41 - 1,65)
<i>MAP3K2</i>	0,99	0,847	(0,70 - 1,29)
<i>MAP3K4</i>	1,20	0,099	(0,91 - 1,49)
<i>MAP3K7</i>	0,89	0,743	(0,60 - 1,19)
<i>MAPK1</i>	1,02	0,738	(0,75 - 1,29)
<i>MAPK10</i>	0,83	0,336	(0,56 - 1,11)
<i>MAPK14</i>	0,38	0,001	(0,21 - 0,54)
<i>MAPK3</i>	0,90	0,960	0,50 - 1,31)
<i>MAPK7</i>	0,99	0,830	(0,69 - 1,30)
<i>MAPK8</i>	1,20	0,217	(0,60 - 1,80)
<i>MAPK9</i>	1,26	0,058	(0,98 - 1,54)
<i>MKNK1</i>	0,79	0,037	(0,62 - 0,95)
<i>MKNK2</i>	1,22	0,151	(0,91 - 1,53)
<i>MTOR</i>	1,10	0,477	(0,62 - 1,57)
<i>PAK1</i>	1,16	0,340	(0,81 - 1,51)
<i>PDPK1</i>	0,80	0,205	(0,58 - 1,03)
<i>PIK3CA</i>	0,92	0,546	(0,71 - 1,13)
<i>PIK3CG</i>	0,81	0,433	(0,51 - 1,10)
<i>PLK3</i>	1,10	0,914	(0,33 - 1,87)
<i>PRKCA</i>	0,72	0,018	(0,56 - 0,88)
<i>PTEN</i>	0,76	0,146	(0,52 - 1,00)
<i>PTK2</i>	0,73	0,019	(0,57 - 0,89)

<i>PTK2B</i>	0,72	0,091	(0,48 - 0,96)
<i>RAC1</i>	1,11	0,458	(0,76 - 1,47)
<i>RAF1</i>	0,82	0,281	(0,56 - 1,08)
<i>RALA</i>	1,17	0,285	(0,80 - 1,54)
<i>RALBP1</i>	1,16	0,333	(0,73 - 1,59)
<i>RALGDS</i>	0,99	0,717	(0,60 - 1,38)
<i>RHOA</i>	1,39	0,020	(1,06 - 1,72)
<i>RIN1</i>	0,99	0,916	(0,71 - 1,28)
<i>RPS6KA2</i>	0,86	0,984	(0,32 - 1,41)
<i>SRC</i>	0,95	0,723	(0,51 - 1,38)



Obrázek 9. Deregulace signální dráhy KRAS u xenograftu vzhledem ke kontrolní skupině dle tabulky 5. Schéma bylo převzato a upraveno od Lemstrova *et al.*, 2017.

4.3 Expresse genů jednotlivých linií léčených taxanem vzhledem k neléčeným

Jednotlivé linie byly testovány na změnu exprese v průběhu léčby experimentálním taxanem SBT-1216 v různých koncentracích (30, 100 a 300 nM) po dobu 24 a 72 hodin. Naměřené hodnoty pro jednotlivé linie jsou uvedeny v tabulkách 6, 7 a 8.

4.3.1 Expresse genů buněčné linie PaCa-44 léčenou taxanem SBT-1216

U buněčné linie PaCa-44 byly pozorovány největší změny v porovnání s dalšími dvěma testovanými liniemi. Jak je patrné z tabulky 6, sníženou expresi můžeme pozorovat především

u genu *PDPK1*, *PIK3CA*, *RALGDS* a *RPS6KA2*, kdy jsou téměř konstatní hodnoty down-regulace pro všechny koncentrace, a to jak pro čas 24 hodin, tak 72 hodin od podání chemoterapie.

Sníženou expresi můžeme vidět i u genu *PTK2B*, patrná je hlavně po léčení taxanem po dobu 24 hodin ve všech třech koncentracích. U genu *MAP2K2* a *MAPK10* jsou snížené hodnoty exprese patrné při vyšších koncentracích taxanu (100 nM a 300 nM). Zvýšená exprese se objevila pouze ve třech případech, a to u genu *MAPK1*, *MAPK9* a *MKNK1* při koncentraci taxanu 300 nM po 24 hodinách léčby. Pravděpodobně se ale jedná o náhodný výsledek.

Tabulky 6. Změny exprese u buněčné linie PaCa-44 po léčbě taxanem SBT-1216 v koncentracích 30, 100 a 300 nM po dobu 24 nebo 72 hodin.

gen	Změna exprese					
	30 nM / 24 hod.	30 nM / 72 hod.	100 nM / 24 hod.	100 nM / 72 hod.	300 nM / 24 hod.	300 nM / 72 hod.
<i>AKT1</i>	1,19	0,91	1,31	0,78	1,19	0,72
<i>AKT2</i>	0,56	0,83	0,65	0,66	0,65	0,61
<i>ARAF</i>	0,74	0,70	0,82	1,02	1,01	0,82
<i>BRAF</i>	0,81	1,23	0,72	1,13	0,63	1,15
<i>EIF2B1</i>	0,75	0,71	0,81	0,80	0,77	0,90
<i>ELF1</i>	0,97	1,78	0,66	1,14	0,81	1,30
<i>GSK3B</i>	0,74	0,91	0,71	0,82	0,77	0,97
<i>KRAS</i>	1,10	0,92	1,11	0,88	0,57	1,09
<i>MAP2K1</i>	1,08	1,22	1,12	0,99	1,11	1,02
<i>MAP2K2</i>	0,57	0,78	0,49	0,48	0,53	0,48
<i>MAP2K7</i>	0,53	0,96	0,63	0,80	0,59	0,70
<i>MAP3K1</i>	0,64	0,91	1,01	1,01	0,50	1,14
<i>MAP3K2</i>	1,00	1,35	0,79	1,60	0,93	1,90
<i>MAP3K4</i>	1,30	0,95	0,70	0,59	1,53	1,40
<i>MAP3K7</i>	0,66	0,66	0,98	0,66	0,54	0,61
<i>MAPK1</i>	1,21	0,81	1,62	1,53	2,50	1,21
<i>MAPK10</i>	0,65	0,84	0,28	0,33	0,52	0,36
<i>MAPK14</i>	1,32	0,94	1,00	1,26	1,16	1,18
<i>MAPK3</i>	1,29	1,43	1,51	1,21	1,09	1,21
<i>MAPK7</i>	0,67	0,85	0,93	0,86	1,07	0,91
<i>MAPK8</i>	0,74	1,05	0,94	1,02	0,61	1,26
<i>MAPK9</i>	0,70	0,74	0,83	0,76	2,57	1,46
<i>MKNK1</i>	0,88	0,94	1,28	1,43	2,14	0,76
<i>MKNK2</i>	1,15	1,72	0,53	1,20	0,55	0,73
<i>MRPL19</i>	1,43	1,02	1,86	1,84	1,39	1,15
<i>MTOR</i>	0,78	0,62	0,59	0,68	0,57	0,87
<i>PAK1</i>	0,61	0,95	0,55	0,74	0,66	0,70
<i>POP4</i>	0,96	0,77	1,00	0,60	1,15	0,74
<i>PDPK1</i>	0,25	0,30	0,25	0,23	0,27	0,23
<i>PIK3CA</i>	0,29	0,06	0,22	0,29	0,26	0,31
<i>PIK3CG</i>	0,65	1,03	0,64	0,74	0,78	0,94

<i>PLK3</i>	0,55	1,16	0,44	1,52	0,34	0,98
<i>PRKCA</i>	0,50	0,66	0,54	0,60	0,48	0,55
<i>PTEN</i>	0,60	0,51	0,51	0,48	0,53	0,51
<i>PTK2</i>	0,74	0,97	0,89	1,16	1,03	1,38
<i>PTK2B</i>	0,40	0,80	0,42	0,63	0,26	0,70
<i>RAC1</i>	0,53	1,08	0,50	0,55	0,42	0,68
<i>RAF1</i>	0,66	0,62	0,88	0,64	0,70	0,72
<i>RALA</i>	0,67	0,69	0,71	0,58	0,82	0,95
<i>RALBP1</i>	0,80	1,00	0,77	0,77	0,63	0,70
<i>RALGDS</i>	0,49	0,63	0,46	0,45	0,32	0,38
<i>RHOA</i>	0,92	0,79	0,83	0,60	0,66	0,82
<i>RINI</i>	1,12	1,05	1,19	1,08	0,75	1,02
<i>RPS6KA2</i>	0,38	0,51	0,41	0,35	0,41	0,30
<i>SRC</i>	0,61	1,50	0,38	1,00	0,40	0,94

4.3.2 Expresse genů buněčné linie MIA PaCa-2 léčenou taxanem SBT-1216

Po zhlédnutí výsledků z tabulky 7, můžeme pozorovat zvýšenou expresi u *PIK3CG*, mírně zvýšená exprese je u *KRAS* genu. Naproti tomu snížené hodnoty změny exprese jsou u *MAPK9* a *PTEN*, u *RPS6KA2* je snížená exprese pro všechny testované koncentrace po 24 hodin po podání taxanů. V tabulce je možné pozorovat ještě další zvýšené a snížené hodnoty u různých genů, jde však spíš o náhodné odchylky.

Tabulka 7. Změny exprese u buněčné linie MIA PaCa-2 po léčbě taxanem SBT-1216 v koncentracích 30, 100 a 300 nM po dobu 24 nebo 72 hodin.

gen	Změna exprese					
	30 nM / 24 hod.	30 nM / 72 hod.	100 nM / 24 hod.	100 nM / 72 hod.	300 nM / 24 hod.	300 nM / 72 hod.
<i>AKT1</i>	0,78	0,88	1,11	0,95	1,23	1,21
<i>AKT2</i>	0,83	0,96	0,75	1,01	0,65	0,84
<i>ARAF</i>	0,70	0,66	0,97	0,70	0,89	0,66
<i>BRAF</i>	0,79	1,11	0,86	1,01	0,86	1,25
<i>EIF2B1</i>	0,90	0,67	1,04	0,78	0,92	0,71
<i>ELF1</i>	0,91	1,54	0,91	1,26	0,85	1,27
<i>GSK3B</i>	0,83	1,32	0,98	1,11	0,78	1,07
<i>KRAS</i>	2,09	2,00	1,91	1,92	1,69	1,92
<i>MAP2K1</i>	0,85	1,15	0,94	1,03	0,89	1,21
<i>MAP2K2</i>	0,83	1,28	0,68	1,07	0,63	0,97
<i>MAP2K7</i>	0,73	1,31	0,80	1,19	0,67	1,34
<i>MAP3K1</i>	1,23	1,31	1,33	1,44	1,34	1,91
<i>MAP3K2</i>	0,62	0,93	0,84	0,84	0,93	0,84
<i>MAP3K4</i>	0,83	1,08	0,96	0,69	0,66	0,59
<i>MAP3K7</i>	1,00	1,14	1,13	1,12	1,17	1,20
<i>MAPK1</i>	0,88	0,99	0,97	0,85	0,49	0,62
<i>MAPK10</i>	1,03	1,29	1,15	1,41	0,92	1,19

<i>MAPK14</i>	1,10	0,89	0,96	1,07	0,77	0,74
<i>MAPK3</i>	1,07	1,24	0,48	1,56	1,33	1,95
<i>MAPK7</i>	1,10	1,36	0,92	1,38	0,94	1,36
<i>MAPK8</i>	0,74	1,26	1,53	1,08	0,61	1,23
<i>MAPK9</i>	0,62	0,50	0,50	0,48	0,31	0,61
<i>MKNK1</i>	0,65	0,74	1,09	0,66	0,87	0,95
<i>MKNK2</i>	0,70	2,33	0,49	1,08	0,26	0,45
<i>MRPL19</i>	0,76	0,54	3,08	0,95	1,51	1,70
<i>MTOR</i>	1,12	1,14	0,93	1,02	0,87	1,07
<i>PAK1</i>	0,87	1,09	0,95	1,10	1,02	1,39
<i>POP4</i>	1,09	0,86	1,15	1,00	1,46	1,04
<i>PDPK1</i>	0,89	1,33	0,92	1,00	1,03	1,20
<i>PIK3CA</i>	0,77	1,58	0,76	1,42	0,83	1,55
<i>PIK3CG</i>	3,11	10,15	2,20	10,65	1,52	9,13
<i>PLK3</i>	1,21	2,40	1,43	1,84	1,27	1,74
<i>PRKCA</i>	0,80	1,56	0,34	0,80	0,45	0,88
<i>PTEN</i>	0,29	0,35	0,31	0,66	0,27	0,30
<i>PTK2</i>	0,98	1,28	0,60	1,62	0,49	0,85
<i>PTK2B</i>	0,73	1,15	0,36	0,84	0,35	1,04
<i>RAC1</i>	0,44	1,73	0,66	1,01	0,68	0,97
<i>RAF1</i>	1,15	1,19	1,23	1,09	1,60	1,53
<i>RALA</i>	0,83	1,01	0,48	1,95	0,63	0,74
<i>RALBP1</i>	1,10	1,07	0,77	0,76	0,95	0,96
<i>RALGDS</i>	0,61	1,31	0,39	0,71	0,57	0,73
<i>RHOA</i>	1,09	1,15	0,69	0,60	0,98	0,68
<i>RIN1</i>	1,03	1,17	0,78	0,77	0,99	0,95
<i>RPS6KA2</i>	0,22	4,40	0,07	0,89	0,13	0,75
<i>SRC</i>	0,81	1,46	0,49	0,84	0,75	0,96

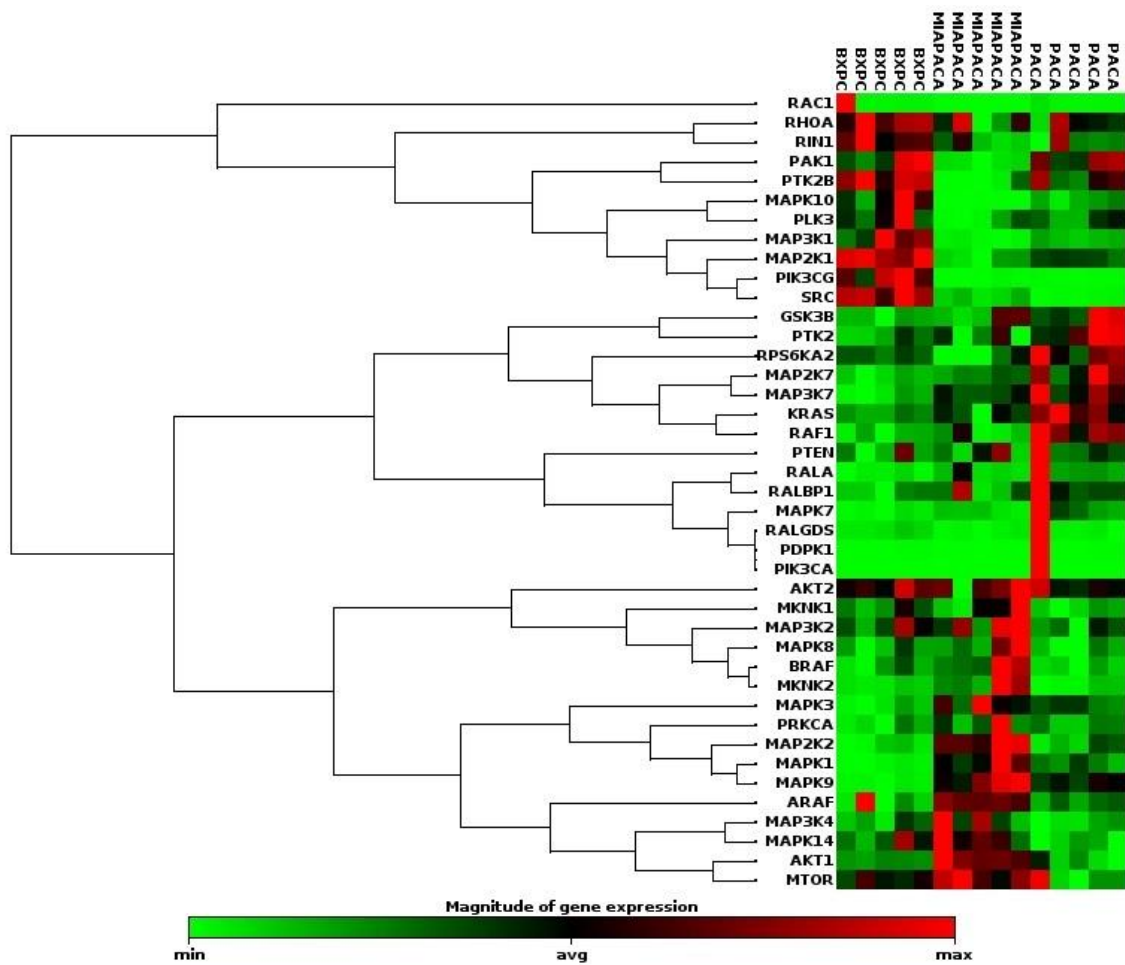
4.3.3 Expresie genů buněčné linie BxPC-33 léčenou taxanem SBT-1216

V poslední testované linii BxPC-3, která je linií kontrolní vzhledem k nepřítomnosti *KRAS* mutace, je jediná patrná změna v expresi genu *RAC1*, který byl po aplikaci taxanů down-regulován.

Tabulka 8. Změny exprese u buněčné linie BxPC-3 po léčbě taxanem SBT-1216 v koncentracích 30, 100 a 300 nM po dobu 24 nebo 72 hodin.

gen	Změna exprese					
	30 nM / 24 hod.	30 nM / 72 hod.	100 nM / 24 hod.	100 nM / 72 hod.	300 nM / 24 hod.	300 nM / 72 hod.
<i>AKT1</i>	1,17	1,04	1,47	1,15	1,19	0,91
<i>AKT2</i>	0,73	0,78	0,71	0,64	0,79	0,81
<i>ARAF</i>	0,69	0,89	0,77	0,83	0,72	0,75
<i>BRAF</i>	0,79	1,04	0,69	0,92	0,77	1,12
<i>EIF2B1</i>	1,01	0,89	1,01	0,98	0,92	0,78
<i>ELF1</i>	0,77	1,08	0,71	1,04	0,79	1,14

<i>GSK3B</i>	0,86	1,33	0,95	1,39	0,88	1,25
<i>KRAS</i>	0,97	1,14	0,88	0,91	1,03	0,96
<i>MAP2K1</i>	0,93	1,13	0,92	1,18	1,04	1,28
<i>MAP2K2</i>	0,87	0,97	0,90	0,91	0,98	0,93
<i>MAP2K7</i>	0,94	1,49	0,93	1,29	1,08	1,15
<i>MAP3K1</i>	0,52	1,08	0,60	1,01	0,66	1,16
<i>MAP3K2</i>	0,74	1,27	0,67	1,16	0,50	0,82
<i>MAP3K4</i>	0,80	0,97	1,11	0,97	1,22	1,29
<i>MAP3K7</i>	1,19	1,49	1,56	1,67	1,37	1,30
<i>MAPK1</i>	1,09	0,99	1,17	0,87	1,04	0,93
<i>MAPK10</i>	0,59	1,17	0,58	1,01	0,59	0,70
<i>MAPK14</i>	0,75	0,70	0,72	0,62	0,83	0,67
<i>MAPK3</i>	0,93	1,77	0,80	1,57	0,71	1,38
<i>MAPK7</i>	0,59	0,96	0,94	1,12	0,64	1,24
<i>MAPK8</i>	0,89	1,35	0,77	1,46	0,88	1,43
<i>MAPK9</i>	0,79	1,08	0,85	0,94	0,85	1,00
<i>MKNK1</i>	0,89	1,24	1,01	1,15	0,91	1,10
<i>MKNK2</i>	1,00	1,19	0,87	0,95	0,99	1,02
<i>MRPL19</i>	1,02	0,92	1,13	0,96	1,07	0,99
<i>MTOR</i>	1,17	1,04	1,30	1,15	1,04	1,17
<i>PAK1</i>	0,69	1,00	0,73	0,83	0,72	0,97
<i>POP4</i>	1,27	1,12	1,24	1,03	1,29	1,13
<i>PDPK1</i>	1,02	1,07	0,99	1,10	0,98	0,94
<i>PIK3CA</i>	0,72	1,15	0,75	1,02	0,82	1,33
<i>PIK3CG</i>	1,47	1,40	1,34	1,48	1,39	1,56
<i>PLK3</i>	0,65	0,90	0,58	0,76	0,47	0,86
<i>PRKCA</i>	0,69	0,87	0,74	0,77	1,45	1,22
<i>PTEN</i>	0,95	0,81	0,54	0,73	0,51	0,56
<i>PTK2</i>	1,14	1,27	1,16	1,11	0,89	1,00
<i>PTK2B</i>	0,85	1,03	0,90	0,96	1,04	1,05
<i>RAC1</i>	0,45	0,58	0,50	0,43	0,33	0,32
<i>RAF1</i>	1,27	1,25	1,45	1,41	1,55	1,74
<i>RALA</i>	0,90	1,61	1,11	1,64	0,90	1,29
<i>RALBP1</i>	0,76	1,10	1,11	0,92	1,07	1,11
<i>RALGDS</i>	0,76	1,17	0,69	0,65	0,57	0,52
<i>RHOA</i>	0,77	0,83	1,03	0,84	1,11	0,90
<i>RINI</i>	1,18	1,29	1,00	1,23	0,63	0,94
<i>RPS6KA2</i>	0,64	1,19	0,84	1,20	0,88	1,46
<i>SRC</i>	0,98	1,09	0,99	0,97	0,76	0,82



Obrázek 7. Heat mapa buněčných linií (PaCa-44, MIA PaCa-2 a BxPC-3) bez léčby zobrazující expresní profil jednotlivých genů. Zelená barva značí sníženou expresi, černá barva je pro standardní expresi a červená barva poukazuje na expresi zvýšenou. Korelace mezi jednotlivými geny je vyznačena dendrogramem.

5 Diskuze

Duktální adenokarcinom pankreatu je onemocnění s infaustní prognózou, zejména pro pozdní diagnostiku v již pokročilém stadiu onemocnění, vysokou rezistenci vůči chemoterapii, a absenci účinné cílené terapie. Mutace v *KRAS* se v PDAC vyskytují s četností vyšší než 90 %. Mutace v kodonu 12 a 13 genu *KRAS*, vedou k zablokování proteinu v aktivním stavu, ve kterém není schopen hydrolyzovat GTP, což spustí nepřetržitou aktivitu *KRAS* signální dráhy. Deregulace této dráhy nakonec vyústí v rozvoj karcinomu slinivky. Geny 4 signálních drah, downstream *KRAS* jsou odlišně exprimovány v nádorové tkáni PDAC při srovnání s párovou tkání nenádorovou. Významně je zvýšená exprese 3 z těchto 4 drah (*PI3K/PDK1/AKT*, *RAL* guanine nucleotide exchange factor, a *RIN1/ABL*), které jsou v přímém kontextu s migrací nádorových buněk a šířením nemoci. Naopak, exprese *RAF/MAPK* dráhy je v PDAC snižena (Lemstrova et al. 2017). Studium *KRAS* signální dráhy je proto velmi důležité a detailní pochopení jejího fungování může přispět k efektivnosti léčby PDAC.

V této práci jsem se zabývala studiem exprese 41 genů zapojených do *KRAS* 4 signálních drah downstream *KRAS* a změny jejich exprese léčbou experimentálním taxanem *SBT-1216* *in vitro* na buněčných liniích, tak i *in vivo* na myších modelech.

Jak je patrné z výsledků, jisté rozdíly v expresi jednačtyřiceti zkoumaných genů mezi jednotlivými buněčnými liniemi jsou zřejmé. Změny v expresi u buněčných liniích s přítomnou *KRAS* mutací (MIA PaCa-2 a PaCa-44) byly srovnávány s kontrolní *KRAS* divokou buněčnou linií BxPC-3 (Berrozpe et al., 1994).

KRAS aktivující mutace udržují trvale aktivní *KRAS* protein, nicméně v naší studii se nepotvrdilo, že by vedly obecně k zvýšené expresi genů signálních drah, které se nacházejí v buněčné signalizaci pod tímto onkogenem. Ani v dřívější studii provedené na tkáních PDAC pacientů, kteří podstoupili radikální chirurgický výkon, se nepodařilo prokázat, že by přítomná *KRAS* mutace ovlivňovala deregulaci *KRAS* signální dráhy na úrovni mRNA (Lemstrová et al. 2017). Ve výše uvedeném schéma (Obrázek 8.) MIA PaCa-2 buněčné linie, dochází ke snížené expresi genů (*PIK3CG*, *RAC1*, *PAK1*), které vedou k JNK dráze, ta se účastní řady buněčných procesů včetně proliferace a apoptózy (Dhanasekaran et Reddy, 2008). Určité deregulace se nachází i v genech *PI3K/PDK1/AKT* signální dráhy vedoucí až k syntéze proteinů důležitých pro regulaci buněčného cyklu (Castellano et Downward, 2011). Změny exprese jsou viditelné i u některých genů *RAS/RAF/MAPK* signální dráhy.

U buněčné linie PaCa-44, stejně jako u linie MIA PaCa-2, je snižena exprese *RIN1* a *RAC1*, což může mít vliv na migraci buněk (Han et al., 1997).

U obou linií dochází také ke snížené expresi onkogenu *SRC*, který hraje klíčovou roli v motilitě, proliferaci a přežití buněk (Roskoski, 2004). Naproti tomu zvýšené hladiny exprese jsou pozorovatelné u obou linií v genech *MAP3K7*, *MAPK1*, *MAPK3* a *MAPK9*. Tato studie je tedy výchozím pilotním projekt pro verifikační analýzy, zejména na úrovni exprese a aktivity těchto proteinů.

K léčbě pacientů s karcinomem pankreatu je v případě dobrého výkonnostního stavu volena terapie cytostatiky, ať už jde o terapii neoadjuvantní, či adjuvantní k chirurgické resekci, nebo o terapii paliativní. Jednou z možností chemoterapeutické léčby je kombinovaná chemoterapie FOLFIRINOX nebo gemcitabin/nab-paklitaxel. Právě využití nab-paklitaxelu, jakožto taxanu k terapii karcinomu slinivky, přispělo k většímu zájmu o studium využití taxanů k léčbě PDAC.

Taxany fungují jako vřeténkové jedy, tedy inhibují normální dynamiku mitotického vřeténka, což vede k zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M a vyvolání apoptózy. Jedním z mechanismů navozující apoptózu je stimulace RAS proteinů, jenž posléze aktivuje Raf-1 kinázu. Aktivní Raf-1 vede k fosforylaci Bcl-2 a tedy apoptóze buňky (Blagosklonny *et al.*, 1996).

V této práci byl zkoumán účinek experimentálního taxanu SBT-1216 v koncentraci 30, 100 a 300 nM na již uvedené tři buněčné linie, jenž se vzájemně liší jak z hlediska genetického profilu, tak biologickým chováním.

Největší změny v expresi byly pozorovány u buněčné linie PaCa-44. Jednalo se především o sníženou expresi *PDPK1*, *PIK3CA*, *RALGDS* a *RPS6KA2*. U posledního zmíněného může mít deregulace vliv na proliferaci a diferenciaci buněk. Tyto *in vitro* výsledky se však nepodařilo verifikovat *in vivo*, na myších xenograftech. V případě MIA PaCa-2 došlo k zvýšení exprese *PIK3CG* a snížená hladina exprese byla u genu *MAPK9* a *PTEN*. U wild-type buněčné linie BxPC-3 došlo ke snížení exprese v případě *RAC1*, to by mohlo mít vliv na pohyblivost, adhezi nebo endocytózu buněk. Lze tedy konstatovat, že linie se mezi sebou vzájemně liší, ovšem nepodařilo se prokázat zřejmý, a obecně platící efekt chemoterapie (taxanu SBT-1216) na expresi KRAS signální dráhy u PDAC. Toto zjištění je v souladu s dřívějšími poznatky, že KRAS mutace, ani míra exprese této signální dráhy neovlivňuje přežívání pacientů s karcinomem pankreatu, a ani výsledný fenotyp (expresi mRNA) v tkáni karcinomu pankreatu (Lemstrova *et al.* 2017). Toto zjištění částečně objasňuje dosavadní neúspěch KRAS inhibitorů v cílené léčbě PDAC.

KRAS signální dráha, velmi úzce souvisí s Hedgehog signální dráhou (di Magliano *et al.*, 2006). Právě Hedgehog signální dráha je významně upregulována ve tkáních PDAC, a zároveň dochází k její významné inhibici po terapii taxanem SBT-1216 (Mohelníková-Duchoňová *et al.*, 2017). Lze tedy očekávat podobně synergický efekt kombinované léčby taxany s HH inhibitory. Právě v této studii byl pospán i terapeutický účinek tohoto taxanu u PDAC *in vivo* (Mohelníková-Duchoňová *et al.*, 2017). Působení SBT-1216 taxanu je zkoumána i v souvislosti s léčbou jiných druhů nádorových onemocnění, a v případě rakoviny prsu se zdá být vhodnou alternativou s vyšší protinádorovou aktivitou za běžně používaný paclitaxel (Kovář *et al.*, 2009). Nová generace taxanů má tedy potenciál přispět k léčbě nádorových onemocnění, je ovšem potřeba dalšího zkoumání k nalezení optimální individuální strategie léčby PDAC pacientů a volbu vhodných kombinací cytostatik a preparátů cílené léčby.

6 Závěr

Tato práce byla zaměřena na studium KRAS signální dráhy u duktálního adenokarcinomu pankreatu. V teoretické části byly shrnuty poznatky karcinomu pankreatu z hlediska epidemiologie, diagnostiky a léčby. Bylo nastíněno i využití taxanů v terapii adenokarcinomu slinivky. Teoretická část také sumarizuje fungování KRAS signální dráhy a úlohu protoonkogenu KRAS u karcinomu pankreatu.

Právě narušení fungování KRAS signální dráhy a její deregulace má hlavní vliv na rozvoj karcinomu pankreatu. Pochopení běhu dráhy KRAS, je důležitou součástí k navržení nových léčebných postupů. V poslední době zájem padá na terapeutické využití nové generace taxanů, mezi které spadá mimo jiné i v této práci zkoumaný taxan SBT-1216.

Praktická část byla zaměřena na studium exprese 41 genů hrajících důležitou roli v KRAS signální dráze. Hladiny exprese byly porovnávány mezi jednotlivými buněčnými liniemi *in vitro*, a byly zkoumány i změny exprese po ovlivnění modelových nádorových xenograftů *in vivo* experimentálním taxanem.

KRAS aktivující mutace udržují trvale aktivní KRAS protein, nicméně v naší studii se nepotvrdilo, že by vedly obecně k zvýšené expresi genů signálních drah, které se nacházejí v buněčné signalizaci pod tímto onkogenem. Neprokázáli jsme, že by chemoterapie experimentálním taxanem inhibovala genovou expresi KRAS signální dráhy *in vitro*. Nicméně, některé geny účastníci se této buněčné signalizace byly nalezeny sniženě exprimovány v KRAS mutovaných buněčných liniích po této terapii. Tyto výsledky by měly být dále verifikovány na úrovni exprese a aktivity proteinu a v *in vivo* experimentech. V dříve prováděných výzkumech měl taxan SBT-1216 dobré výsledky na inhibici nádorového růstu, jež svědčily o pozitivních účincích taxanu na potenciální léčbu pacientů nejen s karcinomem pankreatu. Studium nové generace taxanů je proto důležité a do budoucna může přinést ještě mnohé zajímavé výsledky. Jejich důkladné zkoumání může otevřít cestu k novým léčebným možnostem nejen pro duktální adenokarcinom pankreatu.

Použitá literatura

ALESSI, Dario R., et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal*, 1996, 15.23: 6541.

ALMOGUERA, Concepcion, et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant cK-ras genes. *Cell*, 1988, 53.4: 549-554.

ARYA, Manit, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 2005, 5.2: 209-219.

AUER, Herbert, et al. Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis. *Nature genetics*, 2003, 35.4: 292.

BARKER, Christopher J.; LEIBIGER, Ingo B.; BERGGREN, Per-Olof. The pancreatic islet as a signaling hub. *Advances in biological regulation*, 2013, 53.1: 156-163.

BERROZPE, Georgina, et al. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *International journal of cancer*, 1994, 58.2: 185-191.

BHULLAR, Rajinder P.; CHARDIN, Pierre; HASLAM, Richard J. Identification of multiple ral gene products in human platelets that account for some but not all of the platelet Gn-proteins. *FEBS letters*, 1990, 260.1: 48-52.

BLAGOSKLONNY, Mikhail V., et al. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer research*, 1996, 56.8: 1851-1854.

BOS, Johannes L.; REHMANN, Holger; WITTINGHOFER, Alfred. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 2007, 129.5: 865-877.

BOURNET, Barbara, et al. Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: hopes and realities. *European Journal of Cancer*, 2016, 54: 75-83.

BRAND, Randall E., et al. Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. *Gut*, 2007, 56.10: 1460-1469.

CALDAS, Carlos; KERN, Scott E. K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *International journal of pancreatology*, 1995, 18.1: 1-6.

CASTELLANO, Esther; DOWNWARD, Julian. RAS interaction with PI3K more than just another effector pathway. *Genes & cancer*, 2011, 2.3: 261-274.

COLLINS, Meredith A., et al. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of clinical investigation*, 2012, 122.2: 639.

COLLISSON, Eric A., et al. A central role for RAF→ MEK→ ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer discovery*, 2012, 2.8: 685-693.

COOPER, Caroline L.; O'TOOLE, Sandra A.; KENCH, James G. Classification, morphology and molecular pathology of premalignant lesions of the pancreas. *Pathology*, 2013, 45.3: 286-304.

CREWS, Craig M.; ALESSANDRINI, Allesandro; ERIKSON, Raymond L. The primary structure of MEK a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*, 1992, 258.5081: 478-481.

DATTA, Sandeep Robert, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 1997, 91.2: 231-241.

DHANASEKARAN, Danny N.; REDDY, E. Premkumar. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, 2008, 27.48: 6245.

DI MAGLIANO, Marina Pasca, et al. Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer. *Genes & development*, 2006, 20.22: 3161-3173.

DI MAGLIANO, Marina Pasca; LOGSDON, Craig D. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology*, 2013, 144.6: 1220-1229.

DI MARCO, Mariacristina, et al. Characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma using whole transcriptome sequencing and copy number analysis by single-nucleotide polymorphism array. *Molecular medicine reports*, 2015, 12.5: 7479-7484.

DISTLER, Marius, et al. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed research international*, 2014, 2014.

ELSÄSSER, Hans-P., et al. Structural analysis of a new highly metastatic cell line PaTu 8902 from a primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Archiv B*, 1993, 64.1: 201.

ERKAN, Mert, et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. 2011.

ESER, Stefan, et al. Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer cell*, 2013, 23.3: 406-420.

ESER, S., et al. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *British journal of cancer*, 2014, 111.5: 817.

FAUZEE, Nilufer Jasmine Selimah; DONG, Zhi; WANG, Ya-lan. Taxanes: promising anti-cancer drugs. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12.4: 837-51.

FELLER, Stephan M. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene*, 2001, 20.44: 6348.

FERLAY J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014. Dostupné na: <http://globocan.iarc.fr>, získáno 16/01/2015.

FITZGERALD, Timothy L., et al. Roles of EGFR and KRAS and their downstream signaling pathways in pancreatic cancer and pancreatic cancer stem cells. *Advances in biological regulation*, 2015, 59: 65-81.

FREELove, Robert; WALLING, Anne D. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*, 2006, 73.3: 485-92.

FRECH, Matthias, et al. Guanine nucleotide binding properties of the mammalian RalA protein produced in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265.11: 6353-6359.

FUJII, Satoshi, et al. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer science*, 2008, 99.9: 1813-1819.

GELDERBLUM, Hans, et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer*, 2001, 37.13: 1590-1598.

GIARDIELLO, Francis M., et al. Increased risk of cancer in the Peutz–Jeghers syndrome. *New England Journal of Medicine*, 1987, 316.24: 1511-1514.

GIARDIELLO, F. M., et al. Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. *Gut*, 1993, 34.10: 1394-1396.

GLIGOROV, Joseph; LOTZ, Jean Pierre. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences. *The oncologist*, 2004, 9.Supplement 2: 3-8.

GRADIZ, Rui, et al. MIA PaCa-2 and PANC-1–pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. *Scientific reports*, 2016, 6: 21648.

GUERTIN, David A.; SABATINI, David M. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell*, 2007, 12.1: 9-22.

HALDAR, Subrata; BASU, Aruna; CROCE, Carlo M. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer research*, 1997, 57.2: 229-233.

HAN, Limin, et al. Protein binding and signaling properties of RIN1 suggest a unique effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94.10: 4954-4959.

HERNÁNDEZ, Samuel E., et al. How do Abl family kinases regulate cell shape and movement?. *Trends in cell biology*, 2004, 14.1: 36-44.

HEZEL, Aram F., et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*, 2006, 20.10: 1218-1249.

HIDALGO, Manuel; MAITRA, Anirban. The hedgehog pathway and pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*, 2009, 361.21: 2094.

HIPPERT, Melanie M.; O'TOOLE, Patrick S.; THORBURN, Andrew. Autophagy in cancer: good, bad, or both?. *Cancer research*, 2006, 66.19: 9349-9351.

HRUBAN, Ralph H., et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *The American journal of pathology*, 1993, 143.2: 545.

HRUBAN, R. H., et al. Genetics of pancreatic cancer. From genes to families. *Surgical oncology clinics of North America*, 1998, 7.1: 1-23.

HRUBAN, Ralph H., et al. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *The American journal of surgical pathology*, 2004, 28.8: 977-987.

HU, Hailiang, et al. RIN1 is an ABL tyrosine kinase activator and a regulator of epithelial-cell adhesion and migration. *Current Biology*, 2005, 15.9: 815-823.

HUANG, WEIDONG; KESSLER, D. S.; ERIKSON, R. L. Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. *Molecular biology of the cell*, 1995, 6.3: 237-245.

CHAIKA, Nina V., et al. MUC1 mucin stabilizes and activates hypoxia-inducible factor 1 alpha to regulate metabolism in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109.34: 13787-13792.

CHEN, H., et al. K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 2010, 36.7: 657-662.

CHEN, Yongqiang; KLIONSKY, Daniel J. The regulation of autophagy—unanswered questions. *J Cell Sci*, 2011, 124.2: 161-170.

CHONG, Huiru; LEE, Jeeyong; GUAN, Kun-Liang. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *The EMBO journal*, 2001, 20.14: 3716-3727.

IACOBUZIO-DONAHUE, Christine A., et al. DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology*, 2009, 27.11: 1806-1813.

IKEUCHI, Nobuhito, et al. Prognosis of cancer with branch duct type IPMN of the pancreas. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2010, 16.15: 1890.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER; 2016. Dostupné na: <http://globocan.iarc.fr>, získáno 23/11/2016

JASTER, Robert. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Molecular cancer*, 2004, 3.1: 26.

JELINEK, Tomas, et al. Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16.3: 1027-1034.

JONES, Siân, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *science*, 2008, 321.5897: 1801-1806.

KIM, Sunhong, et al. Cyclic AMP inhibits Akt activity by blocking the membrane localization of PDK1. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276.16: 12864-12870.

KIMMELMAN, Alec C. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes & development*, 2011, 25.19: 1999-2010.

KLEIN, Alison P., et al. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer research*, 2004, 64.7: 2634-2638.

KLIMSTRA, David S.; LONGNECKER, Daniel S. K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *The American journal of pathology*, 1994, 145.6: 1547.

KOLCH, Walter. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*, 2000, 351.2: 289-305.

KOORSTRA, Jan-Bart M., et al. Morphogenesis of pancreatic cancer: role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs). *Langenbeck's archives of surgery*, 2008a, 393.4: 561-570.

KOORSTRA, Jan-Bart M., et al. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology*, 2008b, 8.2: 110-125.

KOVÁŘ, JAN, et al. Comparison of cell death-inducing effect of novel taxane SB-T-1216 and paclitaxel in breast cancer cells. *Anticancer research*, 2009, 29.8: 2951-2960.

KRANENBURG, Onno. The KRAS oncogene: past, present, and future. 2005.

KŘÍŽKOVÁ, Květoslava. Příprava a charakterizace selektivních analogů insulínu a IGF-II pro různé isoformy insulinového receptoru, 2014.

KULLMANN, F., et al. KRAS mutation in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: results of a multicenter phase II study evaluating efficacy of cetuximab plus gemcitabine/oxaliplatin (GEMOX CET) in first-line therapy. *Oncology*, 2011, 81.1: 3-8.

LAVELLE, F.; GUERITTE-VOEGELEIN, F.; GUENARD, D. Taxotere: from yew's needles to clinical practice. *Bulletin du cancer*, 1993, 80.4: 326-338.

LEE, Jeeyun, et al. Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 2007, 109.8: 1561-1569.

LEMSTROVA, Radmila, et al. Dysregulation of KRAS signaling in pancreatic cancer is not associated with KRAS mutations and outcome. *Oncology letters*, 2017, 14.5: 5980-5988.

LI, Donghui, et al. Pancreatic cancer. *The Lancet*, 2004, 363.9414: 1049-1057.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 2001, 25.4: 402-408.

LONGNECKER, Daniel S., et al. Histopathological diagnosis of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary-mucinous neoplasms: interobserver agreement. *Pancreas*, 2005, 31.4: 344-349.

LOWENFELS, Albert B.; MAISONNEUVE, Patrick. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 2006, 20.2: 197-209.

LU, Xinghua, et al. Detecting K-ras and p53 gene mutation from stool and pancreatic juice for diagnosis of early pancreatic cancer. *Chinese medical journal*, 2002, 115.11: 1632-1636.

MCCUBREY, James A., et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2007, 1773.8: 1263-1284.

MAERTENS, Ophélie; CICHOWSKI, Karen. An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer. *Advances in biological regulation*, 2014, 55: 1-14.

MAITRA, Anirban; HRUBAN, Ralph H. Pancreatic cancer. *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.*, 2008, 3: 157-188.

MANN, Karen M., et al. KRAS-related proteins in pancreatic cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 2016, 168: 29-42.

MARAIS, Richard, et al. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272.7: 4378-4383.

MATALLANAS, David; CRESPO, Piero. New druggable targets in the Ras pathway. 2010.

MENDOZA, Michelle C.; ER, E. Emrah; BLENIS, John. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences*, 2011, 36.6: 320-328.

MISAWA, Hiroyuki, et al. Cloning and characterization of a novel class II phosphoinositide 3-kinase containing C2 domain. *Biochemical and biophysical research communications*, 1998, 244.2: 531-539.

MIZUTANI, Shin, et al. Involvement of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS letters*, 2001, 507.3: 295-298.

MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Beatrice, et al. Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas*, 2011, 40.1: 72-78.

MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B., et al. Hedgehog pathway overexpression in pancreatic cancer is abrogated by new-generation taxoid SB-T-1216. *The pharmacogenomics journal*, 2017, 17.5: 452.

MOORE, Patrick S., et al. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. *Virchows Archiv*, 2001, 439.6: 798-802.

MORIMOTO, Alyssa M., et al. The MMAC1 tumor suppressor phosphatase inhibits phospholipase C and integrin-linked kinase activity. *Oncogene*, 2000, 19.2: 200.

MOSKALUK, Christopher A.; HRUBAN, Ralph H.; KERN, Scott E. p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer research*, 1997, 57.11: 2140-2143.

MOSQUERA; Real-Time Quantitative PCR Data Analysis. [online]. Dostupné z: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:RIMGfA-blqsJ:ueb.vhir.org/dl777+&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz> [Citace: 5. března 2018].

National Cancer Institute [online]. Dostupné z: https://www.cancer.gov/types/pancreatic/hp/pancreatic-treatment-pdq#link/_96_toc [Citace: 17. srpna 2017].

NEESSE, Albrecht, et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*, 2011, 60.6: 861-868.

NICHOLSON, Karleen M.; ANDERSON, Neil G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling*, 2002, 14.5: 381-395.

OLIVEIRA-CUNHA, Melissa; NEWMAN, William G.; SIRIWARDENA, Ajith K. Epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer. *Cancers*, 2011, 3.2: 1513-1526.

PARSONS, Barbara L.; MENG, Fanxue. K-RAS mutation in the screening, prognosis and treatment of cancer. *Biomarkers in medicine*, 2009, 3.6: 757-769.

PFAFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 2001, 29.9: e45-e45.

PFAFFL, Michael W. Relative quantification. *Real-time PCR*, 2006, 63: 63-82.

PLATTNER, Rina, et al. c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes & development*, 1999, 13.18: 2400-2411.

POUYSSÉGUR, Jacques; VOLMAT, Véronique; LENORMAND, Philippe. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochemical pharmacology*, 2002, 64.5: 755-763.

PRONK, Linda C.; STOTER, Gerrit; VERWEIJ, Jaap. Docetaxel (Taxotere): single agent activity, development of combination treatment and reducing side-effects. *Cancer treatment reviews*, 1995, 21.5: 463-478.

PUSTERLA, N.; MADIGAN, J. E.; LEUTENEGGER, C. M. Real-time polymerase chain reaction: a novel molecular diagnostic tool for equine infectious diseases. *Journal of veterinary internal medicine*, 2006, 20.1: 3-12.

PYLAYEVA-GUPTA, Yuliya; GRABOCKA, Elda; BAR-SAGI, Dafna. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature reviews. Cancer*, 2011, 11.11: 761.

RABINOWITZ, Joshua D.; WHITE, Eileen. Autophagy and metabolism. *Science*, 2010, 330.6009: 1344-1348.

RAIMONDI, Sara; MAISONNEUVE, Patrick; LOWENFELS, Albert B. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2009, 6.12: 699-708.

RAJALINGAM, Krishnaraj, et al. Prohibitin is required for Ras-induced Raf–MEK–ERK activation and epithelial cell migration. *Nature cell biology*, 2005, 7.8: 837-843.

REBOURS, Vinciane, et al. The natural history of hereditary pancreatitis: a national series. *Gut*, 2009, 58.1: 97-103.

ROSKOSKI, Robert. Src protein–tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004, 324.4: 1155-1164.

ROSSI, Maria L.; REHMAN, Azeem A.; GONDI, Christopher S. Therapeutic options for the management of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 2014, 20.32: 11142-11159.

ROZENBLUM, Ester, et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer research*, 1997, 57.9: 1731-1734.

SEMENZA, Gregg L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development*, 2010, 20.1: 51-56.

SENGUPTA, Shomit; PETERSON, Timothy R.; SABATINI, David M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular cell*, 2010, 40.2: 310-322.

SCHIFF, Peter B.; HORWITZ, Susan Band. Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry*, 1981, 20.11: 3247-3252.

SCHROEDER, Andreas, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 2006, 7.1: 3.

SIPOS, Bence, et al. A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Archiv*, 2003, 442.5: 444-452.

SMIT, Vincent THBM, et al. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic acids research*, 1988, 16.16: 7773-7782.

SPALDING, Duncan; WILLIAMSON, R. C. N. Pancreatic cancer. *Medicine*, 2011, 39.5: 274-278.

STEELE, C. W., et al. Exploiting inflammation for therapeutic gain in pancreatic cancer. *British journal of cancer*, 2013, 108.5: 997.

SVOD. SVOD [online]. Dostupné z: <http://svod.cz/?sec=analyzy> [Citace: 29. srpna 2017].

STEELMAN, L. S., et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*, 2004, 18.2: 189-218.

TAN, Mong H., et al. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer investigation*, 1986, 4.1: 15-23.

TANOUE, Takuji, et al. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *The EMBO journal*, 2001, 20.3: 466-479.

THOTA, Ramya; PAUFF, James M.; BERLIN, Jordan D. Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review. *Oncology (Williston Park)*, 2014, 28.1: 70-4.

URANO, Takeshi; EMKEY, Renee; FEIG, Larry A. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *The EMBO journal*, 1996, 15.4: 810.

VAN DER GEER, Peter; HUNTER, Tony; LINDBERG, Richard A. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annual review of cell biology*, 1994, 10.1: 251-337.

VAN ETTEN, Richard A. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends in cell biology*, 1999, 9.5: 179-186.

VANHAESEBROECK, Bart; ALESSI, Dario R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochemical Journal*, 2000, 346.3: 561-576.

VINCENT, Audrey, et al. Pancreatic cancer. *The Lancet*, 2011, 378.9791: 607-620.

VON HOFF, Daniel D., et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, 2013, 369.18: 1691-1703.

WANI, Mansukhlal C., et al. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93.9: 2325-2327.

WARBURG, Otto. On the origin of cancer. *Science*, 1956, 123.3191: 309-314.

WEINBERG, Robert A. Fewer and fewer oncogenes. *Cell*, 1982, 30.1: 3-4.

WEINBERG, Robert. *The biology of cancer*. Garland science, 2013.

WITKIEWICZ, Agnieszka K., et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nature communications*, 2015, 6.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. *World Health Organization Mortality Database*. World Health Organization, 2016.

YAN, Jun, et al. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273.37: 24052-24056.

YAN, Li, et al. Molecular analysis to detect pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk groups. *Gastroenterology*, 2005, 128.7: 2124-2130.

YANG, Shenghong, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & development*, 2011, 25.7: 717-729.

YING, Haoqiang, et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 2012, 149.3: 656-670.

YONEZAWA, Suguru, et al. Precursor lesions of pancreatic cancer. *Gut and liver*, 2008, 2.3: 137.

YUNIS, Adel A.; ARIMURA, Grace K.; RUSSIN, David J. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *International journal of cancer*, 1977, 19.1: 128-135.

ZAMBONI, Giuseppe, et al. Precancerous lesions of the pancreas. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 2013, 27.2: 299-322.

ZENKER, Martin, et al. Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations. *Journal of medical genetics*, 2007, 44.2: 131-135.