

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Genetické změny u nemalobuněčného  
karcinomu plic**

**Bakalářská práce**

**Machálková Anna**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční  
**Olomouc**

**Olomouc 2012 Vedoucí práce: Mgr. Vladimíra Koudeláková**

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

V Olomouci dne

.....

Machálková Anna

Děkuji Mgr. Vladimíře Koudelákové za cenné rady a připomínky, odborné vedení bakalářské práce, konzultační hodiny a za poskytnutí literatury, Soně Mlčochové za rady a pomoc při práci v laboratoři a doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za poskytnutí pracovního zázemí.

## I. BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Anna Machálková  
Název práce: Genetické změny u nemalobuněčného karcinomu plic  
Typ práce: bakalářská  
Pracoviště: Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární  
a translační medicíny  
Vedoucí práce: Mgr. Vladimíra Koudeláková  
Rok obhajoby práce: 2012

### Abstrakt:

Karcinom plic je onemocnění s nejvyšší celosvětovou mortalitou, včasná a správná diagnostika hraje zásadní roli. V současné době je známo několik genů, jejichž mutace je zodpovědná za vznik plicního karcinomu. Teoretická část práce je literární rešerší genetických aberací, nalezených u nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). Je zde popsán význam mutací genu EGFR, KRAS v predikci léčebného režimu. Největší pozornost je věnována aberacím genu ALK, jehož detekci se věnuje i experimentální část této práce. Nejpoužívanější metodou pro detekci přestavby EML4-ALK je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která je dostatečně citlivá a přesná. Hlavním problémem jsou ovšem velké pořizovací náklady fluorescenčně značených sond. V experimentální části je popsána příprava fluorescenčně značené sondy k detekci přestavby EML4-ALK u nemalobuněčného karcinomu plic, ověření její dostatečné hybridizace, specifity vazby a sensitivity při detekci přestaveb EML4-ALK. Tato sonda je použitelná pro diagnostiku ALK přestaveb u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic.

Klíčová slova: NSCLC, ALK, EGFR, KRAS, karcinom plic  
Počet stran: 51  
Počet příloh: 0  
Jazyk: český

## II. BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Anna Machálková
Title	Genetic changes in non-small cell lung cancer
Type of thesis	bachelor
Department	Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor	MSc. Vladimíra Koudeláková
The year of presentation	2012

### Abstract

Lung cancer is a disease with the highest mortality worldwide. Early and proper diagnosis is very important. Currently there are several genes known as driver mutations causing lung cancer. Genetic aberrations found in non-small cell lung cancer (NSCLC) are summarized in the theoretical part of the thesis. Especially, significance of EGFR and KRAS mutations for prediction of proper treatment efficiency is described. The main content of the thesis is ALK gene rearrangement, detection of this aberration is goal of the experimental part. The most common method for detection of EML4-ALK fusion is FISH (fluorescence *in situ* hybridization) which is sufficiently sensitive and accurate. High acquisition costs of fluorescent probes still remain as the main problem. In the experimental part of the thesis a preparation of probe for EML4-ALK rearrangement detection is described. Verification of sufficient hybridization, binding specificity and proper sensitivity in detection of EML4-ALK fusion is described. This probe is usable for molecular diagnostics of ALK rearrangement in non-small cell lung cancer patients.

Keywords	NSCLC, ALK, EGFR, KRAS, lung cancer
Number of pages	51
Number of appendices	0
Language	Czech

### **III. OBSAH**

<b>I.</b>	<b>BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE.....</b>	<b>4</b>
<b>II.</b>	<b>BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION.....</b>	<b>5</b>
<b>III.</b>	<b>OBSAH.....</b>	<b>6</b>
<b>IV.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	
<b>1.</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Mutace u solidních nádorů.....</b>	<b>12</b>
2.1	Translokace.....	12
2.1.1	Fúzní gen.....	13
2.1.2	Translokace za promotory jiných genů.....	13
2.2	Duplikace.....	13
2.3	Amplifikace.....	14
2.4	Bodové mutace.....	14
2.5	Delece.....	14
2.5.1	Tumor supresorové geny.....	15
2.6	Inverze.....	15
<b>3.</b>	<b>Vznik nádorových onemocnění.....</b>	<b>17</b>
<b>4.</b>	<b>Nemalobuněčný karcinom plic.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1.</b>	<b>Gen ALK.....</b>	<b>20</b>
4.1.1	Gen ALK a jeho přestavby.....	20
4.1.2.	Detekce změn u ALK.....	21
4.1.3	Gen ALK a jeho inhibitory.....	22
<b>4.2</b>	<b>Gen EGFR .....</b>	<b>23</b>
4.2.1	Mutace genu EGFR.....	23

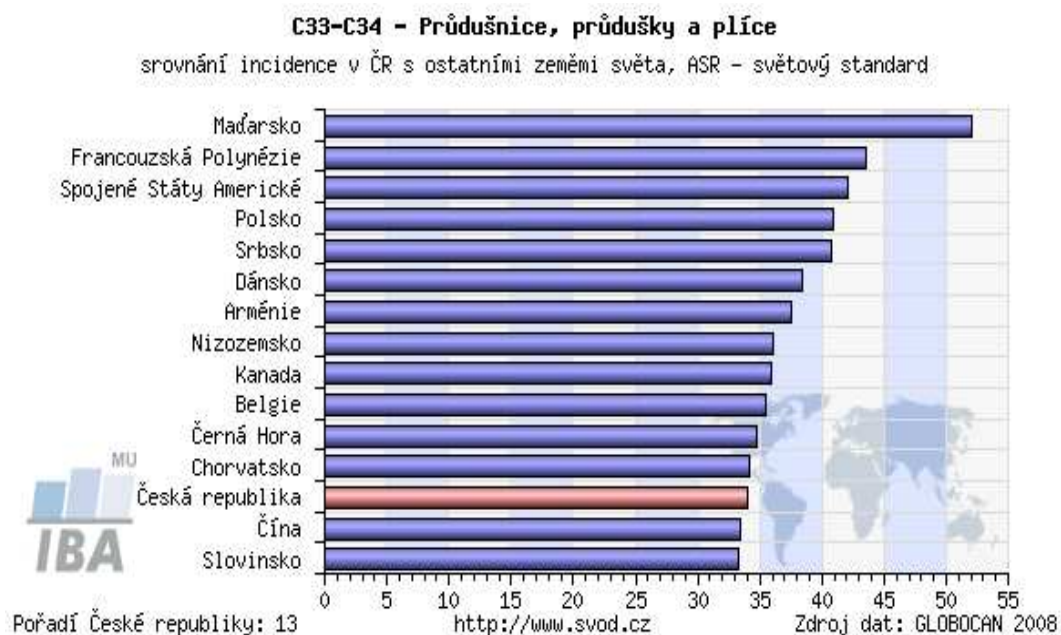
4.2.2	Cílená terapie pomocí inhibitorů.....	23
4.2.3	Rezistence na inhibitory EGFR kinázy (EGFR TKI).....	24
<b>4.3</b>	<b>Gen KRAS.....</b>	<b>24</b>
4.3.1	KRAS mutace.....	24
4.3.1.1	KRAS mutace u nádorů pankreatu a tlustého střeva.....	24
4.3.1.2	KRAS mutace u NSCLC.....	25
4.3.2	KRAS mutace u NSCLC a rezistence na inhibitory tyrozinkináz.....	26
<b>V.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	
<b>1.</b>	<b>Příprava bakteriální kultury.....</b>	<b>27</b>
1.1	Kultivace bakteriální kultury.....	28
1.2	Izolace plazmidu.....	28
1.2.1	Fluorescenční značení izolovaného plazmidu.....	29
<b>2.</b>	<b>FISH.....</b>	<b>30</b>
2.1	Příprava parafinového řezu pro FISH.....	31
2.2	Příprava mitotických skel pro FISH.....	32
2.3	Odmytí nenavázané sondy.....	32
<b>3.</b>	<b>Výsledky a diskuze.....</b>	<b>34</b>
<b>VI.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>39</b>
<b>VII.</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>40</b>
<b>VIII.</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>49</b>

## IV. TEORETICKÁ ČÁST

### 1. Úvod

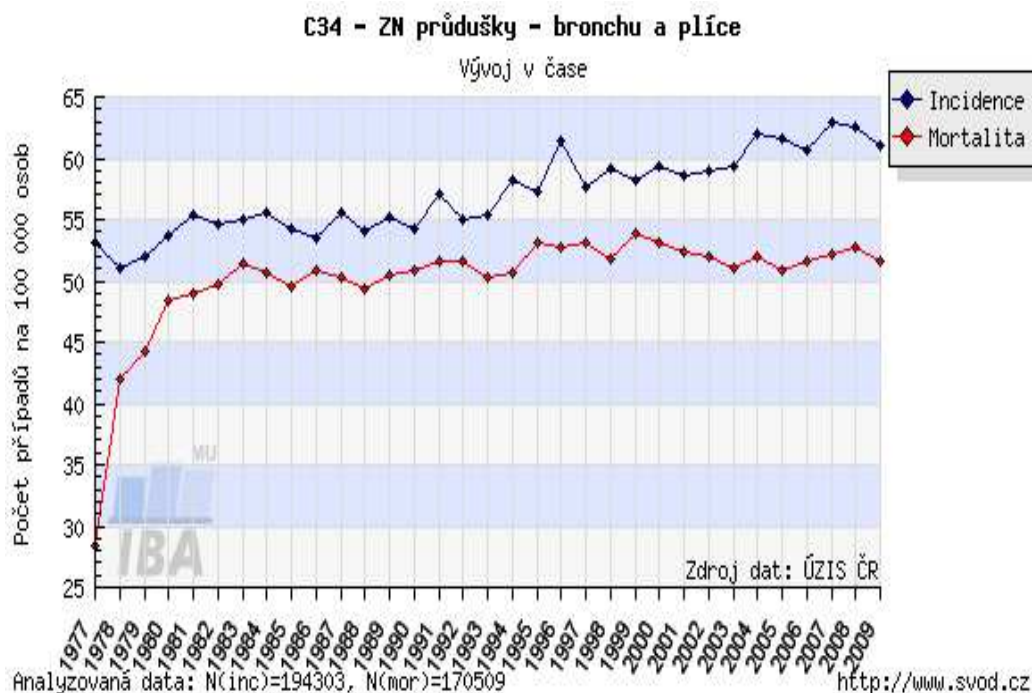
Karcinom plic se označuje jako onemocnění s nejvyšší světovou mortalitou. Ročně karcinomem plic v České republice onemocní více než 1000 nových pacientů. Česká republika zaujímá v porovnání s ostatními zeměmi v incidenci plicního karcinomu 13. místo (graf č. 1). Přestože se incidence plicního karcinomu zvyšuje, lze pozorovat dlouhodobou stagnaci mortality (graf č. 2).

Graf č. 1 Incidence plicního karcinomu v ČR v porovnání s ostatními zeměmi (Dušek et al, 2007)





Graf č. 2 Vývoj incidence a mortality karcinomu plic (Dušek et al, 2007)



Tabulka č. 1: Vývoj incidence a mortality karcinomu plic u žen v čase (Dušek et al, 2007).

V tabulkách je použita jednotka *ASR* (*Age Standardized Rate*). Tato jednotka představuje věkově standardizovanou incidenci. Vyjadřuje počet případů na 100 000 osob, kdyby měla zkoumaná populace stejnou věkovou strukturu jako populace standardu.

Rok	1977	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2009
Incidence	5,78	6,63	8,02	9,1	12,24	14,55	15,57	17,9
Mortalita	3,22	5,34	6,94	8,11	10,41	11,51	11,88	12,73

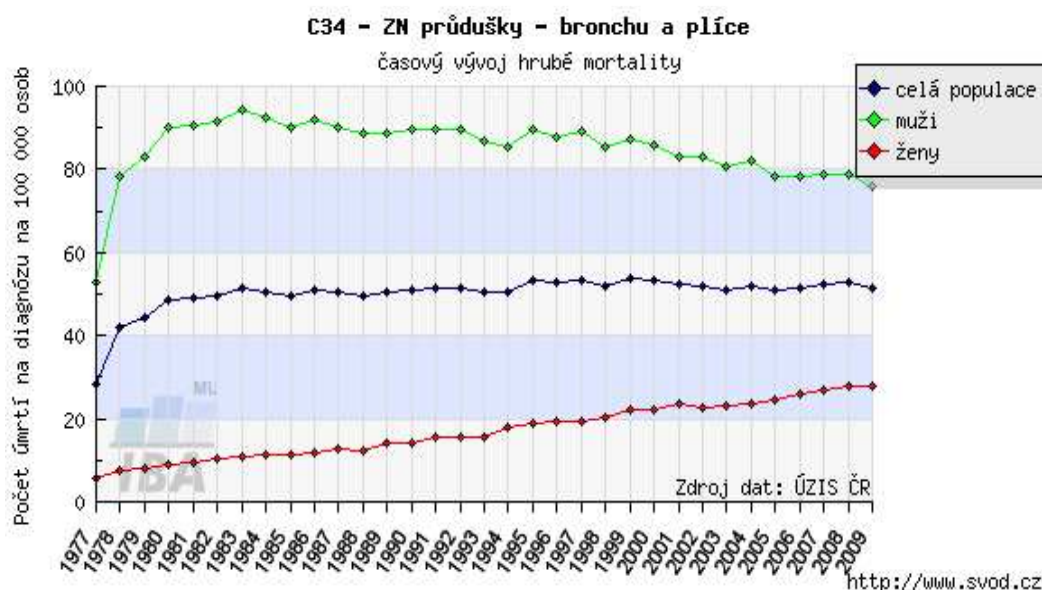
Tabulka č. 2 : Vývoj incidence a mortality (ASR) karcinomu plic u mužů v čase (Dušek et al, 2007)

Rok	1977	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2009
Incidence	74,64	75,97	77,19	75,29	70,74	64,56	58,21	51,14
Mortalita	38,70	68,28	70,01	70,35	66,38	58,68	48,67	43,98

Incidence a mortalita plicního karcinomu je rozdílná v jednotlivých krajích České republiky a je závislá rovněž na pohlaví. Mortalita nemocných žen trpících karcinomem plic se za více než třicet let zvýšila téměř čtyřnásobně, oproti tomu

mortalita u mužů s plicním karcinomem se zvýšila jen nepatrně. Incidence u žen se za stejnou časovou jednotku zvýšila třikrát, incidence plicního karcinomu u mužů naopak klesla (viz graf č. 3)

Graf č. 3 Časový vývoj hrubé mortality u celé populace, u mužů a u žen (Dušek et al, 2007).



Karcinom plic je nejčastějším maligním onemocněním u mužů i u žen. Pacienti s plicním karcinomem mají všeobecně velmi nepříznivou prognózu a vysokou úmrtnost v porovnání s ostatními karcinomy. Nermalobuněčný plicní karcinom (NSCLC), který zaujímá 85 % plicních karcinomů, je mnohem častější u mužů, u kuřáků a u starších osob. Nejčastějším podtypem NSCLC je adenokarcinom (40 %), jehož podtyp, bronchoalveolární karcinom, je mnohem častější u žen, nekuřáků a u mladších pacientů.

Bylo provedeno mnoho genetických analýz se snahou nalézt vztah mezi úmrtností na karcinom plic a genetickou zátěží. Soubor zahrnoval 15 924 dvojčat (jednovaječné i dvojvaječné), u nichž byl analyzován genetický vliv na onemocnění karcinomem plic. Souvislost zvýšené genetické predispozice a vzniku plicního karcinomu však prokázána nebyla. Nebyla prokázána zvýšená predispozice k onemocnění karcinomem plic mezi jednovaječnými a dvojvaječnými dvojčaty (Braun et al, 1994).

Další neopomenutelnou složkou genetické zátěže je zátěž etnická a rasová, kterou se zabývá řada studií. Haiman et al., 2006 publikoval práci, ve které byli testováni jedinci s plicním karcinomem různého etnického původu (afričtí Američané, Japonci, Latino-Američané, domorodí Hawajané a kavazská popluace). Sledovali 1979 případů po dobu 8 let. Zjistili, že ve vzorku kuřáků cigaret, mají afričtí Američané a domorodí Hawajané vyšší predispozice vzniku plicního karcinomu v porovnání s ostatními (**Haiman et al., 2006**). Na základě výsledů studie se rozpoutala diskuze o problémech, které se týkaly rasových a etnických rozdílů ve vztahu k četnosti onemocnění. Díky dalším studiím bylo potvrzeno, že existují významné genetické rozdíly mezi jednotlivými etniky. U nemalobuněčného karcinomu plic je například mnohonásobně vyšší výskyt EGFR a ALK mutací v asijské populaci oproti K-RAS mutacím, které se vyskytují převážně v kavkazské populaci. (**Riely et al., 2008; Risch , 2006**).

## 2. Mutace u solidních nádorů

Podstatou dědičnosti jsou geny, které se během rozmnožování přenášejí z rodičovské generace na potomky. Genetická informace je uložena v genových sekvencích, které jsou tvořeny z párů nukleotidů. Tato genetická informace je během celého procesu dělení a rozmnožování neustále kontrolována a opravována různými kontrolními mechanismy, ale i přesto dochází k chybám. Mezi kontrolní mechanismy můžeme zařadit regulace kontrolních bodů buněčného cyklu. Pokud selže kterýkoliv z kontrolních mechanismů (např. exonukleázová aktivita DNA polymerázy, fotolyáza, 10<sup>6</sup>-methyl-guanin-DNA-methyltransferáza), dojde k chybě, jsou tyto chyby označovány jako mutace. Mutacemi nazýváme změnu genetického materiálu, ale i samotný proces, při kterém tyto změny vznikají (Snustad, Simmons, 2009). Mutace vytváří morfologické změny, změny enzymatické, změny v nutričních požadavcích, vnímavosti na antibiotika. Pojmeme mutageny, tedy látky vyvolávající mutace, rozumíme fyzikální jevy (ionizující a UV záření) nebo jevy chemické, které způsobují změny DNA a vedou k mutacím (Janovská et al., 2002). Mutace lze rozdělit na spontánní a indukované. Spontánní mutace vznikají bez zjevné příčiny z vnějšího prostředí. Většina nádorových onemocnění je způsobena spontánními mutacemi v prenádorové tkáni, hromaděním mutací dochází ke kancerogenezi. Mutace indukované vznikají působením mutagenů (chemických, fyzikálních). Mutace mohou být balancované (u nichž se obsah genomické DNA nemění) nebo nebalancované (při nichž dochází ke ztrátám či zisku genetického materiálu). Mezi mutace můžeme zařadit bodové mutace, translokace, inverze, duplikace, amplifikace a delece.

### 2.1 Translokace

Translokací označujeme přesun části genetické informace na jiné místo v genomu. Příčinou je zlom a následné chybné spojení. Existují dva typy translokací - reciproká a nereciproká. Reciproká translokace se řadí mezi balancované změny. Při reciproké translokaci dochází k výměně chromozomálních úseků, množství genetické informace zůstává stále stejné, jen geny samotné se dostanou na odlišné místo. Při nereciproké translokaci dochází ke zlomu, na zlomený chromozom se

ale nic nepřipojí a genetická informace je v průběhu dělení ztracena. K aktivaci onkogeny translokací může dojít dvěma způsoby, a to vznikem fúzního genu nebo translokací za konstitutivně aktivní promotor jiného genu (nejčastěji promotor imunoglobulinů).

### 2.1.1 Vznik fúzního genu

Projevem fúzního genu je nejčastěji exprese fúzního proteinu s odlišnými vlastnostmi. Mezi nejznámější fúzní geny patří reciproká translokace t(9;22)(q34;q11), při níž vzniká Filadelfský (Ph) chromozom, nejčastěji nalézáný u chronické myeloidní leukemie (CML). V místě zlomu jsou lokalizovány onkogeny c-abl (chromozom 9) a bcr (chromozom 22), které tvoří silně onkogenní fúzní gen bcr-abl (**Snustad et al., 2009**). Díky objevu této driver mutace se prognóza pacientů s chronickou myeloidní leukémií rapidně zlepšila. Pro léčbu pacientů s CML se používá tyrozin-kinázový inhibitor imatinib mesylát (Glivec). U pacientů s CML má Glivec enormní účinnost a zároveň i snižuje možnost opakované recidivy (**Druker et al., 2001**).

### 2.1.2 Translokace za promotory jiných genů

Jsou zvláštním druhem translokací, které jsou spojeny s onkogenezí (**Janz, 2006**). Translokací za promotory imunoglobulinů, které jsou konstitutivně exprimovány, dochází ke konstitutivní transkripci onkogeny. Jedním z příkladů je translokace onkogeny MYC (C-MYC) genu. C-MYC gen se nachází na chromozomu 8 (8q24), je to onkogen často aberovaný u nádorových onemocnění, u hematologických malignit dochází k translokaci tohoto genu za promotory imunoglobulinů (**Blick et al, 1986**). Tato translokace, ať už s jejich těžkým či lehkým řetězcem, způsobuje onkogenetické změny při dozrávání B lymfocytů (např. Burkittův lymfom) (**Janz, 2006**).

## 2.2 Duplikace

Jsou-li přítomny nadbytečné chromozomové segmenty, označujeme tento jev jako duplikace. Duplikace patří ke strukturním aberacím chromozomů. Organismus s touto mutací je označován jako hyperploidní pro danou část genetické informace, která se na odpovídajícím segmentu nachází. Pokud je duplikace

dostatečně velká, lze ji odhalit na mitotických chromozomech pomocí Q a G proužkování. Duplikované segmenty se mohou nacházet na kterémkoliv chromozomu, či mohou existovat jako nové separátní chromozomy (tzv. volná duplikace) (Snustad et al., 2009).

### 2.3 Amplifikace

Jako amplifikace je označováno mnohonásobné zmnožení genetické informace či malých chromozomálních úseků, které je často spojeno se zvýšenou expresí genů, které jsou lokalizovány v amplifikované oblasti.

Právě díky amplifikaci daného onkogenu, dojde k jeho nadměrné expresi - aktivaci, ke které by bez zesílení nedošlo. Jako příklad lze uvést amplifikaci genu Her-2/neu, která se vyskytuje přibližně u 15 % pacientů s karcinomem prsu. Gen Her-2/neu a gen EGFR patří do rodiny transmembránových proteinů, které jsou u celé řady nádorů aktivovány pomocí amplifikace. Gen Her-2/neu je transmembránový receptor, na který existuje velmi účinná biologická léčba, která je účinná u amplifikovaných případů (Herceptin) (Artemov et al, 2003).

### 2.4 Bodové mutace

Bodové mutace jsou tím typem mutací, které ovlivňují jednotlivé geny na úrovni párů bází. Patří sem prostá záměna jednoho páru bází za jiný, či inverze nebo delece jednoho nebo více párů bází ve specifickém místě genu. Může dojít k záměně pyrimidinové báze za pyrimidinovou, či purinové báze za purinovou. V těchto případech hovoříme o tranzici. Pokud však dojde k záměně purinu za pyrimidin či naopak, hovoříme už o transverzi.

Nejnámějším druhem bodových mutací jsou mutace genu EGFR. Tyto mutace jsou nejčastější driver mutace, způsobující karcinom plic. Mutace genů BRCA1 a BRCA2 způsobují dědičná nádorová onemocnění prsu a ovaria.

### 2.5 Delece

Jako delecí označujeme ztrátu části chromozomu. Velké delece je možno rozlišit na mitotických chromozomech pomocí pruhovacích metod, avšak u velmi malých delecí je tato detekce nemožná. U diploidních organismů způsobuje delece části

chromozomu hypoploidii, což má za následek četné fenotypové příznaky. Na rozsahu chybějícího segmentu závisí i míra projevu, tedy klinických příznaků, dané mutace (**Snustad et al., 2009**).

### **2.5.1 Tumor supresorové geny**

U onkologických onemocnění dochází nejčastěji k delecím tumor supresorových genů jako např. genu p53 či genu RB1 (**Kepák et al, 2007**). Tumor supresorové geny jsou recesivní, to znamená, že k jejich aktivaci je nutné poškození či vypnutí obou alel. Tumor supresorový gen p53 je lokalizován na chromozomu 17 (17p13). Jeho aberace jsou nalézány až u 60 % NSCLC (**Skácel et al, 2002**). p53 zachovává genetickou integritu buňky a také u buněk s poškozenou DNA iniciuje spolu s bcl-2 apoptózu (**Barnes et al., 1996**). Mutace a delece tohoto genu jsou nalézány už v preneoplastických lezích (dysplazii, metaplazii a hyperplazii) (**Skácel et al, 2002**). Nalezneme je však i u téměř všech nádorových onemocnění, jako je např. karcinom plic, karcinom prsu, anaplastický astrocytom, glioblastom, AML, nádory močového měchýře a retinoblastom. Pokud je gen p53 funkční a rozpozná mutagenézi, buňka se sama zničí apoptózou. Stav tohoto genu je ukazatelem dané agrese nádorů a ukazuje i pravděpodobnost odpovědi na léčbu, která způsobuje poškození DNA (např. radioterapie) (**Barnes et al , 1996**).

Tumor supresorový gen RB1 (retinoblastoma gen) je lokalizován na chromozomu 13 (13q14) (**Skácel et al, 2002**). Tento gen hraje zásadní roli při regulaci buněčného cyklu, při jeho inaktivaci dochází k deregulaci a tumorigenezi. Ztráta nebo inaktivace RB1 genu vede ke vzniku a rozvoji nádorového onemocnění (**Kepák et al, 2007**). Gen RB1 je inaktivován až u 30 % NSCLC (**Skácel et al, 2002**).

### **2.6 Inverze**

Jako inverzi označujeme mutaci, kdy na chromozomu dochází ke dvěma zlomům, úsek mezi těmito dvěma zlomy se převrátí o 180° a znovu se spojí do původního chromozomu. Inverzí tedy dochází ke změně linearity pořadí genů v daném segmentu. Podle toho, zda invertovaný úsek chromozomu obsahuje oblast

centromery či nikoliv, rozlišujeme inverzi pericentrickou (zahrnující centromeru) a paracentrickou (nezahrnující centromeru).

Inverze mohou být indukované (např. působením rentgenového záření) nebo spontánní (např. důsledkem přesunu transponovatelných elementů). Typickým příkladem inverze je inverze na chromozomu 2 (2p21p23) vedoucí ke vzniku fúzního genu EML4-ALK. Fúze genů EML4-ALK je příčinou 2-7 % případů nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC).



### 3. Vznik nádorového onemocnění

V každé buňce jsou přítomné protoonkogeny, které regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci. Kódují proteiny, které fungují jako růstové faktory, jejich receptory, tyrosin-kinázové, nukleární a cytoplazmatické proteiny. Při mutaci, vedoucí ke změnám buňky se protoonkogeny mění na onkogeny.

Aby došlo ke vzniku nádoru, je třeba k počáteční mutaci pouze jedné buňky, která se začne nekontrolovatelně množit. V následující generaci buněk dochází k hromadění genetických mutací, díky kterým dochází ke zvětšování nádoru a ten nakonec metastazuje do ostatních částí těla. Pokud dojde k metastazování, každá takto přemístěná buňka je schopna nového dělení a tím tvoří další nádorová seskupení. Tzv. rakovinné kmenové buňky, které mají také schopnost se nekontrolovatelně dělit, dávají vzniknout směsím nádorových buněk s různými vlastnostmi a různou délkou životnosti.

Tento typ kmenových buněk pozbyl základní funkci, signály pro zastavení nekontrolovatelného dělení jsou ignorovány. Potvrzení této zodpovědnosti rakovinových buněk za vznik nádorů odpovídá na otázku, proč tradiční způsoby léčby selhávají. Rakovinné kmenové buňky dokáží vstoupit do klidového stadia, přežít počáteční léčbu lépe než jiné buňky v nádoru a způsobit recidivu po měsících i po létech (Klener, ;Willyard, 2011).

Rozsah jakéhokoliv nádorového onemocnění a tudíž i nemalobuněčného karcinomu plic lze rozdělit do čtyř fází:

Fáze I                    Zahrnuje pouze periferně ohraničený nádor bez zjištěných metastáz, který nepřekračuje hranici primární lokalizace.

Fáze II                    V této fázi dochází k šíření nádoru do blízkých mízních uzlin, ale stále nedochází k překročení hranice primární lokalizace.

Fáze III                    Do této fáze spadají dvě tzv. podstádia:

A) Nádor se šíří do okolních tkání (hrudní stěna, bránice, prsní tkáň, cévy, páteř)

B) Nádorové buňky metastazují do mízních uzlin.

Fáze IV

Jsou přítomny i vzdálené metastázy.

#### 4. Nemalobuněčný karcinom plic

Karcinom plic je nádorovým onemocněním s celosvětovou nejvyšší mortalitou (**Horn et al., 2009**). V roce 2010 bylo ve Spojených státech diagnostikováno 222 000 nových případů karcinomu plic, umrtí následkem plicního karcinomu bylo pozorováno u 157 000 případů (**Crystal et al., 2011**). Dva hlavní typy karcinomu plic jsou nemalobuněčný karcinom (85 %) a malobuněčný karcinom (15 %) (**Herbst et al., 2008**). V porovnání s malobuněčným karcinomem zakládá NSCLC metastázy až mnohem později a má menší radio i chemosenzitivitu (**Aschermanová et al., 2002**). Nemalobuněčný karcinom lze rozdělit do tří základních podtypů: adenokarcinom, spinocelulární karcinom a velkobuněčný karcinom. Adenokarcinom je nejčastějším podtypem NSCLC, který se vyskytuje u 40 %. Nejčastějším podtypem adenokarcinomu je bronchoalveolární karcinom, který se dělí na:

1. Mucinózní

Mucinózní druh karcinomu tvoří 30 – 40 % všech případů bronchoalveolárního karcinomu. Vychází z pohárkových buněk obsažených v epitelu hlavních cest dýchacích a zasahují až do úrovně bronchiolů

2. Nemucinózní

Zbylá část případů (60 – 70 %) je postižena nemucinózním typem karcinomu. Tento typ vzniká z Clarových buněk nebo pneumocytů II. typu.

3. Smíšený

Smíšená forma nemucinózních a mucinózních typů je velmi vzácná.

Přesné rozdělení ukazuje a popisuje nejen rozdíly na molekulární a buněčné úrovni, ale má i významný dopad na diagnostiku a na následnou léčbu pacienta (**Miller et al., 2008**).

Díky intenzivnímu výzkumu bylo nalezeno mnoho markerů, souvisejících s karcinogenezi NSCLC. K nejdůležitějším z nich patří EGFR, KRAS, C-MET, KIFB5-ALK, TFG-ALK, EML4-ALK, p53, BRAF, RB1, PI3CA, HER2, AKT. Velká většina markerů vedoucích ke karcinogenezi NSCLC však zůstává neobjasněna (**Crystal et al., 2011**). Vzhledem k velké incidenci a mortalitě

v důsledku NSCLC a poměrně špatné odpovědi na chemoterapii a radioterapii je nezbytné hledat další nádorové markery, které pomohou zkvalitnit léčbu nemocných s NSCLC.

V léčbě NSCLC se uplatňuje široká škála léčebných postupů. Nejčastěji se jedná o léčbu chirurgickou, protinádorovou chemoterapii, léčbu ozařováním a cílenou biologickou léčbu pomocí monoklonálních protilátek, či nízkomolekulárních inhibitorů tyrozinkinázových receptorů. Často je ovšem nutná i kombinace více těchto léčebných metod

## 4.1 Gen ALK

Gen ALK (anaplastic lymphoma kinase) je u člověka lokalizován na chromozomálním úseku 2p23. Tento gen kóduje tyrosin kinázový receptor, který patří do rodiny inzulinových receptorů a skládá se z 1620 aminokyselin. ALK protein obsahuje extracelulární oblast, tvořenou dvěma MAM doménami (MAM doména 1 a 2), transmembránovou a intracelulární oblast.

Gen ALK je tkáňově specifický, v průběhu vývoje je exprimován v centrální a periferní nervové soustavě, kde reguluje správný růst a vývoj, v dospělosti je exprimován ve varlatech a v mozku (**Mourali et al., 2006**).

### 4.1.1 Přestavba genu ALK

Poprvé byla přestavba genu ALK detekována v roce 1994 jako součást translokace t(2;5)(p23;q35), vedoucí k expresi fúzního proteinu NPM1-ALK, způsobující anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) (**Morris et al., 1994**).

V roce 2004 byla objevena přestavba genu ALK u NSCLC. Jedná se o paracentrickou inverzi mezi regiony 2p21 a 2p23, kterou se kinázová doména genu ALK dostane za počátek genu EML4. U případů s inverzí je exprimován fúzní protein EML4-ALK, který je pod kontrolou promotoru pro EML4 (**Soda et al., 2007**). Gen ALK se štípe v místě exonu 20 a gen EML4 nejčastěji v exonech 6 a 13. Podle typu štěpení jsou nalézány různé varianty EML4-ALK fúzního proteinu.

EML4 byl prvním fúzním partnerem ALK detekovaným u NSCLC. Tato translokace zaujímá až 99 % ALK pozitivních NSCLC, méně častými fúzními

partnery jsou KIF5B-ALK, TTF-ALK (**Shimura et al, 2008**). Přestavby genu ALK jsou nalézány u 2 - 7 % všech pacientů s diagnostikovaným nemalobuněčným karcinomem plic (**Garber, 2010**).

Bylo zjištěno, že se ALK přestavby vyskytují u pacientů, kteří nikdy nekouřili nebo jsou bývalými, či lehkými kuřáky. U silných kuřáků se tato alterace vyskytuje méně často (**Crystal et al., 2011**). Mutace EGFR a ALK jsou u NSCLC vzájemně exkluzivní. Bylo prokázáno, že NSCLC pacienti s ALK přestavbou jsou mladšího věku a to i ve srovnání s pacienty s EGFR mutací (**Crystal et al, 2011**).

ALK přestavby se vyjma ALCL a NSCLC vyskytují u neuroblastomů a inflamatorních myofibroblastických nádorů (IMT). U jiných nádorových onemocnění nebyly změny ALK nalezeny. Studie, které se tímto zabývaly a zkoumaly i jiná nádorová onemocnění nenalezly přestavbu genu ALK u SCLC, karcinomu prsu, karcinomu ledvin, tlustého střeva, prostaty, uroteliálních karcinomů, žaludku, dělohy, hepatocelulárního karcinomu, maligního fibrózního histiocytomu, akutní myeloidní leukémie ani non-Hodgkinova lymfomu (**Crystal et al., 2011; Fukuyoshi et al, 2008; Soda et al, 2007**).

#### **4.1.2 Možnosti detekce změn ALK**

Na detekci genových fúzí ALK v plicních nádorech se používají metody imunohistochemické (IHC), metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a real-time polymerázová řetězová reakce (RT-PCR).

IHC je nejjednodušší a nejlevnější metodou pro detekci ALK přestaveb. Exprese ALK je ovšem velmi nízká a klasicky používaná protilátka není schopna zachytit pozitivitu ve všech FISH ALK pozitivních případech. K hlavním pozitivům IHC lze řadit časovou i finanční dostupnost a možnost vizuální kontroly preparátu. IHC by byla ideální pro detekci přestaveb ALK u NSCLC, avšak pouze za předpokladu, že bude nalezena dostatečně citlivá protilátka (**Horn et al., 2009**).

RT-PCR je metoda velice náročná na materiál. Nádorová tkáň je uchovávána především ve formě parafinových bloků, často se navíc jedná pouze o biopsii tenkou jehlou a v těchto případech je izolace RNA ze vzorku velmi náročná a často neúspěšná. Pomocí RT-PCR lze navíc detekovat pouze známé fúzní

partnery ALK. Metody mají však své výhody a jsou velmi často využívány v probíhajících výzkumech (**Crystal et al, 2011**).

Díky nízké sensitivitě IHC a materiálové náročnosti RT-PCR byla zvolena metoda FISH jako „zlatý standard“ pro ALK diagnostiku. ALK lze vyšetřit pomocí FISH break-apart sondy a translokační sondy EML4-ALK. Pomocí break-apart FISH lze detekovat všechny varianty ALK přestaveb, z 99% se však jedná o fúzi EML4-ALK. Při použití translokační sondy, lze fyziologický gen ALK pod fluorescenčním mikroskopem pozorovat jako jasně oranžový signál. Pokud však dojde k přeskupení tohoto genu, vidíme dva oddělené signály, oranžový a zelený. Touto metodou lze detekovat pouze translokaci EML4-ALK (**Horn et al, 2009**). Cut-off pro FISH ALK pozitivitu je 15 % buněk, ve kterých byla nalezena přestavba genu ALK.

#### **4.1.3 ALK a jeho inhibitor**

Crizotinib, duální inhibitor ALK a C-MET kinázy, byl testován v klinických studiích fáze I a II u NSCLC. V těchto studiích, se léčba crizotinibem ukázala jako velice účinná. Do klinické studie fáze I/II bylo zařazeno 82 ALK pozitivních pacientů, kterým byl podáván crizotinib. U těchto pacientů byl medián celkového přežití (OS) od zahájení léčby crizotinibem po 1 roce 74% a dvouletý OS byl 54 %. Tyto údaje nezávisely na věku, pohlaví, historii kouření nebo etnickém původu léčených pacientů. Téměř u všech pacientů, léčených crizotinibem došlo ke zlepšení, či ke stagnaci nemoci. ALK pozitivní pacienti, léčení crizotinibem měli signifikantně lepší léčebnou odpověď než ALK pozitivní i wt-EGFR/wt-ALK léčení konvenční chemoterapií (**Kwak et al., 2010; Shaw et al., 2011**).

Na základě výjimečně přesvědčivých klinických studií, byl crizotinib dne 26. srpna 2011 schválen komisí US Food and Drug Administration (FDA) pro léčbu pokročilého či metastatického plicního karcinomu s ALK pozitivitou. Trvalo pouze čtyři roky od objevení onkogenu ALK u NSCLC a schválení účinného cíleného inhibitoru ALK (**Ou Sh, 2011**).

## 4.2 Gen EGFR

Gen EGFR je lokalizován na chromozomu 7 (7p13-q22) (**Kondo et al, 1983**). Tento gen je složen z 28 exonů a obsahuje několik opakujících se prvků (**Reiter et al, 2001**). Kóduje tyrosin kinázový receptor z rodiny HER, který se podílí na vzniku a progresi nádorů, jejich metastazování a angiogenezi. Po aktivaci receptoru ligandem, receptor dimenzuje a spouští MAPK a PI3K signální kaskádu (**Wang et al, 2004**).

### 4.2.1 Mutace genu EGFR

Více než 90 % aktivačních mutací v genu EGFR nastává v exonu 19 a 21. Jedná se o delece v 19. exonu a substituce argininu za leucin (L858R) v 21. exonu (**Hirsch et al, 2008**). Substituce glycinu za serin, alanin, či cystein v exonu 18 se vyskytuje u dalších 4 % aktivačních mutací. V důsledku těchto mutací dochází k permanentní aktivaci tyrosin kinázové domény *EGFR*, bez závislosti na ligandu, což vede k fosforylaci dalších proteinů, které patří do *EGFR* signální dráhy. Aktivační EGFR mutace jsou nejčastěji nalézány u nekuřáků, žen, v asijské populaci a u pacientů s adenokarcinomem (**Gazdar, 2009**).

### 4.2.2 Cílená terapie pomocí inhibitorů

Gefitinib (Iressa, AstraZeneca) a erlotinib (Tarceva, Genentech) jsou reversibilní ATP kompetitivní inhibitory tyrosin kinázové domény EGFR (EGFR TKI), které se váží na jeho ATP vazebné místo. Inhibitory mají mnohem vyšší afinitu k mutované tyrosin kinázové doméně než ATP, proto blokují kinázovou doménu u EGFR mutovaných případů (**Gazdar, 2009**).

EGFR pozitivní pacienti reagují na léčbu EGFR TKI výrazným zlepšením jejich zdravotního stavu (**Garber, 2010**). Léčebná odpověď na první linii léčby pomocí gefitinibu nebo erlotinibu u pacientů s mutací EGFR je větší než 50 % (**Crystal et al, 2011**). Velká metaanalýza, zahrnující 3101 pacientů jednoznačně potvrdila prediktivní význam EGFR mutací pro účinnost léčby pomocí TKI (**Dehabreh et al., 2010**).

### **4.2.3 Resistence na inhibitory EGFR kinázy (EGFR TKI)**

Většina pacientů, kteří jsou léčeni EGFR TKI získá do jednoho roku rezistenci (Nguyen et al, 2009). Je popsáno několik mechanismů resistance, z nichž k nejvýznamnějším patří sekundární bodová mutace genu EGFR T790M a amplifikace genu C-MET (Kobayashi et al, 2005, Pao et al, 2005). Při mutaci T790M dochází v ATP vazebné doméně k záměně tyrozinu za metionin a tím k deaktivaci vazebného místa pro EGFR TKI. Druhým mechanismem získané resistance je amplifikace genu C-MET (Balak et al, 2006).

Nejčastějším mechanismem *de novo* resistance je mutace genu KRAS, který je v signální kaskádě pod EGFR (viz kap. 4.3.2.).

## **4.3 Gen KRAS**

KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) onkogen je lokalizován na chromozomu 12p12. Patří do skupiny RAS onkogenů společně s NRAS a HRAS. RAS proteiny mají GTP-asovou aktivitu a účastní se MAPK a PI3K signální dráhy (Skácel et al, 2002).

EGFR aktivuje KRAS pomocí adaptérového proteinu GRB-2 (growth factor receptor-bound protein 2) a GEF (guanin nucleotide-exchange factor) molekul. Komplex GTP-KRAS váže cílové proteiny (např. BRAF) a aktivuje je. K deaktivaci GTP-KRAS dochází pomocí GTPasových aktivačních proteinů, které stimulují hydrolýzu GTP. Signalizace zprostředkovaná pomocí genu K-RAS reguluje buněčnou proliferaci, diferenciaci a přežití.

### **4.3.1 KRAS mutace**

Patologické aktivace KRAS genu byly nalezeny u mnoha typů rakoviny, včetně nádorů pankreatu, tlustého střeva a NSCLC.

#### **4.3.1.1 KRAS mutace u nádorů pankreatu a tlustého střeva**

DNA z lidských pankreatických adenokarcinomů byla analyzována na přítomnost mutací v kodonech 12, 13 a 61 exonu 2 v genech KRAS a HRAS. Tyto mutace byly detekovány pomocí selektivní hybridizace. V 28 ze 30 pacientů byla zjištěna mutace v kodonu 12 genu KRAS. Tento výsledek potvrzuje zjištění, že mutace



genu KRAS se často objevuje u adenokarcinomů slinivky břišní. V dnešní době je známo, že se KRAS mutace vyskytuje až u 90 % pacientů s karcinomem pankreatu. Mutace jsou převážně GT transverze, na rozdíl od mutací genu KRAS v nádorech tlustého střeva, které jsou hlavně GA tranzice (**Smit et al, 1988**).

Pozice bodové mutace v KRAS genu je ukazatelem spojeným s různým stupněm agresivity v lidských nádorech tlustého střeva. U karcinomů tlustého střeva způsobených KRAS mutací v kodonu 12 exonu 2, je mnohem nižší úroveň apoptózy než u karcinomů, které nemají tuto mutaci. KRAS je tedy negativním prognostickým faktorem. To, že mutace KRAS genu v kodonu 12 zvyšuje agresivitu onemocnění je způsobeno změnou antiproliferační cesty, diferenciální regulací KRAS signalizace, které vedou k inhibici apoptózy a vyšší ztrátě kontaktní inhibice. Tyto výsledky poskytují molekulární vysvětlení pro zvýšení agresivity nádorů s KRAS mutace kodonu 12 pozorovaných v klinickém prostředí (**Guerrero et al, 2000**).

#### **4.3.1.2 KRAS mutace u NSCLC**

KRAS mutace se vyskytují u 20 % případů karcinomů plic (**Vakiani, Solit, 2011**) a z 90 % se jedná o bodovou mutaci v kodonu 12 exonu 2. Nedávná analýza ukázala, že KRAS mutace se vyskytují u 26 % případů onemocnění bývalých nebo současných kuřáků oproti 6 % případů u nekuřáků (**Mao et al, 2010**). Většina studií dokázala, že KRAS mutace a mutace genu EGFR se vzájemně vylučují, mají tzv. mutační exkluzivitu.

Několik studií hodnotilo významnost mutací genu KRAS pro přežití, recidivu či šíření metastáz. V roce 2005 byly zveřejněny výsledky meta analýzy porovnávající prognostický význam KRAS ve 28 nezávislých studiích s 3620 zařazenými pacienty (**Mascaux et al, 2005**). Tato analýza prokázala horší přežití pacientů s KRAS mutacemi. V další analýze byl KRAS statisticky velmi významným prognostickým faktorem u adenokarcinomů, ale už nikoliv u spinocelulárních karcinomů. Navazující studie nepotvrdily mutaci genu KRAS jako nezávislý prognostický faktor (**Marks et al, 2008**). Prognostický význam mutací genu KRAS u NSCLC zůstává doposud neobjasněn, hypotézy musí být

potvrzeny přesně definovanými analýzami u pacientů s NSCLC (**Mascaux et al, 2005**).

#### **4.3.2 Rezistence na inhibitory tyrozinkináz**

Ačkoliv prognostická role mutací genu KRAS není zatím jasně popsána, byl potvrzen prediktivní význam pro léčbu inhibitory tyrozinkináz u NSCLC (**Han et al, 2006**).

V poslední době byla publikována metaanalýza shrnující výsledky 22 studií. Bylo analyzováno 1470 pacientů s NSCLC. KRAS mutace byly detekovány u 16 % případů, tedy u 231 pacientů. Bylo potvrzeno, že přítomnost KRAS mutací je negativním prediktivním faktorem pro léčbu NSCLC pomocí inhibitorů tyrozinkináz (**Mao et al, 2010**). Nicméně, vzhledem k mutační exkluzivitě EGFR a K-RAS mutací, je klinický význam KRAS vyšetření u NSCLC velmi nízký. (**Tsao et al, 2007**).

## V. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části této práce jsem se zabývala přípravou fluorescenčně značených sond pro detekci EML4-ALK přestavby u nemalobuněčného karcinomu plic. Cílem práce bylo připravit sondu, která bude dostatečně senzitivní a specifická na to, aby danou aberaci prokázala a byla použitelná pro diagnostiku pacientů s NSCLC.

### 1. Příprava sondy

Příprava sondy je nedílnou součástí detekce chromozomálních aberací. Pro přípravu EML4-ALK translokační sondy jsem izolovala plazmidy ze dvou kmenů bakterií. A to z bakteriálního klonu RP11-299C5 (EML4) a RP11-328L16 (ALK). Tyto klony jsem si vybrala, protože do jejich plazmidů je vložena DNA sekvence genu ALK a do druhého klonu je vložena sekvence genu EML4. Proto jsou nejvhodnějšími druhy pro přípravu takto specifické sondy.

#### Přístroje a zařízení

temperovaná třepačka (New Brunswick Scientific), pipety (Eppendorf), centrifuga (Eppendorf), vortex, termostat, vodní lázeň (Julabo), spektrofotometr Nanodrop, lednice s mrazákem

#### Materiál a reagenty

bakteriální klon EML4 RP 11-299C5 a bakteriální klon ALK RP 11-328L16 (BACPAC resources center), LB médium (Sigma), ampicilin (Sigma), chloramfenikol (Sigma), roztok P1, P2, P3 (připraveny z chemikálií od Sigma), izopropanol (Serva), 96 % ethanol (Serva), TE pufr (Sigma), voda pro PCR (Ambion), destilovaná voda, led, SpectrumGreen dUTP (Vysis), SpectrumOrange dUTP (Vysis), dUTP mix (Invitrogen), 2,5x random primers roztok (750 µg/ml; Invitrogen), Exo-Klenowův fragment (40 U/µl; Invitrogen), Cot-1 DNA (Invitrogen; fragmenty DNA o délce 50 - 300 bp, obohacené o repetice, octan sodný (Serva), 99,5 % ethanol, B2 pufr, W1 promývací pufr, E1 pufr, hybridizační pufr, zkumavky.

## Složení roztoků

P1 roztok	50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNáza
P2 roztok	200 mM NaOH; 1 % SDS (w/v)
P3 roztok	3,0 M octan draselný, pH 5,5
LB médium	1 % proteázový pepton, 0,5 % kvasnicový extrakt, 1 % NaCl, ampicilin 20 µg/ml
dUTP mix	1,2 mM dATP, dGTP, dCTP; 0,6 mM dTTP v 10 mM Tris (pH 8,0); 1mM EDTA
Hybridizační pufr	50 % formamid, 2x SSC, 10 % dextran sulfát, 0,1 % Tween20, 10 mM Tris-Cl; pH 7,5

### 1.1 Kultivace bakteriální kultury

Do sterilní erlenmayerovy baňky jsem odměřila 1 l sterilního LB média obsahujícího chloramfenikol. Do připraveného LB média s chlaramfenikolem jsem přenesla jeden bakteriální klon kmene RP11-299C5 a do druhé bakteriální klon RP11-328L16. Bakteriální kultury jsem nechala inkubovat v temperované třepačce při 37 °C přes noc při 225 - 300 rpm.

### 1.2 Izolace plazmidu

Bakteriální kultury jsem centrifugovala 1 min při 5 000 g, supernatant jsem odlila. Pelety jsem nesuspendovala přidáním 50 ml roztoku P1 a důkladným promícháním na vortexu. Lýzu jsem zahájila přidáním 50 ml roztoku P2. Po přidání pufrů do zkumavky jsem vše promíchala opatrným převrácením (5 - 10x), poté jsem je nechala stát 10 min při laboratorní teplotě. Lýza byla ukončena přidáním 50 ml roztoku P3, opět jsem vše promíchala opatrným převrácením (5 - 10x). Nechala jsem vše stát 5 min na ledu. Centrifugovala jsem 10 min při 14 500 g, zkumavky jsem ihned umístila na led a supernatant jsem opatrně přenesla do nových sterilních mikrozkuvek. Přidala jsem 24,5 ml izopropanolu, centrifugovala jsem 20 min při 14 500 g. Vzniklý supernatant jsem opatrně odlila. Sraženiny jsem promyla 10 ml 70 % vychlazeného ethanolu (-20°C), centrifugovala jsem 5 min při 14 500 g. Supernatant jsem odlila, zbylý supernatant jsem znovu nechala odstředit na dno zkumavek a odpipetovala. Otevřené mikrozkuvky jsem ponechala při laboratorní teplotě přibližně 10 min,

aby se peleta vysušila. Plazmidovou DNA jsem resuspendovala ve 100  $\mu$ l TE pufru. Koncentraci a čistotu DNA jsme změřila na spektrofotometru Nanodrop.

### **1.2.2 Fluorescenční značení izolovaného plazmidu**

500 ng každé plazmidové DNA jsem doplnila v 1,5 ml zkumavce sterilní vodou pro PCR do objemu 21  $\mu$ l. K DNA jsem přidala 20  $\mu$ l 2,5x random primers roztoku. Směsi jsem důkladně promíchala (vortex), stočila a denaturovala na vodní lázni 5 min při 96 °C. Směsi jsem okamžitě umístila na 5 min na led. Na ledu jsem do mikrozkuvek přidala 5  $\mu$ l 10x dUTP nukleotidového mixu, 1,5  $\mu$ l SpectrumGreen dUTP(pZ17-14) respektive SpectrumOrange (bA62N23) a 1  $\mu$ l pufovaného Exo-Klenowova fragmentu. Směsi jsem opatrně promíchala poklepáním, stočila na dno mikrozkuvek a nechala inkubovat v termobloku při 37 °C 2 hodiny. Ke směsím jsem přidala 200  $\mu$ l B2 pufru. Vše jsem zcentrifugovala. Přebytečnou kapalinu jsem odstranila. Vše jsem nechala centrifugovat při 10 000 g na 1 minutu. Přidala jsem 650  $\mu$ l promývacího pufru W1, opět jsem centrifugovala na 1 minutu při 10 000 g. Kolonku jsem předělala do sterilní eppendorfky. Přidala jsem 55  $\mu$ l pufru E1 a ponechala při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Zcentrifugovala jsem na 14 500 g po dobu 2 minut. Ke směsím jsem dodala 25  $\mu$ l Cot-1 DNA pro zablokování repetitivních sekvencí. Značené plazmidy jsem poté nechala vysrážet 7,5  $\mu$ l 3 M octanu sodného a 206  $\mu$ l vychlazeného 96 % ethanolu. Obsah mikrozkuvek jsem opatrně promíchala obrácením a vložila na 20 min do mrazicího boxu (-20 °C). Poté jsem směsi centrifugovala 15 min při 14 500 g. Supernatant jsem odlila a vzniklé pelety sušila při laboratorní teplotě po dobu 3 - 5 min (bez přístupu světla). Vysušenou DNA s inzertem jsem nechala rozpustit v 50  $\mu$ l hybridizačního pufru, obsah jsem přenesla do mikrozkuvek s vysušenou DNA s inzertem a vše rozpustila, inkubovala 10 min v termostatu (37 °C), poté zcentrifugovala. Takto značená DNA byla použita jako fluorescenčně značená sonda, specifická pro centromerickou oblast chromozomu.

## 2. FISH

Principem metody FISH je hybridizace fluorescenčně značených sond na základě pravidla komplementarity přímo na vyšetřovanou DNA a tím vizualizace cílových úseků vyšetřované DNA.

### **Přístroje a zařízení**

vodní lázeň (Julabo), pH metr (Hanna), termostat (Memmert), mikrocentrifuga (Eppendorf), výhřevná plotýnka (termoblok; Techne), hybridizér (Kreatech), fluorescenční mikroskop s příslušnými filtry a imerzním objektivem (Olympus)

### **Materiál a reagensie**

Pepsin (Sigma Aldrich), thiokyanát sodný ( $\text{NaSCN}$ ; Sigma Aldrich), dihydrát citrátu sodného ( $\text{HOOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma Aldrich), chlorid sodný ( $\text{NaCl}$ ; Lach-Ner, s.r.o.), chlorid draselný ( $\text{KCl}$ ; Sigma Aldrich), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma Aldrich), dihydrogenfosforečnan sodný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; Sigma Aldrich), formaldehyd (Tamda a.s.), fyziologický roztok (0,9 %  $\text{NaCl}$ ; lékárna FN Olomouc), xylen, 96 % (Mach, s.r.o.), ethanol (Tamda), DNA sondy nebo jejich směs (IntellMed, s.r.o.), hybridizační pufr (IntellMed, s.r.o), neiontový detergent NP 40 (Sigma Aldrich), fluorescenční barvivo DAPI (Intellmed, s.r.o), imerzní olej (Olympus), formamid (Sigma Aldrich), deionizovaná voda, vlhká komůrka,  $\text{HCl}$  a  $\text{NaOH}$  na úpravu pH roztoků, podložní a krycí skla, lepidlo, pipety a špičky, mikrocentrifugační zkumavky, barvicí nádobky, teploměr, buničina nebo filtrační papír

### **Příprava roztoků**

#### Zásobní 20x koncentrovaný SSC

175 g  $\text{NaCl}$

88 g dihydrátu citrátu sodného

Vše jsem rozpustila v 900 ml deionizované vody, upravila pH na 5,3 a doplnila do 1 l.

#### Zásobní 10x koncentrovaný PBS

80 g  $\text{NaCl}$

2 g  $\text{KCl}$

32,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Doplnila jsem do 1 l destilovanou vodou.

#### Oplachovací pufr (2x SSC, pH 7,0)

Oplacovací pufr jsem připravila zředěním a upravením pH ze zásobního 20x koncentrovaného SSC.

#### Pufr pro proteázu

fyziologický roztok, pomocí HCl upravený na pH 2,0

#### Proteáza

25 mg pepsinu (katalytická aktivita 2 500 - 3 000 U/mg) jsem bezprostředně před použitím rozpustila v 50 ml pufru pro proteázu zahřátém na  $37 \pm 1$  °C, mírně jsem vše promíchala. Toto množství postačilo na deparafinizaci 6 preparátů v 1 kyvetě.

10 % formalín (4 % pufrovaný formaldehyd)

4 ml formaldehydu doplníme do 100 ml 1x PBS.

#### Promývací roztok I (0,4x SSC / 0,3% NP-40)

Roztok jsem připravila smícháním 20 ml 20x SSC a 3 ml NP-40. Doplnila jsem do cca 900 ml purifikovanou vodou, upravíme pH na 7,0 -7,5 a doplnila do 1 l.

#### Promývací roztok II (2x SSC / 0,1% NP-40)

Jsem připravila smícháním 100 ml 20x SSC, 1 ml NP40. Doplnila jsem do cca 900 ml purifikovanou vodou, upravila jsem pH na  $7,0 \pm 0,2$  °C.

## **2.1 Příprava parafinového řezu pro FISH**

Parafinové řezy, připravené na pozitivně nabitém skle, jsem inkubovala při teplotě 56 °C přes noc (např. na vyhřívané plotýnce). Cílem tohoto vyhřívání bylo dosáhnout pevné a rovnoměrné adheze tkáně na podložku. Inkubovala jsem skla v xylenu při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Opakovala jsem 2x. Po vyjmutí z xylenu jsem lehce osušila přitisknutím hrany skla na savou podložku. Inkubovala jsem preparáty v 96 % ethanolu při laboratorní teplotě po dobu 5 min. Opakovala jsem 2x. Sušila jsem preparáty na vyhřívané plotýnce při 45 - 50°C, po dobu 2 - 5 min. Inkubovala jsem preparáty v následujících roztocích: 0,2 M HCl, 20 min, deionizovaná voda 3 min, oplachovací pufr 3 min, roztok NaSCN při 80°C, 30 min, deionizovaná voda 1 min, oplachovací pufr 5 min. Po vyjmutí skel z 2. kyvety s oplachovacím pufrem jsem preparáty osušila přitisknutím hrany skel

na savou podložku. Inkubovala jsem v roztoku pepsinu v proteázovém pufru při 37 °C po dobu 40 - 45 min (dle typu tkáně). Preparáty jsem promyla v oplachovacích pufrech po dobu 2x 5 min. Vysušila jsem na vyhřívané plotně při 45 - 50°C po dobu 2 - 5 min. Preparáty jsem vysušila na termobloku při 45 - 50°C po dobu 2 až 5 min. Následně jsem preparáty fixovala v roztoku formalínu. Po usušení byly preparáty připravené pro následné provedení FISH. Nanesla jsem roztok sondy na sklo se vzorkem a překryla jsem ho vyčištěným krycím sklíčkem. Takto překrytý preparát jsem zalepila lepidlem fixogum. Preparáty jsem denaturovala 2 minuty při 83°C a poté inkubovala přes noc při 37 °C za nepřístupu světla.

### 2.1.1 FISH na mitotických sklech

Mitotická skla z depozitáře laboratoře jsem před navázání sondy nechala projít alkoholovou řadou (viz. tab. č. 3)

Tabulka č. 3 Alkoholová řada a doba působení na mitotická skla

Koncentrace etanolu	Doba působení na mitotická skla
75%	1 minuta
80%	1 minuta
96%	1 minuta

Preparáty jsem denaturovala 2 minuty při 73°C a poté inkubovala přes noc při 37 °C za nepřístupu světla.

### 2.3 Odmytí nenavázané sondy

Odstranila jsem krycí sklíčko a preparát jsem ponořila do promývacího roztoku I (0,4x SSC / 0,3 % NP-40), vyhřátého na 73 ± 1 °C. Sklíčko v roztoku jsem lehce protřepala 3 - 5 s a poté inkubovala 1 min 45 s. Přenesla jsem do promývacího roztoku II (2x SSC / 0,1 % NP-40), opět asi 3 - 5 s protřepala a inkubovala jsem 30 s. Lehce jsem osušila přitisknutím hrany skla na savou podložku a nechala



volně zaschnout bez přístupu světla. Dle velikosti krycího skla jsem nanesla 3 - 10  $\mu$ l DAPI. Překryla jsem krycím sklíčkem.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

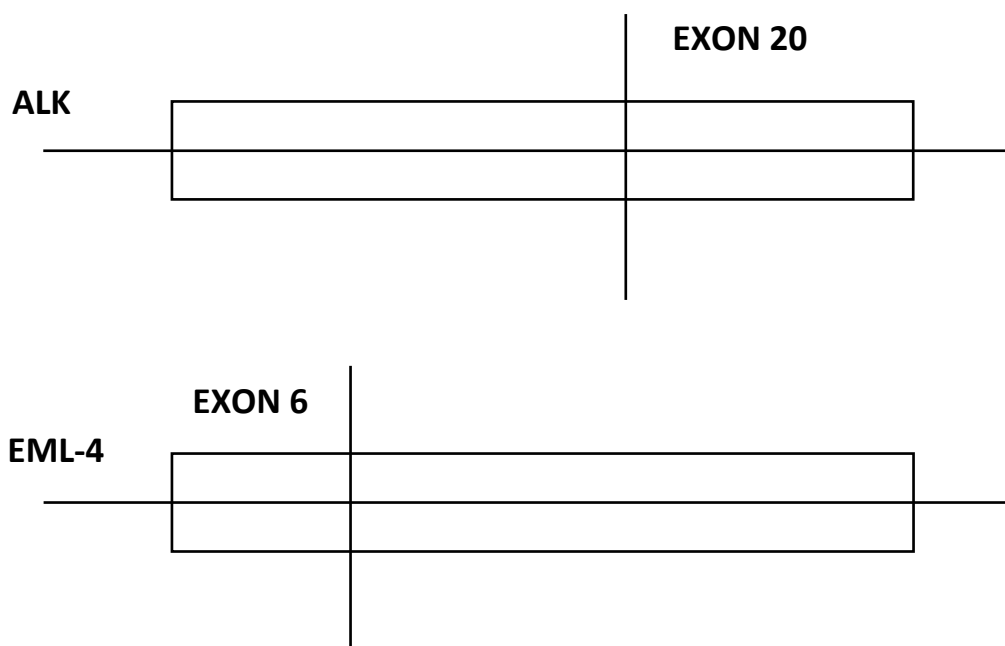
U NSCLC je známo několik aberací, jejichž poznání významně přispělo k stanovení prognózy či určení nejvhodnějšího léčebného režimu pacientů. Nejvýznamnější a klinicky nejpoužívanějším z nich patří mutace genu EGFR a KRAS a přestavby genu ALK (**Crystal et al., 2011**). V oblasti onkologie je za největší úspěch poslední doby považováno objevení fúzního proteinu EML4-ALK, jehož inhibitor crizotinib byl nečekaně rychle uveden na farmaceutický trh (**Ou Sh, 2011**). Klinické studie u ALK pozitivních pacientů s NSCLC prokázaly velmi vysokou léčebnou odezvu. U pacientů léčených crizotinibem byl medián celkového přežití (OS) po 1 roce 74 % a dvouletý OS byl 54 % (**Kwak et al., 2010; Shaw et al., 2011**).

Metoda FISH je jednou z nejpoužívanějších metod pro detekci chromozomálních aberací (a to nejen u genu ALK, ale i genů HER-2, EGFR apod.). Pro detekci ALK přestaveb byla zvolena právě pro vysokou citlivost (oproti IHC metodě) a pro možnost vyšetření vyšetřovaného materiálu, který je dostupný pouze ve formě parafinových řezů (oproti RT-PCR metodě). ALK přestavby lze pomocí FISH detekovat break-apart sondou ALK a translokační sondou EML4-ALK (**Horn et al, 2009**).

Pro přípravu byla zvolena translokační sonda EML4-ALK. Jako nejvýhodnější metodu pro přípravu sondy jsem si zvolila „Random primer labeling“- značení pomocí náhodných primerů, kterou popsal **Feinberg a Vogelstein, 1983**. Pro detekci přestavby EML4-ALK byly vybrány bakteriální kmeny RP11-299C5, RP11-328L16. Bakteriální kmen RP11-299C5 obsahuje plazmid, do kterého je vložena DNA sekvence genu ALK za exonem 20, bakteriální kmen RP11-328L16 obsahuje plazmid, do kterého je vložena DNA sekvence genu EML4 před exonem 6 (viz. obr. 1).

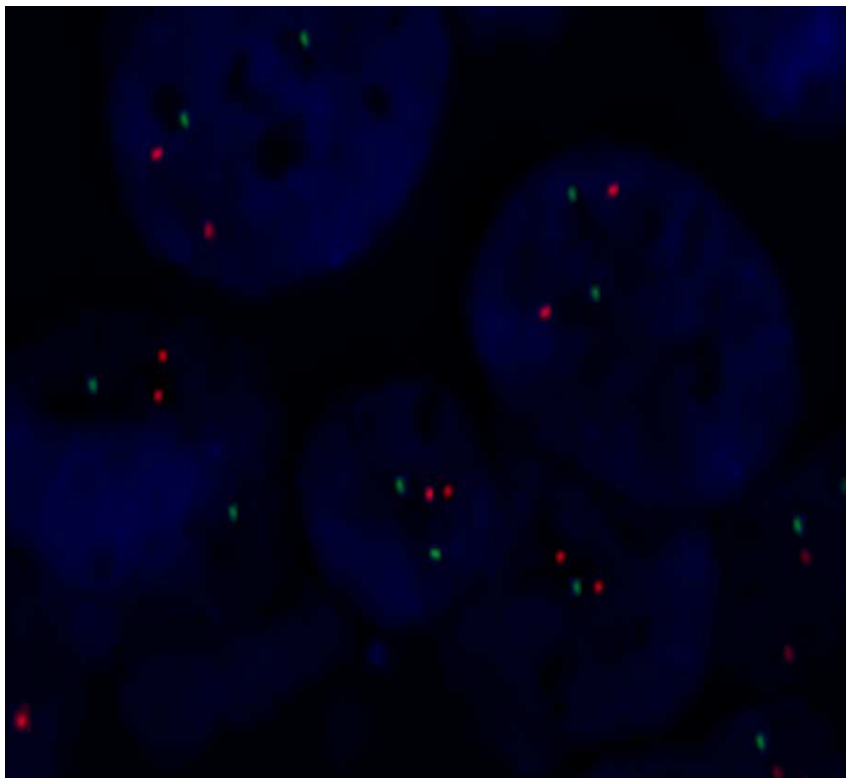
Běžně se pro detekci ALK přestaveb používá break-apart sonda, která detekuje začátek a konec genu ALK a přestavba je detekována v případě oddělení signálů. Nicméně u více než 99 % přestaveb genu ALK se vyskytuje spojení ALK s fúzním partnerem EML4. Použití translokační sondy EML4-ALK dokáže se srovnatelnou efektivností detekovat přestavbu genu ALK.

Obrázek č. 1.: Umístění exonů u fúzních partnerů EML4-ALK



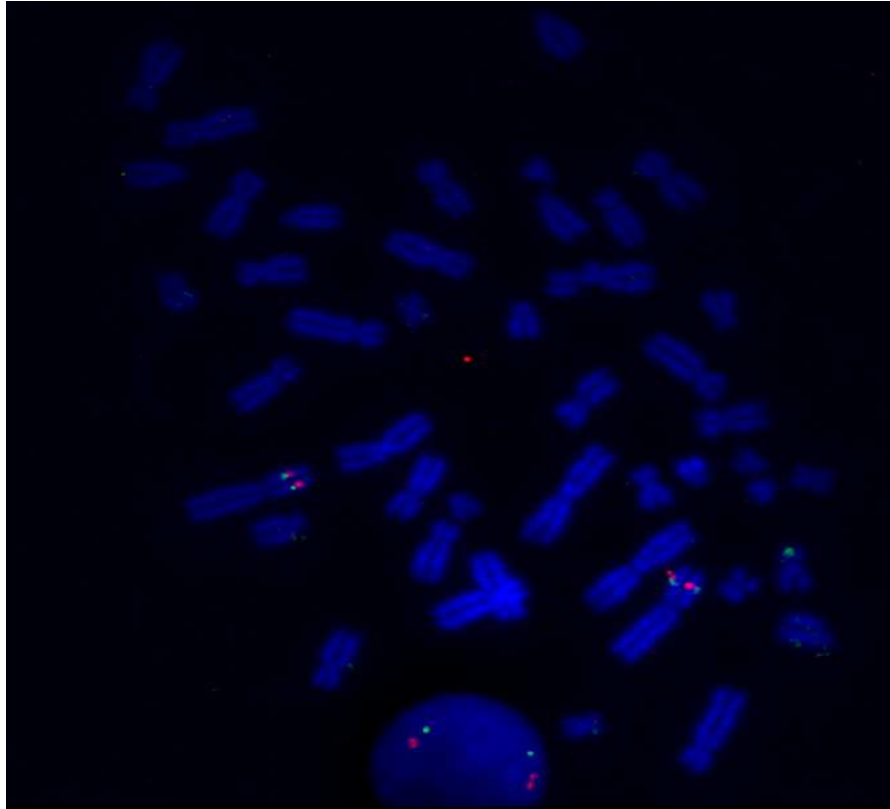
Připravila jsem sondu EML4-ALK pro detekci translokací u NSCLC. O detekci translokace hovoříme tehdy, pokud signály pro EML4 a ALK svítí velmi blízko sebe, tvoří se žlutý signál (spojením zelené a oranžové) či dvojsignál. Ověřila jsem dostatečnou hybridizaci a intenzitu fluorescenčního signálu v porovnání s komerčně dostupnou break-apart ALK sondou (obr. 2). Ověřila jsem i specifitu vazebnosti na mitotických preparátech. Byla ověřena specifita vazby oranžově značené sondy pro ALK na chromozomální oblast 2p23 a zeleně značené sondy EML4 na chromozomální oblast 2p21 (obr. 3A, B). Gen ALK i gen EML4 se i v mutačně nepozměněné tkáni nachází velmi blízko sebe (2p21 vs. 2p23), v mitotických chromozomech není prakticky rozdíl oproti změněnému stavu patrný. Avšak v interfázních jádrech je velmi dobře vidět, že v tkáni došlo k aberaci-translokaci.

Obrázek č. 2.: Ověření účinnosti hybridizace translokační sondy EML4-ALK na tkáni karcinomu plic.

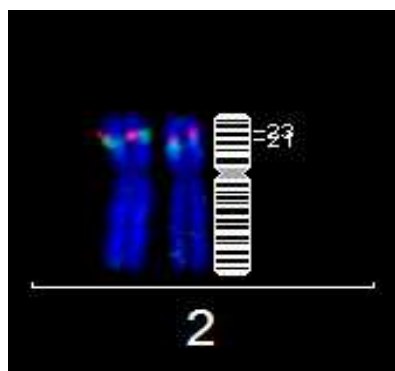


Obrázek č. 3.: Ověření specifity vazby na mitotických preparátech (A), detail chromozomu 2 s navázanou EML4-ALK sondou (B)

A,



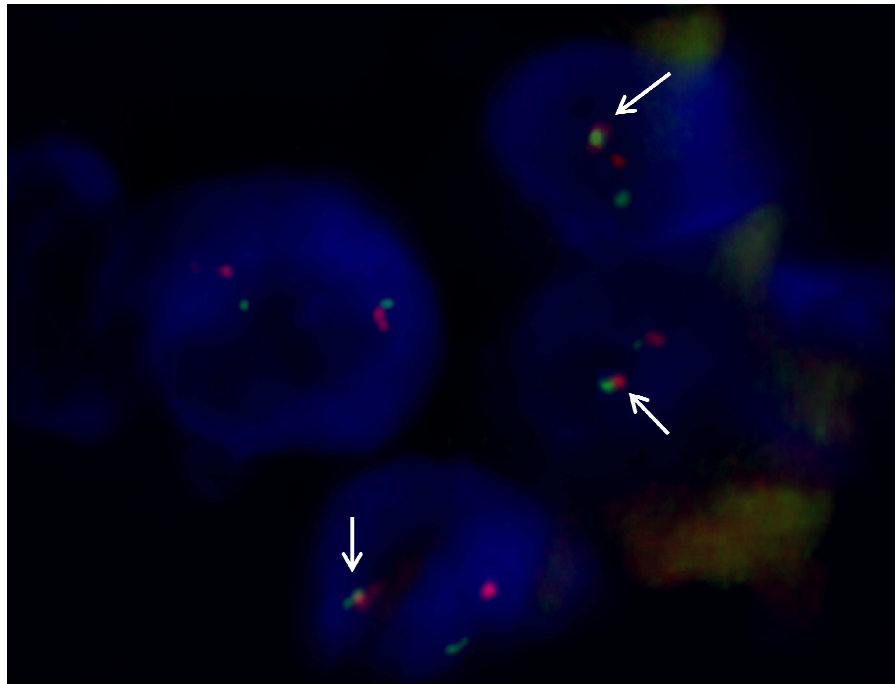
B,



Byla připravena kvalitní EML4-ALK translokační sonda, jejíž dostatečná hybridizace, intenzita signálu a specifita vazby byla ověřena. Sensitivita detekce ALK přestaveb byla ověřena na parafinové tkáni NSCLC se známou přestavbou

EML4-ALK (obr. 4). Na obr. 4 jsou patrné fúzní signály, které jsou označeny šipkami.

Obrázek č. 4.: Ověření účinnosti detekce translokace na tkáni pacienta s NSCLC s prokázanou přestavbou genu ALK



## VI. ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byla v teoretické části provedena literární rešerše genetických změn, které jsou detekovány u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem (NSCLC). Byl popsán prognostický a prediktivní význam aberací těchto genů u NSCLC.

Cílem experimentální části bakalářské práce byla příprava sondy pro detekci přestavby EML4-ALK u NSCLC. Duální sonda byla připravena pomocí fluorescenčního značení s náhodnými primery. Úspěšnost hybridizace a dostatečná intenzita signálu připravené sondy byla ověřena na parafinovém řezu karcinomu plic. Specifita vazby na chromozomální úseky 2p21 a 2p23 byla ověřena na mitotických preparátech. Dostatečná citlivost detekce přestavby EML4-ALK byla prokázána na tkáni pacienta s NSCLC, u něhož byla dříve prokázána EML4-ALK přestavba. Podařilo se nám připravit dostatečně specifickou a citlivou sondu, kterou lze s vysokou úspěšností detekovat přestavby genu ALK a nemocných s nemalobuněčným plicním karcinomem.

## VII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Artemov D., Mori N., Okollie N., Bhujwala Z. M., 2003 Magnetic Resonance in Medicine, Volume 49, Issue 3, pages 403–408, March.

Aschermanová A., Eliasová B., Krákorová G., Pešek M., Petruželka L., Skácel Z., 2002 Terapie nemalobuněčného bronchogenního karcinomu, 127-128, Bronchogenní karcinom, nakladatelství Galén, Praha.

Balak M. N., Gong Y., Riely G.J., Somwar R., Li A. R., Zakowski M. F., Chiang A., Yang G., Ouerfelli O., Kris M. G., Ladanyi M., Miller V. A., Pao W., 2006 Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. Clin Cancer Res November 1;12(21):6494-501.

Barnes D. M., Camplejohn R. S., 1996 P53, Apoptosis, and breast cancer., Journal of Mammary Gland Biol Neoplasia. Apr;1 (2):163-175.

Blick M., Westin E., Wong-Staal F., Gallo R., McCredie K., Gutterman J., 1986 Rearrangement and enhanced expression of c-myc oncogene in fresh tumor cells obtained from a patient with acute lymphoblastic leukemia.

Braun M. M., Caporaso N. E., Page W. F., Hoover R. N., 1994 Genetic component of lung cancer: cohort study of twins., Lancet. Aug 13;344(8920):440-3.

Crystal A. S., Shaw A. T., 2011 New Targets in Advanced NSCLC: EML4-ALK, Clinical Advances in Hematology & Oncology Volume 9, Issue 3 March, 207-214.

Dahabreh I. J., Linardou H., Siannis F., Kosmidis P., Bafaloukos D., Murray S. , 2010 Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res January 1;16(1):291-303.



Druker B. J., Sawyers C. L., Kantarjian H., Resta D. J., Reese S. F., Ford J. M., Capdeville R., Talpaz M., 2001 Activity of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the Philadelphia Chromosome. *N Engl J Med*; 344:1038-1042.

Dušek L., Mužík J., Kubásek M., Kopítková J., Žaloudík J., Vyzula R., 2007 Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice, Masarykova univerzita, cit. 2012-4-17, Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0, ISSN 1802 – 8861.

Feinberg A. P., Vogelstein B., 1983 A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments for high specific activity. *Anal biochem.* 132. 6-13.

Fukuyoshi Y., Inoue H., Kita Y., Utsunomiya T., Ishida T., Mori M., 2008 EML4-ALK fusion transcript is not found in gastrointestinal and breast cancers. *Br J Cancer*;98:1536-1539.

Gandara D. R., West H., Chansky K., Davies A. M., Lau D. H., Crowley J., Gumerlock P. H., Hirsh F. R., Franklin W. A., 2004 Bronchioloalveolar carcinoma: a model for investigating the biology of epidermal growth factor receptor inhibition. *Clin Cancer Res*; 10(12 Pt 2): 4205s– 4209s.

Garber K., 2010 ALK, Lung Cancer, and Personalized Therapy: Portent of the Future? , *Oxford Journals Medicine JNCI J Natl Cancer Inst* Volume 102, Issue 10Pp. 672-675 May 11.

Gazdar A. F., 2009 Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009 August;28 Suppl 1:S24-S31.

Guerrero S., Casanova I., Farré L., Mazo A., Capellà G., Mangués R., 2000 K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and

predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res.* Dec 1;60(23):6750-6.

Haiman C. A., Stram D. O., Wilkens L. R., Pike M. C., Kolonel L. N., Henderson B. E., Le Marchand L., 2006 Ethnic and racial differences in the smoking-related risk of lung cancer. *New Eng. J. Med.* 354: 333-342.

Han S. W., Kim T. Y., Jeon Y. K., Hwang P. G., Im S. A., Lee K. H., Kim J. H., Kim D. W., Heo D. S., Kim N. K., Chung D. H., Bang Y. J., 2006 Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin Cancer Res* April 15;12(8):2538-44.

Herbst R. S., Heymach J. V., Lippman, 2008 SM lung cancer, *New Eng. J. Med.* 359: 1367-1380.

Hirsch F. R., Herbst R.S., Olsen C., Chansky K., Crowley J., Kelly K., Franklin W.A., Bunn P.A., Varella-Garcia M., Gandara D. R., 2008 Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol* July 10;26(20):3351-7.

Horn L. , Pao W. , 2009 EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer, *Journal of clinical oncology*, volume, 27 number 28, 10.

Janovská D., Gopfertová D., Dohnal K., Melicherčíková V., 2002 *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena* s. 31, ISBN 8072542230.

Janz S., 2006 Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA Repair (Amst)*. Sep 8;5(9-10):1213-24. Epub Jul 11.

Kancha R. K., von Bubnoff N., Peschel C., Duyster J., 2009 Functional analysis of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutations and potential implications for *EGFR* targeted therapy. *Clin Cancer Res*; 15(2): 460– 467.

Kepák T., Kratochvílová A., Valášková I., Zajíčková V., Autrata R., Gaillyová R., Štěrbá J., 2007 Molekulární diagnostika Rb1 genu u dětí s retinoblastomem: od DNA k RNA diagnostice. Edukační sborník MOÚ. Brno: XXXI. Brněnské onkologické dny a XXI. Konference pro sestry a laboranty.

Kobayashi S., Boggon T.J., Dayaram T., Janne P.A., Kocher O., Meyerson M., Johnson B.E., Eck M.J., Tenen D.G., Halmos B., 2005 EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* February 24;352(8):786-92.

Kondo I., Shimizu N., 1983 Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13-q22 region of chromosome 7. *Cytogenet. Cell Genet.* 35: 9-14.

Kwak E.L., Bang Y., Camidge D.R., Shaw A. T., Solomon B., Maki R.G., Ou S.I., Dezube B.J., Janne P. A, Costa D. B, Varella-Garcia M., Kim W. H., M.D., Lynch TJ, M.D., Fidias P., Stubbs H., Engelman J.A., Sequist L. V., Tan W., Leena Gandhi L., Mino-Kenudson M., M.D., Wei G. C., Shreeve S. M., Ratain M. J., Settleman J., Christensen J. G., Haber D. A., Wilner K., Salgia R., Shapiro G.I., Clark J. W., Iafrate A. J., 2010 Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer, *The new england journal of medicine*, october 28, vol. 363 no. 18.

Mascaux C., Lannino N., Martin B., Paesmans M., Berghmans T., Dusart M., Haller A., Lothaire P., Meert A. P., Noel S., Lafitte J. J., Sculier J. P. , 2005 The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* January 17;92(1):131-9.

Mao C., Qiu L. X., Liao R. Y., Du F. B., Ding H., Yang W. C., Li J., Chen Q., 2010 KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer* September;69(3):272-8.

Marchetti A. , Martella C. , Felicioni L., Barassi F., Salvatore S., Chella A., Campese P.P. Iarussi T., Mucilli F., Mezzetti A., Cuccurullo F., Sacco R., Buttitta F., 2005 *EGFR* mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol*; 23(4): 857– 865.

Marks J. L., Broderick S., Zhou Q., Chitale D., Li A. R., Zakowski M. F., Kris M. G., Rusch V. W., Azzoli C. G., Seshan V. E., Ladanyi M., Pao W., 2008 Prognostic and therapeutic implications of *EGFR* and *KRAS* mutations in resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* February;3(2):111-6.

Miller V. A., Riely G. J., Zakowski M. F., Li A. R., Patel J. D., Heelan R. T., Kris M. G., Sandler A. B., Carbone D. P., Tsao A., Herbst R. S., Heller G., Ladanyi M., Pao W., Johnson D. H., 2008 Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J Clin Oncol*; 26(9) 1472–1478.

Mok T., Wu Y. L., Thongprasert S., Yang Ch., Chu D., Saijo N., Sunpaweravong P., Han B., Margono B., Ichinose Y., Nishiwaki Y., Ohe Y., Yang J., Chewaskulyong B., Jiang H., Duffield E.L., M.Sc., Watkins Armour A. A., Fukuoka M., 2008; Phase III, randomised, open- label, first-line study of gefitinib vs carboplatin/ paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer – IPASS. *Ann Oncol* 19 (Suppl 8).

Morris S.W., Kirstein M.N., Valentine M.B., Dittmer K.G., Shapiro D.N., Saltman D.L., Look A.T., 1994 Fusion of a kinase gene, *ALK*, to a nucleolar protein gene, *NPM*, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* March 4;263(5151):1281-4.

Mourali J., Bénard A., Lourenço F. C., Monnet C., Greenland C., Moog-Lutz C., Racaud-Sultan C., Gonzalez-Dunia D., Vigny M., Mehlen P., Delsol G., Allouche M., 2006 Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose

proapoptotic functions are activated by caspase cleavage., *Mol Cell Biology.*, Aug;26(16):6209-22.

Nguyen K. S., Kobayashi S., Costa D. B., Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer* 2009 July;10(4):281-9.

Ou Sh., 2011 Crizotinib: a novel and first-in-class multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the treatment of anaplastic lymphoma kinase rearranged non-small cell lung cancer and beyond. *Drug Des Devel Ther.* 2011;5:471-85. Epub Nov 23.

Pao W., Miller V. A., Politi K. A., Riely G. J., Somwar R., Zakowski M. F., Kris M. G., Varmus H., 2005 Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* March;2(3):e73.

Pillai R.N., Ramalingam S.S., 2012 The Biology and Clinical Features of Non-small Cell Lung Cancers with EML4-ALK Translocation. *Curr Oncol Rep.* Feb 5.

Riely G.J., Kris M.G., Rosenbaum D., Marks J., Li A., Chitale D.A., Nafa K., Riedel E.R., Hsu M., Pao W., Miller V.A., Ladanyi M., 2008 Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* September 15;14(18):5731-4.

Reiter, J. L., Threadgill, D. W., Eley, G. D., Strunk, K. E., Danielsen, A. J., Sinclair, C. S., Pearsall, R. S., Green, P. J., Yee, D., Lampland, A. L., Balasubramaniam, S., Crossley, T. D., Magnuson, T. R., James, C. D., Maible, N. J., 2001 Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 71: 1-20,.

Riely G.J., Kris M.G., Rosenbaum D., Marks J., Li A., Chitale D.A., Nafa K., Riedel E.R., Hsu M., Pao W., Miller V.A., Ladanyi M., 2008 Frequency and

distinctive spektrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* September 15,14 (18): 5731-4.

Risch N., 2006 Dissecting racial and etnik differens. (Editorial) *New Eng. J. Med.* 354: 408-411.

Rolen K.A., Fulton J.P., Tamura D.J., Strauss G.M., 2003 Bronchioloalveolar carcinoma (BAC) of the lung is related to cigarette smoking: A case- control study from Rhode Island (RI). *Proc Am Soc Clin Oncol*; 22: 674.

Shaw A.T., Beow Y Yeap, Benjamin J. Solomon, Gregory J. Riely, Justin Gainor, Jeffrey A. Engelman, Geoffrey I. Shapiro, Daniel B. Costa, Sai-Hong I. Ou, Mohit Butaney, Ravi Salgia, Robert G. Maki, Marileila Varella-Garcia, Robert C. Doebele, Yung-Jue Bang, Kimary Kulig, Paulina Selaru, Yiyun Tang, Keith D. Wilner, Eunice L. Kwak, Jeffrey W. Clark, A. John Iafrate, D. Ross Camidge, 2011 Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring *ALK* gene rearrangement: a retrospective analysis, *Lancet Oncol*; 12: 1004–12.

Shigematsu H., Lin L., Takahashi T., Nomura M., Suzuki M., Wistuba I.I., Fong K.M., Lee H., Toyooka S., Shimizu N., Fujisawa T., Feng Z., Roth J.A., Herz J., Minna J.D., Gazdar A.F., 2005 Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst*; 97(5): 339– 346.

Shinmura K., Kageyama S., Tao H., . 2008 EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer*;61:163-169.

Skácel Z., Zatloukal P., Vachtenheim J., 2002 Biologie bronchogenního karcinomu, Bronchogenní karcinom, nakladatelství Galén, Praha.

Smit V. T., Boot A. J., Smits A. M., Fleuren G. J., Cornelisse C. J., Bos J. L., 1988 KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res.* August 25; 16(16): 7773–7782.

Snustad D. P., Simmons M. J., 2009, *Genetika*, Masarykova univerzita/nakladatelství Brno.

Soda M., Choi Y. L., Enomoto M., Takada S., Yamashita Y., Ishikawa S., Fujiwara S., Watanabe H., Kurashina K., Hatanaka H., Bando M., Ohno S., Ishikawa Y., Aburatani H., Niki T., Sohara Y., Sugiyama Y., Mano H., 2007 Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer, *Vol 4482 August doi:10.1038/nature05945*.

Svoboda M., Fabián P., Slabý O., Staňková M., Lakomý R., Němeček R., Vyzula R., 2010 *EGFR* Tyrosine Kinase Inhibitors as a Targeted Therapy for Bronchioloalveolar Carcinoma of the Lung: a Case Report of a Clinically Prompt and Intensive Response and Literature Review, *Klinical Onkology* 23(4): 224–230.

Tsao M. S., Aviel-Ronen S., Ding K., Lau D., Liu N., Sakurada A., Whitehead M., Zhu C. Q., Livingston R., Johnson D. H., Rigas J., Seymour L., Winton T., Shepherd F. A., 2007 Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* November 20;25(33):5240-7.

Vakiani E., Solit D. B., 2011 KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol* January;223(2):219-29.

Wang, X., Huong, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N., Huang, E.-S. 2003 Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 424: 456-461.

Willyard C., 2011 How do tumors grow? *Scientific American Magazine*, August

Wu A. H., Fontham E.T.H., Reynolds P., Greenberg R.S., Buffler P., Liff J., Boyd P., Correa, 1996 Family history of cancer and risk of lung cancer among lifetime nonsmoking women in the United States. *Am J Epidemiol.* Mar 15;143(6):535-42.

Zatloukal P., Petruželka L., 2001 *Karcinom plic.* Grada publishing, spol. s.r.o., Praha.

Zhou W. J., Zhang X., Cheng C., Wang F., Wang X. K., Liang Y. J., Kin Wah To K., Zhou W., Huang H. B., Fu L. W., 2012 Crizotinib (PF-02341066) Reverses Multidrug Resistance in Cancer Cells by Inhibiting the function of P-glycoprotein. *Br J Pharmacol.* Jan 10. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01849.x. MR molecular imaging of the Her-2/*neu* receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles.



## VIII. SEZNAM ZKRATEK

ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AKT	Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALCL	Anaplastic large-cell lymphoma
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AML	Acute myeloid leukemia
ASR	Age Standardized Rate
ATP	Adenosin trifosfát
Bcr	Breakpoint cluster region
BRAF	Serine/threonine-protein kinase B-Raf.
BRCA 1	Breast cancer 1
BRCA 2	Breast cancer 2
C-abl	Tyrosin kinase of Abelson murine leukemia viral oncogene
CML	Chronic myelogenous (or myeloid) leukemia
C-MET	MET or MNNG HOS Transforming gene
C-MYC	Human homolog v-MYC gene
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGFR TKI	tyrosine kinase inhibitor of epidermal growth factor receptor

EML-4	Echinoderm microtubule associated protein like 4
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
GEF	Guanin nucleotide-exchange factor
GTP	Guanosintriphosphate
GRB-2	Growth factor receptor-bound protein 2
Her-2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HRAS	Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IHC	Immunohistochemistry
IMT	Inflammatory myofibroblastic tumors
KRAS	Kirsten RAAt Sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
NPM1	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
NSCLC	Non-small cell lung cancer, nemalobuněčný karcinom plic
OS	Overall survival (celkové přežití)
p	krátké raménko chromozomu
p53	Transkripční faktor, nádorový supresorový gen, lokalizovaný na p17
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidylinositol- 3 -kinase

q	krátké raménko chromozomu
Ras	G-protein, signální protein v MAPK dráze
RB1	Retinoblastoma 1, nádorový supresorový gen
SCLC	Small cell lung cancer
WB	wash buffer, promývací pufr
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Real-time PCR
TFG	Transforming growth factor $\beta$
TKI	Tyrosine kinase inhibitors