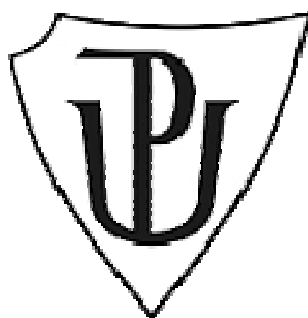


Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra molekulární biologie a genetiky



**Nové markery pro detekci minimální reziduální
choroby u karcinomu plic**

Diplomová práce

Monika Vahalíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Mgr. Andrea Prokopová

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

V Olomouci dne

.....

Monika Vahalíková

V první řadě bych chtěla poděkovat především své školitelce Mgr. Andree Prokopové za cenné rady při našich vyčerpávajících konzultacích a za čas, který mi věnovala při vypracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat svému příteli Janu Vidlařovi za pomoc při úpravě obrázků a podporu při psaní a své sestře Renatě za technickou výpomoc při úpravě textu. Velké díky patří také všem olomouckým ornitologům, kteří mi dodali dostatek energie pro psaní a v neposlední řadě také všem dugongům za jejich existenci.

Souhrn:

Karcinom plic je celosvětově nejrozšířenějším typem nádorového onemocnění, proto se neustále hledají nové potenciální markery pro jeho přesnější diagnostiku. Detekce minimální reziduální choroby (MRD) pomocí Real-time reverzně transkriptázové PCR je stále považována za „zlatý standard“ v klinických vyšetřovacích metodách. MRD rozumíme přítomnost izolovaných nádorových buněk v těle pacienta, u něhož byl odstraněn primární tumor, a který nejeví známky systémového onemocnění. Cílem této studie bylo zjistit vztah míry exprese markerů LunX a c-met k celkovému přežití pacientů s NSCLC a navrhnout, optimalizovat a ověřit vhodnost nového markeru PTPRJ pro detekci MRD u plic pomocí Real-time PCR. Zaznamenali jsme statisticky významnou závislost mezi mírou exprese c-met v krvi z plicní žíly a klinickým stádiem a postižením lymfatických uzlin. Dále jsme prokázali signifikantně kratší dobu přežití pacientů s expresí c-met v krvi a kostní dřeni. V případě markeru LunX nebyla prokázána statisticky významná závislost celkového přežití pacientů na míře jeho exprese. Dále jsme navrhli a zoptimalizovali real-time RT-PCR pro marker PTPRJ. Otestovali jsme jeho expresi ve vzorcích krve a kostní dřeni zdravých dárců a stanovili cut-off hodnoty v krvi a kostní dřeni. Vyšetřili jsme expresi PTPRJ ve vzorcích tumorů různého histogenetického původu a u několika vzorků krve pacientů s karcinomem plic. Zjistili jsme, že PTPRJ není vhodným markerem pro detekci MRD ve vzorcích krve a kostní dřeni u pacientů s NSCLC.

Summary:

Lung cancer is the most frequently occurring cancer disease in the world therefore constantly looking for new potential biomarkers for the accurate diagnosis. Detection of minimal residual disease (MRD) by real-time reverse transcriptase PCR is still considered the „gold standard“ in clinical diagnostic method. MRD means the presence of isolated tumour cells in the body of patient, who underwent curative surgery and is without any signs of cancer systemic spreading. The aim of this study was to determine the relationship of the level of LunX and c-met markers expression and the overall survival of patients with NSCLC and to design, optimize and verify the suitability of new marker PTPRJ for the detection of MRD in lungs by Real-time PCR. We have noted a statistically significant relationship between the level of c-met expression in the pulmonary blood and the clinical stage and the lymph node involvement. Furthermore, we have demonstrated a significantly shorter survival of patients with c-met expression in the blood and bone marrow. In the case of marker LunX it has not been established statistically significant correlation of overall survival of patients with the level of LunX expression. In addition, we have designed and optimized the Real-time RT-PCR for marker PTPRJ. We have tested its expression in blood and bone marrow of healthy donors and set the cut-off values in the blood and bone marrow. We have investigated the expression of PTPRJ in tumor samples of different histogenetic origins and in several blood samples of patients with lung cancer. We have found that PTPRJ is not suitable marker for MRD detection in samples of the blood and bone marrow of patients with NSCLC.

Obsah:

I Cíle práce	7
II Úvod	8
III Teoretická část	10
1 Karcinom plic a jeho diagnostika	10
1.1 Karcinom plic	10
1.2 Diagnostika	10
1.2.1 Minimální reziduální choroba (MRD)	11
1.2.2 Detekce cirkulujících nádorových buněk (CTCs)	12
2 Detekce minimální reziduální choroby pomocí Real-time PCR	14
2.1 Markery používané pro detekci cirkulujících nádorových buněk u nemalobuněčného karcinomu plic	14
2.1.1 Plicní specifický X protein (LunX)	15
2.1.2 Protoonkogenní protein c-met	16
3 Angiogeneze	17
3.1 Hypoxie	18
3.2 Angiogenní růstové faktory	21
3.3 Inhibitory angiogeneze	21
4 Signální dráha VEGF	22
4.1 VEGF rodina	22
4.2 VEGF receptory	23
4.3 Signální dráha VEGF aktivovaná prostřednictvím VEGFR-2	24
5 Protein tyrosin fosfatázový receptor typu J (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type J, PTPRJ)	27
5.1 Funkce PTPRJ v organismu, spojení s nádory	27
5.2 Regulace proliferace a přežívání buněk prostřednictvím PTPRJ	28
IV Experimentální část	30
1 Metodika	30
1.1 Vyšetření míry exprese LunX a c-met a analýza celkového přežití u souboru pacientů s karcinomem plic	30
1.1.1 Izolace RNA a reverzní transkripce	30
1.1.2 Real-time PCR	31
1.1.3 Pacienti	34
1.2 Optimalizace markeru PTPRJ	35
1.2.1 Primery a próba	36
1.2.2 Standardy	37
2 Výsledky	39
2.1 Vyšetření míry exprese LunX a c-met u souboru pacientů s karcinomem plic	39
2.2 Celkové přežití pacientů v závislosti na expresi markeru c-met	40
2.3 Optimalizace markeru PTPRJ	43
2.3.1 Optimalizace primerů PTPRJ	43
2.3.2 Standardy	46
2.3.3 Vyšetření míry exprese PTPRJ u souboru zdravých dárců krve a kostní dřeně, u souboru vzorků tumorů různého histogenetického původu a u souboru pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic	48
V Diskuse	51
VI Závěr	53
VII Seznam použité literatury	54
VIII Seznam zkratk	63

I Cíle práce

V rámci navázání na bakalářskou práci pokračovat ve vyšetřování minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem plic metodou kvantitativní RT-PCR s využitím markerů LUNX a c-met. Na základě literární rešerše se zaměřením na signální dráhu VEGF zvolit další potenciální marker pro detekci MRD u těchto pacientů.

Navrhnout specifické primery a TaqMan sondu pro stanovení exprese zvoleného markeru s využitím patřičných databází a softwarů (Pubmed, OMIM, Blast, IDTDNA, Primer3, aj.). Naučit se základy optimalizace PCR a gelové elektroforézy, práce s Agilent 2100 Bioanalyzer a zoptimalizovat real-time PCR reakci.

Připravit standardy pro absolutní kvantifikaci exprese zvoleného markeru a stanovit jeho expresi ve vybraných vzorcích lidských karcinomů a kontrolních vzorcích krve a kostní dřeně zdravých dárců.

Stanovit expresi vybraného markeru u souboru pacientů s karcinomem plic.

Odhadnout možnosti použití sledovaných markerů pro detekci MRD u karcinomu plic, stanovit prognostickou hodnotu MRD u těchto pacientů.

II Úvod

Rakovina je hlavní příčinou úmrtí v hospodářsky vyspělých zemích a druhou nejčastější příčinou úmrtí v zemích rozvojových (World Health Organisation, 2008), kde se výskyt rakoviny zvyšuje v důsledku stárnutí a růstu populace, stejně jako narůstajícího přejímání „západního“ životního stylu spojeného s kouřením, nedostatečným pohybem a způsobem stravování (Ferlay *et al.*, 2010).

Celosvětově nejrozšířenější je výskyt karcinomu plic. V roce 2008 bylo zaznamenáno přibližně 1,6 milionu nových případů, což reprezentuje 12,7 % všech nově zaznamenaných karcinomů. Karcinom plic je zároveň nejčastěji se vyskytujícím novotvarem u mužů. U žen je to karcinom prsu (globocan.iarc.fr; Jemal *et al.*, 2011).

Incidence zhoubných nádorů každým rokem narůstá i na území České republiky. V roce 2010 bylo do Národního onkologického registru ČR nahlášeno přibližně o 4 % více zhoubných nádorů než v roce předchozím. Nejčastěji diagnostikovaným onkologickým onemocněním na území ČR je „jiný zhoubný novotvar kůže“ (dg. C44). Pod tuto diagnózu histologicky spadají především bazaliomy a spinocelulární karcinomy. Celosvětově nejrozšířenější karcinom plic je u nás, co se četnosti výskytu týká, na třetím místě, hned za kolorektálním karcinomem, který je jednou z nejčastějších onkologických diagnóz v ČR jak u mužů, tak u žen. U mužů zaujímá první místo karcinom prostaty, u žen poté karcinom prsu (www.uzis.cz).

V posledním desetiletí došlo k výraznému snížení mortality pacientů, kterým byl diagnostikován zhoubný nádor. Zatímco v letech 1975 až 1977 dosahoval počet přežívajících pacientů jen 49 %, mezi lety 2002 až 2008 to bylo již 68 %. Zlepšení odráží především pokrok v diagnostice některých druhů rakoviny v časném stádiu a zkvalitnění léčby (www.cancer.org).

Včasná a přesná diagnostika je prvním krokem pro kvalitní cílenou léčbu. Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na studium detekce minimální reziduální choroby (MRD = Minimal Residual Disease) za pomoci dvou diagnostických markerů c-met a LunX, které jsme testovali metodou reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase (Real-time RT-PCR) na vzorcích souboru pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC). Oba markery se na základě naší studie jevily jako potenciální prognostické faktory. Vzhledem k uplynulému času bylo možné rozšířit soubor zkoumaných pacientů a zároveň vyhodnotit vliv exprese těchto genů na jejich přežití.

Hlavním cílem této práce je dále najít nový potenciální prognostický marker, který by u pacientů s NSCLC zkvalitnil diagnostiku minimální reziduální choroby ze vzorků krve.

Pro hledání vhodného kandidáta jsme se zaměřili na signální dráhu VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) a angiogeneze.

Angiogeneze je soubor procesů, které umožňují tvorbu nových krevních cév z cév již existujících. Porucha regulace angiogeneze vede k celé řadě onemocnění jako je diabetická retinopatie, revmatoidní artritida, ale také vývoj solidních tumorů (Robinson *et al.*, 2001). Zásadní vliv na regulaci angiogeneze má vaskulární endoteliální faktor (VEGF), který způsobuje permeabilizaci krevních cév a hraje ústřední roli při vaskulogenezi (Roberts *et al.*, 1995). Samotný VEGF je regulován celou řadou dalších faktorů (Hicklin *et al.*, 2005). Mezi ně patří oxidativní stres, růstové faktory, cytokiny nebo hypoxie, ke které dochází při nekontrolovatelném růstu nádorů. Buňky uvnitř tumoru nejsou dostatečně zásobeny kyslíkem, a tudíž aktivují regulační kaskádu vedoucí k aktivaci HIF (Hypoxia-Inducible Factor), vyplavení VEGF a následné tvorbě nových mikrokapilár, které postupně prorůstají nádorem a zásobují jej okysličenou krví (Folkman, 1971; Folkman, 2000; Vaupel, 2004; Ushio-Fukai *et al.*, 2008.).

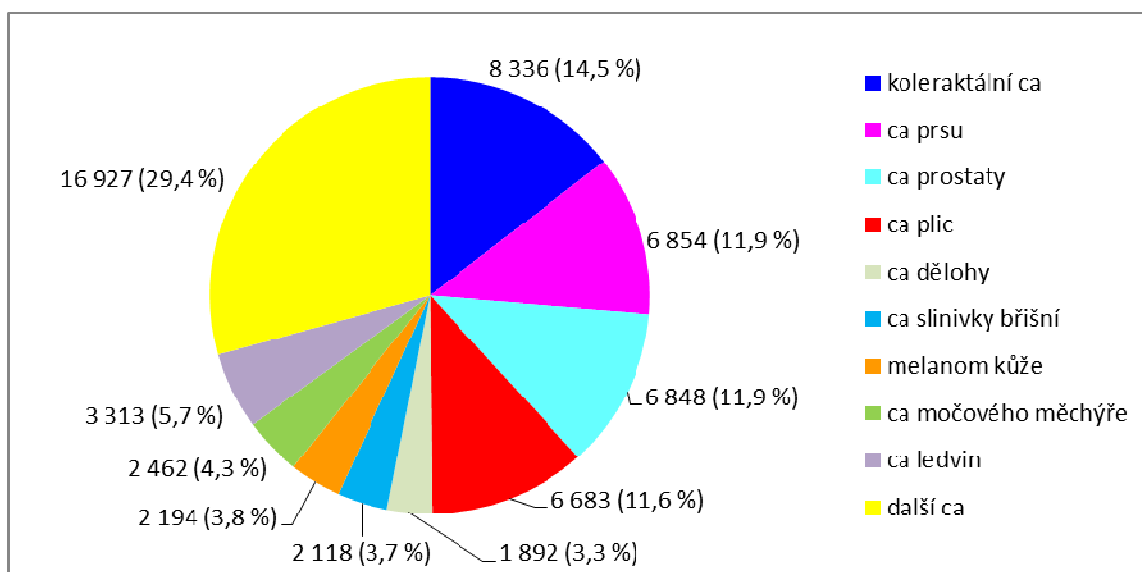
Endoteliální buňky exprimují vaskulární endoteliální cadherin, jenž může asociovat s komplexem tvořeným fosfatázou PTPRJ (jinak také známá jako DEP-1 či CD148). Bylo prokázáno, že PTPRJ částečně reguluje vaskulárním endoteliálním cadherinem zprostředkovanou inhibici fosforylace tyrosinu VEGF receptoru 2, což dále vede ke snížení kinázové aktivity a proliferace buněk, ale zároveň k aktivaci Akt a k přežívání buněk (Lampugnani *et al.*, 2003; Chabot *et al.*, 2008).

Na základě výše uvedených regulačních schopností, jsme se rozhodli vyzkoušet, zda-li je PTPRJ vhodným markerem pro diagnostiku minimální reziduální choroby u karcinomu plic.

III Teoretická část

1 Karcinom plic a jeho diagnostika

Incidence zhoubných nádorů na území České republiky každým rokem narůstá. V roce 2010 bylo do Národního onkologického registru ČR nahlášeno přibližně o 4 % více zhoubných nádorů než v roce předchozím. Karcinom plic je u nás, co se četnosti výskytu týká, na třetím místě, hned za kolorektálním karcinomem, karcinomem prsu u žen a karcinomem prostaty u mužů (www.uzis.cz).



Obr. č. 1: Incidence nejčastěji se vyskytujících zhoubných nádorů v České republice za rok 2012 (upraveno dle: globocan.iarc.fr)

1.1 Karcinom plic

Zhoubné nádory plic patří k nejčastěji se vyskytujícím nádorům v lidském organismu. Většinou se jedná o karcinomy, které vychází ze sliznice bronchů, tedy o bronchogenní karcinomy (Mačák a Mačáková, 2004). Podle biologického chování rozlišujeme dva typy bronchogenního karcinomu, malobuněčný karcinom (Small Cell Lung Carcinoma, SCLC) a nemalobuněčný karcinom (Non-Small Cell Lung Carcinoma, NSCLC) (Klener *et al.*, 2006).

1.2 Diagnostika

Diagnostika je založena na bioptickém, resp. cytologickém vyšetření. Vzorek potřebný pro vyšetření se při centrální lokalizaci nádoru získává za použití bronchofibroskopie

(kartáčová biopsie) a různých přídavných metod (bronchiální výplach nebo laváž, transbronchiální punkce lymfatických uzlin). Součástí každého vyšetření je CT (Computed Tomography), HRCT (High Resolution Computed Tomography) a PET (Positron Emission Tomography), případně PET-CT (Positron Emission Tomography – Computed Tomography), provádí se také rentgenové vyšetření hrudníku (Klener *et al.*, 2006).

Při laboratorním vyšetření stanovujeme nádorové markery – karcinoembryonální antigen (Carcinoembryonic Antigen, CEA), tkáňový polypeptidový antigen (Tissue Polypeptide Antigen, TPA), antigen skvamózních nádorových buněk (Squamous Cell Carcinoma Antigen, SCC), neuron specifická enoláza (Neuron Specific Enolase, NSE) aj., které se využívají k monitorování léčby a zjištění eventuální recidivy nádoru. K časně detekci se zdají být užitečnější biomarkery – růstové faktory nádorů např. bombesin, transformující růstový faktor alfa (Transforming Growth Factor Alpha, TGF α) nebo insulinu podobný růstový faktor 1 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF 1). Některé markery (chromogranin A, epidermální růstový faktor) a cytogenetické změny slouží k diferenciaci malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu (Klener *et al.*, 2006). Za pomoci molekulárních nádorových markerů můžeme určovat tzv. minimální reziduální chorobu (Minimal Residual Disease, MRD).

1.2.1 Minimální reziduální choroba (MRD)

Minimální reziduální choroba byla objevena před několika desítkami let, kdy se poprvé začalo s léčbou leukémie. Chemoterapie byla tehdy podávána kratší dobu než dnes, pouze několik týdnů, takže efektivně zničila nejvíce abnormální nádorové buňky. Pacienti, kteří už nejevili známky onemocnění, byli z léčby propuštěni. Nicméně u pacientů, jimž zůstalo malé množství nádorových buněk, došlo během několika týdnů od propuštění k relapsu onemocnění, i přesto že při zkoumání vzorků pod mikroskopem se krevní buňky zdály být normální. Až s nástupem genetických testů bylo zjištěno, že leukemické buňky nalezené u recidivujících pacientů pocházejí ze stejných rakovinných buněk, které se jako první objevily na začátku onemocnění. Takto vznikl název minimální reziduální choroba, který poukazuje, že tento stav je způsoben minimálním počtem zbývajících, nebo zbytkových (reziduálních) nádorových buněk v těle (www.minimalresidualdisease.com).

V současné době dochází k detekci MRD také u solidních nádorů. Časně šíření nádorových buněk do lymfatických uzlin, kostní dřeně (Hosch *et al.*, 2001) a jiných orgánů představuje významný krok při vzniku metastáz (Ignatiadis and Reinholz, 2011). Podle Pantel *et al.*, 1999, je metastatický relaps u pacientů se solidními nádory způsoben systémovým předoperačním, nebo peroperačním šířením nádorových buněk.

Cirkulující nádorové buňky (Circulating Tumour Cells, CTCs) jsou detekovány v krvi, kostní dřeni či lymfatickém systému pacienta, u něhož byla provedena resekce primárního

tumoru, a který je bez známek klinického onemocnění. Tyto izolované nádorové buňky můžeme považovat za prekuzory mikrometastáz. Jejich koncentrace je však hluboko pod detekčním limitem standardních vyšetřovacích metod jako jsou imunohistochemie nebo průtoková cytometrie (Lacroix, 2006; Paterlini-Brechot *et al.*, 2007; Pantel *et al.*, 2008).

Přítomnost jednotlivých nádorových buněk v kostní dřeni a periferní krvi může být detekována pomocí imunologických či molekulárních metod a je považována za klinicky významný prognostický faktor. Charakteristika těchto buněk umožňuje zlepšit hodnocení rizika, výběr a monitorování léčby a může mít vliv na vývoj nových terapeutických látek (Pantel *et al.*, 1999; Ignatiadis and Reinholz, 2011).

1.2.2 Detekce cirkulujících nádorových buněk (CTCs)

Vývoj v oblasti molekulární biologie, hlavně rozvoj polymerázové řetězové reakce (PCR), umožnil citlivou detekci CTCs v periferní krvi (Smith *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1995). Mezi v současnosti běžně využívanými metodami vykazuje nejvyšší diagnostickou senzitivitu pro detekci jednotlivých nádorových buněk v různých vzorcích tkání a tělních tekutin reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) (Krüger *et al.*, 1996), zvláště pak kvantitativní RT-PCR v reálném čase (Quantitative Real-Time RT-PCR), která je poměrně jednoduchá a rychlá (Bieche *et al.*, 1998).

Dále však dochází také ke zdokonalování metod přímé detekce nádorových buněk. Mezi ně patří CTC-chip, CellSearch system a nejnovější CellCollector od firmy GILUPI.

CTC-chip je vysoce citlivá technologie, pomocí které lze z krve izolovat viabilní nádorové buňky. Jedná se o silikonový čip velikosti mikroskopického sklíčka, na němž je na tzv. microposts nanosena protilátka proti adhezni molekule epiteliálních buněk (Epithelial Cell Adhesion Molecule, EpCAM). Krev je tlačena povrchem čipu, CTCs interagují s EpCAM, a jsou tak z krve vychytávány. Buňky lze poté detekovat použitím značených protilátek, např. proti cytokeratinům, izolovat a dále s nimi pracovat (Hansen *et al.*, 2003; Went *et al.*, 2004; Sequist *et al.*, 2009). Druhou generací CTC-chipu je tzv. HB-chip (Herringbone-Chip), který poskytuje větší prostor pro interakce mezi CTCs a protilátkou, a tedy efektivnější záchyt nádorových buněk (Stott *et al.*, 2010).

Poloautomatizovanou detekci CTCs epiteliálního původu v krvi umožňuje CellSearch system firmy Veridex. Tento komerční test využívá k izolaci nádorových buněk magnetické nanočástice potažené EpCAM protilátkou, buňky jsou poté selektovány pomocí směsi protilátek proti cytokeratinům 8, 18 a 19 značených phycoerythrinem, pomocí protilátek proti CD45 značených allophycoyaninem a pomocí DAPI pro značení jader buněk. Buňky jsou dle jejich signálu softwarem automaticky spočítány a je vyhodnocen jejich počet v 1 ml

krve. Nevýhodou tohoto systému je však nemožnost CTCs izolovat a dále s nimi pracovat (Van der Auwera *et al.*, 2010; www.cellsearchctc.com).

In vivo detekci CTCs umožňuje GILUPI CellCollector. Princip metody je založen na 16 cm dlouhém drátu z chirurgické nerezové oceli o průměru 0,5 mm zakončeném zaobleným hrotem a 2 cm dlouhou vrstvou čistého zlata (nosič trojrozměrné polymerní funkční vrstvy). Funkčnost celého systému umožňuje vrstva specifických protilátek proti antigenům na povrchu buněk, např. anti-EpCAM protilátky. Hrot je lékařem zaveden do žíly pacienta přes běžně používaný katetr a ponechán v cévě po dobu 30 minut. Během této doby přijde CellCollector do kontaktu s velkým množstvím z celkového objemu pacientovy krve. Tato metoda zvyšuje šanci na izolaci CTCs i při jejich nízké koncentraci, neboť ve srovnání s běžnými *in vitro* metodami přijde do kontaktu s významně větším množstvím krve, než které bývá pacientům běžně odebíráno. Nádorové buňky se váží na anti-EpCAM kovalentně navázaný na povrchu kapiláry a funkcionalizovaný povrch kapiláry zabraňuje nespecifické vazbě jiných krevních složek. Takto izolované buňky mohou být následně analyzovány za použití jiných molekulárních metod např. imunohistochemie (Saucedo-Zeni *et al.*, 2012; www.gilupi.com).

2 Detekce minimální reziduální choroby pomocí Real-time PCR

Pomocí Real-time RT-PCR lze stanovit rozdíl v genové expresi mezi nádorovými a nenádorovými buňkami. Nádorové buňky exprimují jiné geny ze své výbavy, což se projeví změnou množství a spektra exprimované mRNA (Bieche *et al.*, 1998; Bustin, 2000). Výhodou tohoto přístupu je nízká stabilita RNA po uvolnění z buňky a tudíž detekce živých buněk (Jung *et al.*, 1998; Ballestrero *et al.*, 2005). Ve srovnání s imunocytochemií je Real-time RT-PCR 10x až 100x citlivější, jsme tak schopni detekovat až jednu nádorovou buňku mezi deseti miliony buňkami nenádorovými (Gerhard *et al.*, 1994; Pantel *et al.*, 1999; Paterlini-Brechot *et al.*, 2007).

Vysoká senzitivita metody s sebou nese problém ilegální transkripce, tedy detekci znaků epiteliálních buněk v kompartmentech mesenchymálního původu u zdravých jedinců (Srovnal *et al.*, 2005).

Dalším problémem je, že se při vyšetřeních mohou objevit některé nádorově specifické genové exprese hned u několika rozdílných nádorů, například prostatický specifický antigen nebo melanomový antigen mohou být detekovány u pacientů s karcinomem prostaty, s melanomem, ale také s karcinomem prsu (Shingyoji *et al.*, 2003). Proto se stále hledají nejvhodnější markery pro daný typ karcinomu.

2.1 Markery používané pro detekci cirkulujících nádorových buněk u nemalobuněčného karcinomu plic

Pro detekci CTCs u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic se používají markery jako například prepro-gastrin-uvolňující peptid (Prepro-Gastrin-Releasing Peptide, preproGRP), cytokeratin 19 (CK19) a karcinoembryonální antigen (CEA). Nicméně většina z nich vykazuje falešnou pozitivitu ve vzorcích periferní krve zdravých dárců (Li *et al.*, 2005) nebo pacientů s jiným typem epiteliálního karcinomu (Cheng *et al.*, 2008).

CEA je jedním z nejvíce používaných klinických nádorových markerů, neboť má poměrně stabilní molekulu, omezenou expresi v normální tkáni a zároveň zvýšenou expresi u nádorů a je užitečný jako nádorový marker séra pro kolorektální a některé další druhy karcinomů (Nap *et al.*, 1988). Stanovení hladiny CEA ze séra slouží jako nádorový marker při dohledu na stav pacienta po chirurgickém odstranění karcinomu tlustého střeva, kde je jeho zvýšená hladina indikátorem recidivy onemocnění (Graham *et al.*, 1998). Ge *et al.* (2006) upřednostňují marker CEA pro detekci CTCs u pacientů s NSCLC, neboť dle jejich studie

probíhá uvolňování buněk s expresí CEA do cirkulace především po operaci, na rozdíl od buněk exprimujících CK19, které se šíří již během operace.

Pro detekci CTCs u NSCLC pacientů může být také použit nový marker BJ-TSA-9 (Li *et al.*, 2005). Samotný BJ-TSA-9 však není dostatečně citlivý pro detekci nádorových buněk v periferní krvi, citlivost výrazně zvyšuje jeho použití v kombinaci např. s antigenem skvamózních nádorových buněk (Squamous Cell Carcinoma Antigen, SCCA) (Li *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2008).

Obecně je vhodné většinu markerů použít v kombinaci s jinými, abychom dosáhli potřebné citlivosti a specificity. Pro diagnostiku plicních nádorů a posouzení jejich klinického stádia se jeví jako velmi vhodná například kombinace receptoru pro epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) s lidskou reverzní telomerasou (Human Telomerase Reverse Transcriptase, hTERT) (Miura *et al.*, 2006).

Dalšími markery pro detekci nemalobuněčného karcinomu plic jsou plicní specifický X protein (Lung Specific X Protein, LunX) a receptor pro růstový faktor hepatocytů (Hepatocyte Growth Factor Receptor, HGFR, c-Met).

2.1.1 Plicní specifický X protein (LunX)

LunX je specifický gen o velikosti 206 bp, jehož exprese probíhá výhradně v plicní tkáni, proto je vhodný jako citlivý marker pro detekci plicních nádorů (Iwao *et al.*, 2001; Mitas *et al.*, 2003).

Pomocí semikvantitativní RT-PCR bylo prokázáno, že exprese LunX je vyšší v nádorové tkáni v porovnání s normální plicní tkání (Iwao *et al.*, 2001) a zároveň nebyla detekována v periferní krvi pacientů s jinými epiteliálními karcinomy ani u pacientů se zápalom plic (Cheng *et al.*, 2008).

Pozitivní detekce LunX mRNA v periferní krvi není ovlivněna pohlavím, věkem ani typem nádoru pacientů. Nicméně existuje vztah mezi stádiem nádoru a mírou exprese. Čím vyšší je exprese LunX mRNA, tím pokročilejší je stádium nemoci. LunX je zároveň vysoce citlivý biomarker pro diferenciální diagnostiku NSCLC z plicního výpotku. Jako jediný marker dokáže uspokojivě odlišit plicní výpotek pocházející z maligního plicního nádoru od plicního výpotku u pacientů s benigním onemocněním plic jako je tuberkulózní zánět pohrudnice (Cheng *et al.*, 2008).

Zhang *et al.* (2014) prokázali, že exprese mRNA CK19, EGFR a LunX v periferní krvi je významnou klinickou hodnotou pro diagnostiku mikrometastáz a prognózu karcinomu plic.

Vysokou citlivost tohoto markeru prokázali Iwao *et al.* (2001), kteří detekovali LunX mRNA už při koncentraci 10^{-4} μ g nádorové RNA v 1 μ g normální RNA pocházející z lymfatických uzlin.

2.1.2 Protoonkogenní protein c-met

Protoonkogen c-met je lokalizován na chromozomu 7 a poprvé byl izolován za použití transfekční assaye NIH3T3 v roce 1984 (Blair *et al.*, 1982; Cooper *et al.*, 1984).

c-met je novým cílem při diagnostice a léčbě nádorů plic. Bylo zjištěno, že k jeho expresi dochází u NSCLC. Exprese c-met je stejná v nádorových tkáních i v cirkulujících buňkách, ale zároveň není ovlivněna pohlavím, věkem ani histologickým typem nádoru. Pro diagnostiku je důležité, že míra exprese c-met závisí na stádiu nádoru. Pacienti, u nichž bylo prokázáno zvýšené množství c-met mRNA v periferní krvi, mají zvýšené riziko recidivy onemocnění (Cheng *et al.*, 2005; Sheu *et al.*, 2006).

Samotný c-met není jako diagnostický marker pro NSCLC dostatečně citlivý, Sheu *et al.* (2006) však prokázali, že v kombinaci s CEA a CK19 se citlivost detekce cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi výrazně zvýšila.

c-met se stává také atraktivním cílem pro léčbu. Bylo studováno několik odlišných přístupů k zablokování činnosti c-met, např. protilátky proti c-met/HGFR (Burgess *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Martens *et al.*, 2006) nebo inhibitory kináz (Sattler *et al.*, 2003). Většina z těchto intervenčních strategií prokázala protinádorovou aktivitu. (Bellon *et al.*, 2007). Protoonkogen c-met kóduje receptor s vysokou afinitou pro růstový faktor hepatocytů, proto kombinace inhibitoru c-met s látkami blokujícími tyrosinkinázovou aktivitu EGFR (např. gefitinib) hrají důležitou roli v protinádorové léčbě (Stabile *et al.*, 2010; Liska *et al.*, 2011).

3 Angiogeneze

Cévní systém obratlovců se skládá z vysoce organizované větvičí se sítě tepen, kapilár a žil, které pronikají prakticky do všech tělních tkání, čímž umožňují efektivní výměnu kyslíku, živin a odstraňování odpadních látek. Krev, která je nositelkou kyslíku, oxidu uhličitého a produktů metabolismu, je čerpána ze srdce, prostřednictvím tepenného systému, do kapilárního řečiště tkání, kde dochází k výměnám. Následně je směřována prostřednictvím žilního systému zpět do srdce (Folkman, 1995; Ferrara and Alitalo, 1999; Carmeliet and Jain, 2000).

V embryu se cévy tvoří pomocí dvou odlišných procesů, vaskulogeneze a angiogeneze. Vaskulogeneze zahrnuje de novo diferenciaci endoteliálních buněk z mezodermálních prekurzorů, zatímco u angiogeneze jsou nové cévy tvořeny z pre-existujících cév (Risau, 1997).

Vaskulogeneze probíhá pouze v průběhu embryonálního vývoje a vede k vytvoření primárního cévního svazku. Později jsou tyto téměř stejnoměrně velké endoteliální kanálky přetvořeny do zralého systému skládajícího se ze stromové hierarchie malých a velkých cév. Nové kapiláry se poté tvoří angiogenezí a to buď pučením, nebo rozdělením (intususcepce) z cév původních. U dospělých je angiogeneze nezbytná pro ženský reprodukční cyklus a pro opravy, remodelaci a regeneraci tkání např. při hojení ran (Folkman, 1995).

Cévní systém je ovlivněn řadou patologických stavů včetně aterosklerózy a rakoviny (Folkman, 1995).

Rakovina má schopnost šířit se do sousedních i vzdálenějších orgánů. Nádorové buňky mohou pronikat do krve či lymfatických cév, cirkulovat přes intravaskulární proud a nakonec se množit na jiném místě: metastázovat. Pro metastatické šíření nádorové tkáně je důležitá tvorba nové sítě krevních a lymfatických cév angiogenezí a lymfangiogenezí. Ty mají zásadní úlohu při dodávání živin, kyslíku a imunitních buněk, ale také při odstraňování odpadních produktů (Folkman, 1971).

Předpokládá se, že v nádorových buňkách dochází k tzv. „přepínání angiogeneze“ („angiogenic switch“). Angiogeneze je „vypnutá“ v případě, že účinek pro-angiogenních a anti-angiogenních molekul je v rovnováze. Pokud se rovnováha vychýlí ve prospěch pro-angiogenních molekul, dochází k jejímu „zapnutí“ (Bouck *et al.*, 1996; Hanahan and Weinberg, 2000). Byly objeveny různé signály fungující jako přepínače. Mezi ně patří metabolický stres (např. nízký pO_2 , nízké pH nebo hypoglykémie), mechanický stres (např. tlak generovaný proliferujícími buňkami), imunitní/zánětlivá odpověď (např. imunitní/zánětlivé buňky, které pronikly do tkáně) a genetické mutace (např. aktivace onkogenů nebo delece

tumor-supresorových genů kontrolujících produkci regulátorů angiogeneze) (Carmeliet, 1999a; Kerbel, 2000).

Nádorové cévy se vyvíjejí pučením, či intususcepcí z již existujících cév. K nádorové angiogenezi mohou také přispívat cirkulující endoteliální prekuzory mobilizované ze stěny cév, nebo z kostní dřeně (Asahara, 2000; Rafii, 2000).

Nově vzniklé kapiláry se u většiny solidních tumorů liší od morfologie cév v normální tkáni. Vlasečnice solidních tumorů vykazují celou řadu strukturních a funkčních abnormalit. Často bývají zvětšené, zkroucené, protáhlé a vakovité. Dochází k významnému arteriovenóznímu zkratu a přerušení perfúze doprovázené chaotickou cévní organizací, která postrádá jakoukoliv regulaci odpovídající metabolickým nárokům a funkčnímu stavu tkáně. Běžné je také nadměrné větvení často doprovázené slepým zakončením cév. Neúplná nebo chybějící vnitřní endoteliální vrstva cév a narušení základní stavby membrány má za následek zvýšenou vaskulární permeabilitu s extravazací krevní plazmy a červených krvinek šířících se do intersticiální kapaliny a výrazně zvyšujících hydrostatický tlak v intersticiu nádoru. U solidních nádorů je zvýšený viskózní odpor při průtoku způsobený především hemokoncentrací. Aberantní cévní morfologie a snížení hustoty cév mohou vést k nedostatečnému prokrvení (Vaupel, 2004).

3.1 Hypoxie

U většiny solidních nádorů můžeme nalézt nestejně rozložené hypoxické a/nebo anoxické oblasti. Tyto oblasti vznikají v důsledku nerovnováhy mezi nabídkou a spotřebou kyslíku. V normálních tkáních nebo orgánech přívod kyslíku odpovídá metabolickým požadavkům. U lokálně pokročilých solidních nádorů může rychlost spotřeby kyslíku neoplastickými (nebo stromálními) buňkami převážit jeho nedostatečný přívod a vést k rozvoji tkáňových oblastí s velmi nízkou úrovní O_2 (Vaupel, 2004).

Hlavní patogenické mechanismy podílející se na vzniku hypoxie u solidních nádorů jsou: (1) závažné strukturální a funkční abnormality nádorových vlásečnic (perfúzí omezené dodávky kyslíku), (2) zhoršení difúze (difúzí omezené dodávky kyslíku) a (3) s nádorem asociované a/nebo terapií indukované anémie vedoucí ke snížení O_2 přepravní kapacity krve (anemická hypoxie). Existuje množství důkazů pro existenci značné heterogenity okysličení tkání, především v případě prvních dvou mechanismů (Vaupel, 2004).

Hlavním účinkem hypoxie je indukce transkripčního faktoru indukovatelného hypoxií tzv. HIF-1 α , který aktivuje celou řadu drah důležitých pro progresi nádoru jako například angiogenezi, glykolýzu a proliferaci (Carmeliet, 1998).

Semenza *et al.* identifikoval transkripční faktor HIF-1 v roce 1992. HIF-1 je heterodimer skládající se ze dvou podjednotek: HIF-1 α (120 kDa protein) a HIF-1 β (91-94 kDa protein,

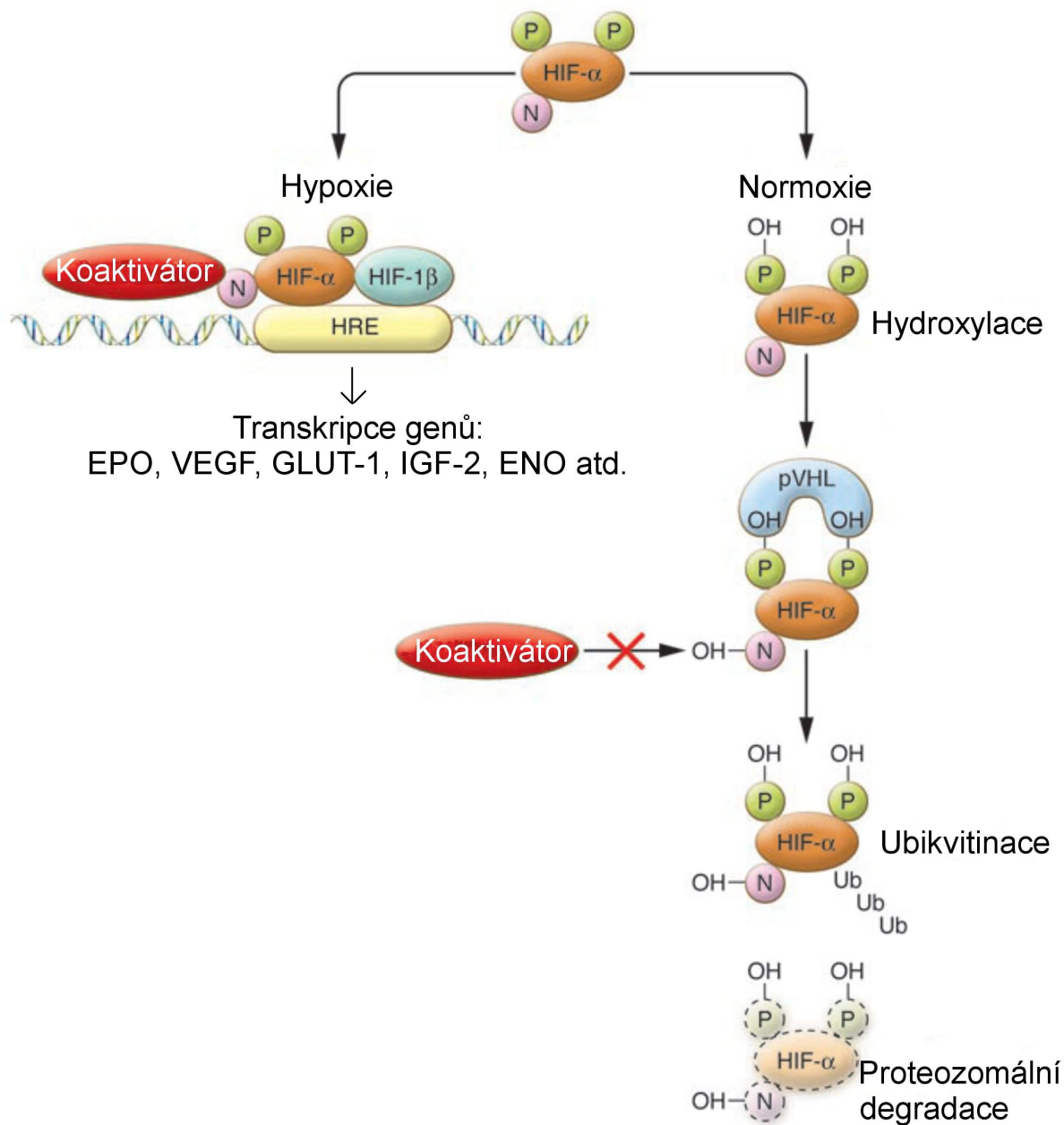
jinak také nazývaný aryl-uhlovodíkový jaderný receptorový translokátor (Aryl-Hydrocarbon-Nuclear Receptor Translocator; ARNT1)), které jsou stabilizovány hypoxií.

Zvýšení intracelulárního obsahu HIF-1 nastává bezprostředně po zaznamenání hypoxie. HIF-1 β je přítomen konstitutivně a jeho hladina se obvykle po hypoxické stimulaci nemění. Naopak hladina HIF-1 α je za přítomnosti kyslíku udržována na nízké úrovni, neboť se váže na nádorový supresor von Hippel Lindau protein (pVHL), který je součástí multiproteinového komplexu E3 ubiquitin ligázy, a je dopravován do proteasomu, kde dochází k jeho degradaci. (Huang *et al.*, 1996; Salceda and Caro, 1997; Huang *et al.*, 1998).

Degradace HIF-1 α je řízena kyslík-dependentní degradační (Oxygen-Dependent Degradation, ODD) doménou, která umožňuje signálu závislému na kyslíku způsobovat degradaci proteinu (Huang *et al.*, 1998). Hypoxie inhibuje hydroxylaci prolylových reziduí 402 a 564 v oblasti kyslík-dependentní degradační domény, čímž zamezí vazbě pVHL. Podobně zvyšuje transkripční aktivitu HIF-1 také na hypoxii závislá inhibice hydroxylace asparaginových reziduí s C-terminální aktivační doménou (Ivan *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2001; Lando *et al.*, 2002).

Růstové faktory, cytokiny a onkogeny stimulující p42/p44 u s mitogenem asociované protein kinázové dráhy (Mitogen-Associated Protein Kinase, MAPK) a/nebo fosfatidylinositol-3-kinázové dráhy (Phosphatidylinositol-3-Kinase, PI-3-K) mohou zvyšovat HIF-1 α aktivitu buď fosforylací, nebo zvýšením exprese HIF-1 α nezávisle na kyslíku. Význam těchto signálních drah se liší u různých buněčných linií (Alvarez-Tejado *et al.*, 2002; Arsham *et al.*, 2002).

Podle studie Carmeliet *et al.* z roku 1998 lze určit, zda je, či není HIF-1 α fosforylován na základě toho, jestli hraje roli při podpoře nebo kontrole přežití nádorových buněk. Defosforylovaný HIF-1 α stabilizuje p53 a indukuje apoptózu. Zatímco fosforylovaný HIF-1 α putuje do jádra, kde se váže na HIF-1 β , čímž vytváří transkripční faktor HIF-1, způsobující expresi genů podporujících buněčný růst. HIF-1 se váže do konzervativní sekvence (5'-CGTG-3') známé jako element hypoxické odezvy (Hypoxic Response Element, HRE) v promotorové oblasti cílového genu. Jako první byl identifikován erythropoetin, ale následně byla objevena celá řada dalších cílových genů (Semenza *et al.*, 1992). Tyto cílové geny jsou zapojeny v množství procesů podporujících buněčné přežití a proliferaci. Mezi ně patří angiogeneze, vasodilatace krevních cév a erythropoéza, glukózový metabolismus, metabolismus aminokyselin a nukleotidů, regulace pH intracelulárního prostoru a indukce růstových faktorů (Semenza, 2003).



Obr. č. 2: Aktivita HIF za hypoxických a normoxických podmínek. Při normoxii hydroxylace na dvou prolinových reziduích podporuje spojení HIF-1 α s pVHL a zničení HIF-1 α prostřednictvím ubikvitin/proteazomové dráhy, zatímco hydroxylace asparaginových reziduí blokuje asociaci s koaktivátory. Při hypoxii jsou tyto procesy potlačeny, což umožňuje HIF- α podjednotkám (jak HIF-1 α tak HIF-2 α) uniknout proteolýze, dimerizovat s HIF-1 β , spojit se s koaktivátory a aktivovat transkripci specifických genů prostřednictvím HRE. N = asparagin, P = prolin, OH = hydroxylová skupina, Ub = ubikvitin (upraveno dle Ratcliffe, 2007)

Giatromanolaki *et al.* (2001) ve své studii uvádí, že HIF-1 α je u nemalobuněčného karcinomu plic spojen s expresí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), z krevních destiček odvozeného endoteliálního růstového faktoru (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor, PD-ECGF) a bazického růstového faktoru fibroblastů (Basic Fibroblastic Growth Factor, bFGF).

3.2 Angiogenní růstové faktory

V okamžiku, kdy dojde k maligní transformaci, růstu nádoru a následně k hypoxii, začínají nádorové buňky exprimovat celou řadu molekul podporujících angiogenezi. Mezi ně patří hlavně vaskulární endoteliální růstový faktor, destičkový růstový faktor, základní růstový faktor fibroblastů a interleukin-8 (Singhal *et al.*, 2005).

Nejvýznamnějším angiogenním růstovým faktorem je vaskulární endoteliální faktor (VEGF), jehož exprese je stimulována tkáňovou hypoxií podobně jako celá řada dalších růstových faktorů a cytokinů. VEGF se váže na své receptory VEGFR-1 a VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1/2) a způsobuje proliferaci a migraci endoteliálních buněk. Dále také zvyšuje propustnost cév a může být zapojen do koagulační, fibrolytické a apoptotické dráhy (Cox *et al.*, 2000).

Destičkový růstový faktor (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) je vylučován krevními destičkami, zvyšuje syntézu DNA, migraci endoteliálních buněk, růst nádorů a podporuje angiogenezi (Cox *et al.*, 2000).

Bazický růstový faktor fibroblastů (Basic Fibroblastic Growth Factor, bFGF) je uvolňován proteolytickými enzymy z extracelulární matrix, což následně vede ke zvýšení exprese dalších proteolytických molekul. Zvyšuje růst nádorů a působí jako proangiogenní faktor (Cox *et al.*, 2000)

Posledním významným angiogenním růstovým faktorem je interleukin-8 (IL-8). Podle Yuan *et al.* (2000) IL-8 silně asociuje s progresí nádoru, nádorovou angiogenezí, přežitím a dobou relapsu u nemalobuněčného karcinomu plic.

3.3 Inhibitory angiogeneze

Nádory mohou také aktivovat angiogenní inhibitory jako jsou angiostatin a endostatin, které kontrolují růst potlačením proliferace endoteliálních buněk a angiogeneze a nepřímo zvýšením apoptózy v nádorových buňkách (Volm *et al.*, 2000).

4 Signální dráha VEGF

Jak již bylo řečeno výše, při maligní transformaci a růstu nádorů, dochází k nedostatečnému okysličení nádorových buněk, tedy k hypoxii (Vaupel, 2004; Singhal *et al.*, 2005). Během hypoxie se stabilizuje protein HIF-1 α , putuje do jádra, kde se spojí s HIF-1 β a vytvoří spolu transkripční faktor HIF-1. Následně dochází k expresi angiogenních růstových faktorů (Carmeliet *et al.*, 1998).

Nejdůležitější dráhou pro regulaci angiogeneze je signální dráha vaskulárního endoteliálního faktoru (VEGF) a jeho receptorů VEGFR-1 a VEGFR-2 (Cox *et al.*, 2000).

Již v roce 1983 popsal Senger *et al.* faktor vylučovaný buněčnými liniemi hepatocelulárního karcinomu, který zvyšoval extravazaci barviva do kůže morčat. I když byl dále charakterizován v roce 1986 (Senger *et al.*, 1986), jeho aminokyselinová sekvence byla popsána až v roce 1990 (Senger *et al.*, 1990).

V listopadu 1989 Connolly *et al.* také identifikoval peptid sekretovaný buněčnou linií hepatocelulárního karcinomu a prokázal, že tento peptid stimuluje angiogenezi a je specifickým potenciálním mitogenem pro endoteliální buňky. V prosinci téhož roku byla popsána kompletní sekvence komplementární DNA kódující VEGF (Leung *et al.*, 1989).

4.1 VEGF rodina

VEGF rodina se skládá z šesti členů: VEGF-A (někdy označován pouze jako VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E a placentálního růstového faktoru (Placental Growth Factor, PlGF) (Brattström *et al.*, 2002). mRNA kódující VEGF je z původních osmi exonů alternativně sestřihána do šesti izoform, které se u člověka liší v rozmezí 121 až 206 aminokyselin. Jsou to izoformy VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 a VEGF206 (Lei *et al.*, 1998).

VEGF-A je zodpovědný především za angiogenezi a zvýšení propustnosti cév, proto je také někdy známý jako faktor vaskulární permeability (Vascular Permeability Factor, VPF) (Senger *et al.*, 1986). Kromě změny propustnosti cév vede také k vazodilataci zvýšením syntézy oxidu dusnatého v endoteliálních buňkách (Horowitz *et al.*, 1997). Dále stimuluje migraci endoteliálních buněk do perivaskulárního prostoru zvýšením aktivity RhoA (van Nieuw Amerongen *et al.*, 2003) a potlačuje apoptózu prostřednictvím aktivace MAPK/ERK dráhy (Gupta *et al.*, 1999). VEGF-C, podle Takizawa *et al.*, 2006, podporuje metastázy do lymfatických uzlin.

Funkce VEGF-B a VEGF-D ještě nebyla s určitostí zjištěna, ale předpokládá se, že VEGF-B má podobný účinek jako VEGF-A a VEGF-D jako VEGF-C, neboť se váží do stejných receptorů (Olofsson *et al.*, 1998; Maekawa *et al.*, 2007; Oral *et al.*, 2007).

4.2 VEGF receptory

Pro další šíření signálu je nutné, aby se jednotlivé typy VEGF navázaly na příslušné receptory. VEGF se váží do dvou tyrosin kinázových receptorů (Receptor Tyrosin Kinases, RTKs), VEGFR-1 a VEGFR-2. Oba mají ve své extracelulární doméně sedm imunoglobulinu-podobných domén, jednu transmembránovou oblast a tyrosin kinázovou sekvenci přerušenu vloženou kinázovou doménou (Ferarra *et al.*, 2003). VEGFR-3 je členem stejné rodiny RTKs, ale není receptorem pro VEGF, místo něj váže VEGF-C a VEGF-D (Karkkainen *et al.*, 2002). Jednotlivé receptory jsou exprimovány s různou intenzitou v různých tkáních nebo buňkách a zároveň se liší svými *in vivo* biologickými funkcemi (Shibuya, 2001).

VEGFR-1 (jinak také flt-1; Fms-Like-Tyrosine Kinase-1) byl identifikován v roce 1992 jako první receptor vážící VEGF (de Vries *et al.*, 1992). Je exprimován převážně endoteliálními buňkami, ale můžeme jej nalézt také u monocytů, kde zprostředkovává migraci (Clauss *et al.*, 1996). Stejně jako exprese VEGF je i exprese VEGFR-1 zvyšována hypoxií, tedy mechanismem závislým na HIF-1 (Gerber *et al.*, 1997). Kromě VEGF se na tento receptor specificky váží také VEGF-B a PlGF (Park *et al.*, 1994; Olofsson *et al.*, 1998). VEGF stimuluje prostřednictvím VEGFR-1 migraci lidských pupečnickových cévních endoteliálních buněk (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs) tak, že reguluje reorganizaci aktinu, která je nezbytná pro pohyblivost buněk. Na tomto jevu se podílí také VEGFR-2. Ten generuje zřetelný signál, na základě kterého dochází k regulaci buněčné adheze prostřednictvím nashromáždění vinkulinu (membránový cytoskeletální protein) v adhezním plaku (Focal Adhesion Plaque) a fosforylací tyrosinu adhezí kinázy (Focal Adhesion Kinase, FAK) a paxilinu (signální transdukční adaptérový protein umožňující fokální adhezi) (Kanno *et al.*, 2000). Aktivace VEGFR-1 není spojena s proliferací buněk, právě naopak při angiogenezi má stabilizační roli, neboť působí jako antagonist VEGFR-2 (Rahimi *et al.*, 2000). Ovšem v případě, že dojde k abnormálně vysoké expresi VEGFR-1 specifického ligandu, funguje prostřednictvím své tyrosin kinázy jako pozitivní regulátor (Hiratsuka *et al.*, 2001)

VEGFR-2, jinak také známý jako KDR (Kinase Insert Domain-Containing Receptor) nebo flk-1 (Fetal Liver Kinase 1), je exprimován endoteliálními buňkami a jeho aktivace hraje pozitivní roli v regulaci angiogeneze, neboť podporuje proliferaci endoteliálních buněk (Rahimi *et al.*, 2000). VEGFR-2 váže VEGF s vysokou afinitou a iniciuje ligandem zprostředkovanou autofosforylací receptoru. Dále bylo při pokusech prováděných na oocytech drápatky vodní (*Xenopus laevis*) zjištěno, že po injekčním vpravení VEGFR-2 mRNA do oocytu a následné stimulaci VEGF, dochází k rychlému vyplavení vápenatého kationtu. K jeho uvolňování dochází také v cévních endoteliálních buňkách nádorů, kde

zvyšuje permeabilitu cév a vede k aktivaci dalších regulačních kaskád. Pomocí *in situ* hybridizace bylo prokázáno, že u myších embryí je exprese VEGFR-2 omezena na cévní endotel a stroma pupeční šňůry, tudíž i zde hraje roli ve vývoji cév a regulaci jejich propustnosti (Brock *et al.*, 1991; Quinn *et al.*, 1993). Takahashi *et al.* (1995) zjistil, že u karcinomu tlustého střeva exprese VEGF a VEGFR-2 koreluje se stádiem onemocnění, metastázami a počtem nově vzniklých cév. Bylo také prokázáno, že VEGFR-2 podporuje prostřednictvím aktivace dráhy PI-3-kinázy a Akt přežívání endoteliálních buněk (Gerber *et al.*, 1998).

VEGFR-3, jinak také známý jako Flt-4 (Fms-Like-Tyrosine Kinase-4), je stejně jako předchozí dva receptory exprimován endoteliálními buňkami, převážně pak v lymfatickém systému. S vysokou afinitou se na něj váží vaskulární endoteliální faktory VEGF-C a VEGF-D (Joukov *et al.*, 1996; Karkkainen *et al.*, 2002). Imunohistologické studie na vzorcích pacientů s NSCLC ukázaly, že VEGFR-3 je exprimován hlavně v nádorových buňkách, ale také v makrofázích, pneumocytech II. typu a v lymfatických cévách, zatímco jeho ligand VEGF-C pouze v nádorových buňkách a makrofázích (Takizawa *et al.*, 2006). U pacientů postižených leukémií podporuje VEGF-C prostřednictvím svého receptoru VEGFR-3 přežívání a proliferaci leukemických buněk (Dias *et al.*, 2002). U solidních tumorů poté jejich exprese koreluje s metastatickým šířením nádorových buněk do lymfatických uzlin a s dobou přežití pacientů, tudíž podporuje migraci a invazi nádorových buněk (Jüttner *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2006). Gunningham *et al.*, ve své studii z roku 2000, uvádí, že v buňkách prsní tkáně existují dvě izoformy VEGFR-3 receptoru, dlouhá a krátká. V případě karcinomu prsu ale dochází ke značné redukci dlouhé izoformy, zvláště pak u pacientů s metastaticky postiženými uzlinami.

4.3 Signální dráha VEGF aktivovaná prostřednictvím VEGFR-2

VEGFR-2 je hlavním receptorem pro převádění VEGF signálu řídícího angiogenezi a mitogenezi endoteliálních buněk. Po dimerizaci a autofosforylaci receptoru je několik SH2 domén obsahujících signální transdukční molekuly aktivováno buď přímými, jako například PLC-gama (Phospholipase C - Gamma), VRAP (VEGF Receptor Associated Protein) a Sck (Shc-like Protein), nebo nepřímými mechanismy, jako Src a PI-3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase). Aktivace PKC (Protein Kinase C) hraje klíčovou roli ve VEGF-A mitogenní signalizaci přes Raf1-MEK-ERK dráhu. Signál pro přežití buněk je zprostředkován zejména prostřednictvím PI-3-K řízené aktivace Akt/PKB (Protein Kinase B). Aktivace PI-3-K ve výsledku vede k akumulaci PIP-3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphate), který následně řídí fosforylaci Akt/PKB vazbou do jeho PH (Pleckstrin Homology) domény. Dalšími cíli této dráhy jsou proapoptotické proteiny BAD (Bcl-2-associated Death Promotor), FKHR1

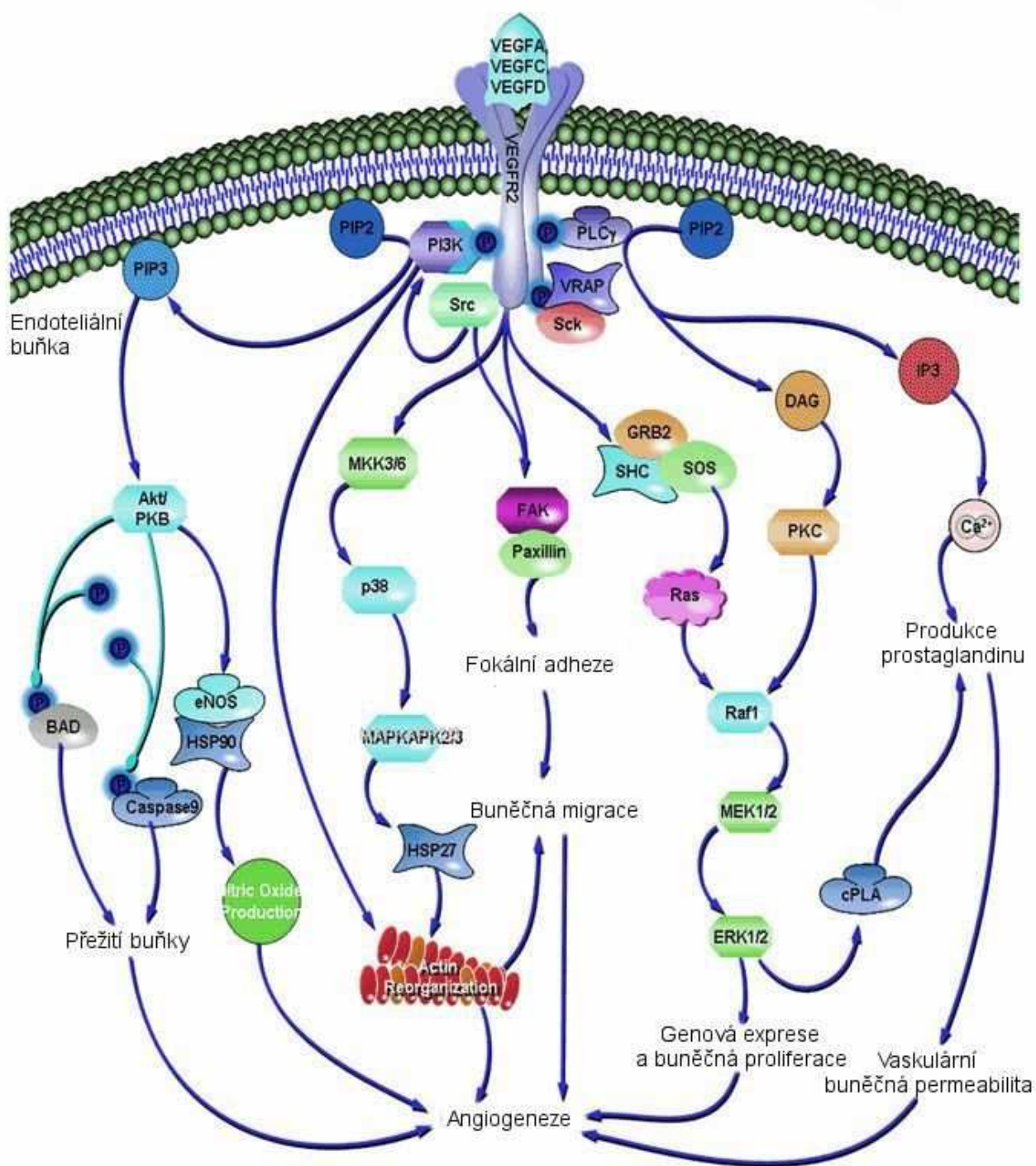
(Forkhead Transcription Factor-1) a kaspáza-9, jejichž fosforylace inhibuje apoptózu. Navíc VEGF-A indukuje expresi antiapoptotických proteinů BCL-2 a XIAP (Xenopus Inhibitor of Apoptosis Protein) patřícího do rodiny inhibitorů apoptózy IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) a survivinu u lidských pupečnickových cévních endoteliálních buněk (HUVECs), což naznačuje, že tyto proteiny hrají důležitou roli v přežívání endoteliálních buněk.

PLC-gama katalyzuje hydrolýzu PIP-2 (Phosphatidylinositol-4,5-Bisfosfate), vzniká IP-3 (Inositol Triphosphate) a DAG (Diacylglycerol), které stimulují uvolnění vápenatých kationtů z vnitřního prostoru a aktivují PKC. VEGF-A stimulovaná mobilizace vápenatých kationtů se podílí na krátkodobé produkci oxidu dusnatého a prostaglandinu (Ptg).

Fosforylace SHC podporuje tvorbu SHC-GRB2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein-2) SOS komplexů a indukuje PKC závislou a Ras nezávislou indukci Raf-1-MEK-ERK1/2 dráhy v endoteliálních buňkách a HUVECs buňkách. Negativní zpětnou vazbu pro mitogenní účinky VEGF poskytuje cPLA2 (Cytosolic Phospholipase A2) a aktivace a biosyntéza prostaglandinu.

p38 dráha dopravuje VEGF signál do mikrofilament indukujících přestavby aktinového cytoskeletu a regulaci migrace endoteliálních buněk modulací aktivace MAPKAPK2/3 (MAP Kinase Activated Protein Kinase-2/3) a fosforylací polymerizačního modulátoru F-aktinu, HSP27 (Heat Shock Protein-27).

Aktivace FAK (Focal Adhesion Kinase) a paxilinu prostřednictvím navázání VEGF-A na VEGFR-2 v HUVECs buňkách vede k náboru aktin ukotvujících proteinů (Actin-Anchoring Proteins) jako jsou talin a vinkulin, na ústřední adhezní plak. Tyto proteiny jsou nezbytné pro VEGF-A vyvolanou reorganizaci aktinu (Matsumoto *et al.*, 2001; www.sabiosciences.com).



Obr. č. 3: Signální dráha VEGF vznikající v endoteliálních buňkách po stimulaci VEGFR-2 receptoru ligandy VEGF-A, VEGF-C a VEGF-D (upraveno dle www.sabioscience.com).

5 Protein tyrosin fosfatázový receptor typu J (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type J, PTPRJ)

Pro udržení správných signalizačních a kinetických specifíků RTKs (Receptor Tyrosin Kinases), které určují konečný biologický výsledek, je nutná těsná koordinace fosforylace a defosforylace receptoru. Kontrola signalizace závislé na tyrosin kinázách je částečně zprostředkována přes protein tyrosin fosfatázy (Protein Tyrosine Phosphatases, PTPs). Význam VEGFR-2 v angiogenezi je dobře znám, nicméně molekulární mechanismy jeho regulace, zvláště pak prostřednictvím PTPs, dosud ještě nebyly detailně prozkoumány (Chabot *et al.*, 2009).

PTPRJ (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type J), jinak taky známý jako DEP-1 (Density-Enhanced Phosphatase 1), PTP- η (Protein Tyrosine Phosphatase η) nebo CD148 (Cluster of Differentiation 148), je protein tyrosin fosfatázový receptor o velikosti 180 až 220 kDa, který je exprimován několika typy buněk zahrnujícími endoteliální, epiteliální či hematopoetické buňky (Honda *et al.*, 1994; Ostman *et al.*, 1994; Borges *et al.*, 1996; de la Fuente-Garcia *et al.*, 1998). Skládá se z extracelulární domény obsahující osm motivů fibronektinu typu III, transmembránové domény a jedné intracelulární katalytické domény (Ostman *et al.*, 1994).

5.1 Funkce PTPRJ v organismu, spojení s nádory

Původně bylo zaznamenáno, že hladina exprese PTPRJ se zvyšuje v závislosti na hustotě buněk, což naznačuje, že by mohl fungovat jako regulátor při kontaktní inhibici buněčného růstu (Ostman *et al.*, 1994). Bylo také prokázáno, že PTPRJ se podílí na regulaci diferenciaci buněk, inhibuje buněčný růst a proliferaci buněk, tudíž může hrát roli nádorového supresoru. To podporuje i fakt, že exprese PTPRJ je u některých nádorů výrazně redukována (Keane *et al.*, 1996; Trapasso *et al.*, 2000).

Ruivenkamp *et al.* v roce 2002 objevili, že PTPRJ souvisí s lokusem *Sccl*, který je spojován s kolorektálním karcinomem u myši a často je deletován nebo mutován také u lidských nádorů. Tento lokus byl poprvé identifikován na základě jeho segregace v souvislosti s citlivostí na rakovinu tlustého střeva po křížení dvou kmenů myši: rezistentních a citlivých k rakovině (Moen *et al.*, 1996). U karcinomu prsu, tlustého střeva, plic a štítné žlázy byla nalezena ztráta heterozygotnosti bez přítomnosti získaných mutací u zbývajících alely. Haploinsuficience PTPRJ by tudíž mohla být u člověka transformačním mechanismem. V závislosti na těchto studiích byly identifikovány různé alelické varianty

lidské PTPRJ, které mohly vést ke změnám PTPRJ proteinů lišících se v reziduích jejich extracelulární domény (Ruivenkamp *et al.*, 2002).

In vivo inaktivace katalytické aktivity DEP-1 narušuje správný vývoj cév, což vede ke zvýšení proliferace endoteliálních buněk a poškození remodelace a větvení cév (Takahashi *et al.*, 2003). Vzhledem k tomu, že VEGFR-2 je hlavním podporovatelem vývoje cév, dá se na základě těchto zjištění předpokládat, že dochází k jeho potenciálním interakcím s DEP-1. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že DEP-1, stejně jako VEGFR-2, je lokalizován na buněčných spojích endoteliálních buněk (Borges *et al.*, 1996; Carmeliet *et al.*, 1999b). V souvislosti s touto kolokalizací bylo prokázáno, že DEP-1 částečně reguluje VE-kadherinem zprostředkovanou kontaktní inhibici prostřednictvím defosforylace VEGFR-2 a inhibici aktivace extracelulární signál regulující kinázy 1/2 (Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2, ERK1/2) (Lampugnani *et al.*, 2003).

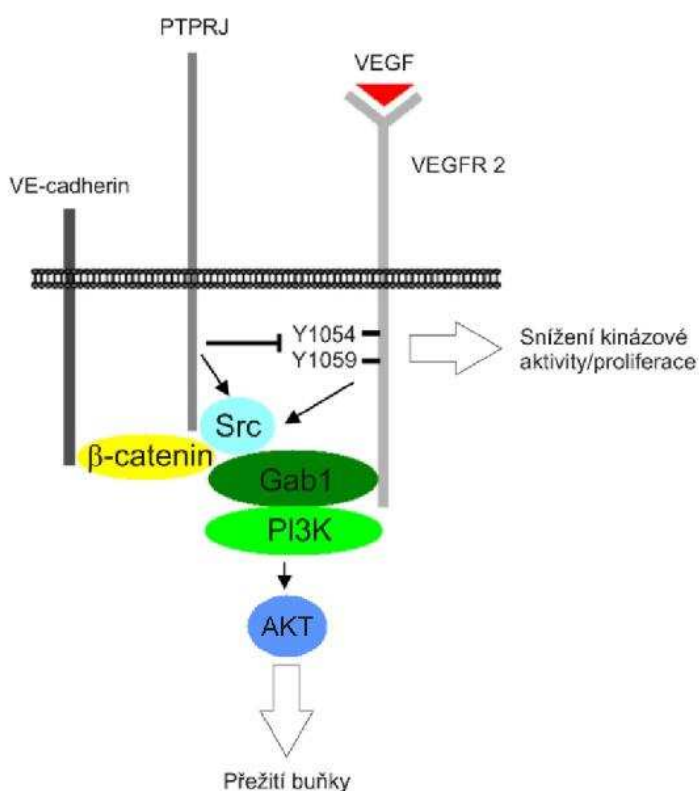
Navzdory těmto důležitým biologickým funkcím PTPRJ v endoteliálních buňkách *in vitro* i *in vivo* je málo znám funkční a mechanický princip, jakým PTPRJ reguluje fenotyp endoteliálních buněk. Řada studií na buněčných kulturách ukázala antagonistickou roli PTPRJ v signalizaci růstových faktorů prostřednictvím přímé defosforylace PDGFR, VEGFR a HGFR (Hepatocyte Growth Factor Receptor) (Kovalenko *et al.*, 2000; Lampugnani *et al.*, 2003; Palka *et al.*, 2003). Fyziologický význam těchto pozorování podpořil Berset *et al.* (2005) zjištěním, že delece homologu PTPRJ u *Caenorhabditis elegans* vede k hyperaktivaci EGFR signalizace a současně k fenotypovým změnám na EGFR závislého vývoje vulvy.

Analýza buněčného cyklu prokázala, že PTPRJ způsobuje zvýšení hladiny inhibitoru cyklin-dependentní kinázy p27^{Kip1} snížením rychlosti na proteazomu závislé degradace proteinu a tím podporuje zastavení růstu v G1 fázi (Trapasso *et al.*, 2000).

5.2 Regulace proliferace a přežívání buněk prostřednictvím PTPRJ

Cílem PTPRJ jsou tyrosiny Y1054/Y1059 v aktivační smyčce VEGFR-2 kinázy, které jsou defosforylovány a tím dochází k regulaci signální dráhy (Chabot *et al.*, 2009). Delece PTPRJ ve VEGF-stimulovaných konfluentních endoteliálních buňkách způsobuje zvýšení fosforylace VEGFR-2 receptoru a tudíž následné zvýšení proliferace (Lampugnani *et al.*, 2003). Utlumení PTPRJ v těchto buňkách vede ke zvýšené fosforylaci všech hlavních autofosforylačních míst VEGFR-2, ale má různý efekt na VEGF-indukovanou signální dráhu. V souladu s kinetikou byla u PTPRJ deletovaných buněk pozorována také upregulace fosforylace PLC, eNOS, ERK1/2 a p38, která souvisí se zvýšením fosforylace VEGFR-2. Překvapivé ovšem je, že fosforylace Akt byla u buněk ochuzených o PTPRJ trvale snížena. A kromě toho byla snížena i fosforylace substrátů Akt FOXO1/4, které jsou zapojeny do regulace přežívání buněk (Blanes *et al.*, 2009; Chabot *et al.*, 2009).

Akt je aktivován prostřednictvím regulační dráhy zakončené PI-3-K. Po navázání VEGF na VEGFR-2 receptor, dochází k aktivaci Src kinázy, jenž následně fosforyluje Gab1 asociovaný s PI-3-K (Dance *et al.*, 2006; Laramée *et al.*, 2007). Experimenty ukázaly, že PTPRJ funguje nejen jako mediátor VEGF-indukované fosforylace tyrosinu Gab1 a následné aktivace Akt v endoteliálních buňkách, ale také pozitivně reguluje schopnost Gab1 spojit se s komplexem VEGFR-2/VE-cadherin. Všechny tyto výsledky ukazují, že se PTPRJ prostřednictvím aktivace Akt dráhy podílí na podpoře VEGF a růstovými faktory zprostředkovaného přežívání buněk (Chabot *et al.*, 2009).



Obr. č. 4: Model regulace působení VEGF přes VEGFR-2 prostřednictvím PTPRJ. Expres PTPRJ zmírňuje kinázovou aktivitu VEGFR-2 a VEGF zprostředkovanou proliferaci endoteliálních buněk, ale zároveň pozitivně přispívá k náboru Gab1 do komplexu VEGFR-2/VE-cadherin, aktivaci Src a následné fosforylaci Gab1. To má za následek indukci asociace PI-3-K na Gab1, optimální aktivaci Akt a tudíž přežívání buněk v reakci na VEGF (upraveno dle Chabot *et al.*, 2009).

IV Experimentální část

1 Metodika

1.1 Vyšetření míry exprese LunX a c-met a analýza celkového přežití u souboru pacientů s karcinomem plic

K analýze celkového přežití pacientů vzhledem k expresi markerů c-met a LunX byla částečně využita data získaná při zpracování mé bakalářské práce. Soubor pacientů zkoumaný v rámci bakalářské práce byl rozšířen a získané výsledky byly následně statisticky vyhodnoceny.

1.1.1 Izolace RNA a reverzní transkripce

Stanovení genové exprese metodou reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) je založeno na izolaci RNA z buněk pacienta, reverzní transkripci a PCR analýze.

Materiál:

Izolace RNA: TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA), isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), chloroform a ethanol (Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE), DEPC Treated Water (Ambion, Austin, TX, USA), zkumavky Eppendorf 1,5 ml, 2 ml, epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE)

Reverzní transkripce: Random primers, RNAsin ribonuclease inhibitor, Deoxyribonucleotide triphosphates (vše Promega, Madison, WI, USA) (pozn.: připraveno jako 10 mM dNTPs ze 100 mM dCTP, dGTP, dTTP, dATP; příprava: 4 x 0,1 ml jednotlivých zásobních nukleotidů doplněno DEPC vodou do 1 ml), RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Vilnius, LI), 0,2 ml Thermo-Tube (ABgene, Epsom, UK), epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE)

Přístroje:

Laminární box (BioAir, EuroClone Group, Milano, IT), kombinovaná chladnička (Gorenje, Velenje, SI), vortex (Scientific Industries, Genie, NY, USA), minicentrifuga (Eppendorf, Hamburg, DE), termocyklér PTC100 (MJR), chlazená centrifuga (Hermle Labortechnik, Wehingen, DE), termoblok (Major Science, Saratoga, CA, USA), Nanodrop ND 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA), pipety (Eppendorf, Hamburg, DE).

Postup práce:

Vzorky krve a kostní dřeně o objemu 10 ml byly transportovány v EDTA a vzorky tkáně v RNA Later, který stabilizuje RNA a inhibuje RNázy. Následně byla provedena izolace RNA z cca 11 miliónů jaderných buněk krve nebo kostní dřeně a z 20-40 mg tkáně metodou dle Chomczynského (Chomczynski *et al.*, 1987) za použití komerční chemikálie TRI reagent (směs guanidinu thiokyanátu a fenolu). Koncentrace a čistota vyizolované RNA byla změřena pomocí přístroje NanoDrop.

Reverzní transkripce byla provedena z 3 µg vyizolované celkové RNA v reakčním objemu 30 µl za použití random primerů a H minus M-MuLV reverzní transkriptázy. Vzniklá cDNA byla použita pro Real-time PCR.

1.1.2 Real-time PCR

Real-time PCR je enzymatická reakce umožněná specifickými primery, fluorescenčně značenou TaqMan sondou a termostabilní DNA polymerázou s tzv. „HotStartem“, pro jejíž aktivaci je nutné 10 až 15 minutové zahřívání na 90-95 °C. Kvantifikace probíhá na základě kalibrační křivky vytvořené přidáním standardů k reakci.

1.1.2.1 Primery a próby

Primery i próba jsou krátké oligonukleotidy (o délce cca 20 bp). Primery vymezují amplifikovaný úsek DNA a próba umožňuje jeho detekci na základě fluorescenčního signálu. Jejich syntéza byla provedena firmou Generi Biotech, s.r.o. (Hradec Králové, CZ) na základě vlastního návrhu. Teplota nasedání primerů byla orientačně vypočítána z nukleotidového složení a následně experimentálně ověřena při optimalizaci amplifikačního cyklu.

Všechny primery a próby jsou dodávány v lyofilizovaném stavu. Primery jsou čištěny pomocí purifikační oligonukleotidové kazety (Oligonucleotide Purification Cartridge, OPC), próby pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Próba typu TaqMan je značena duálně za pomoci hexachlorofluoresceinu (HEX), který je zhašen quencherem BHQ1; na přístroji se zvolí kanál JOE nebo přímo excitační vlnová délka 530 nm a emisní vlnová délka 556 nm.

Plicní specifický X protein (LunX)

Pro určení exprese LunX mRNA byl navržen levý primer (forward; LunX-Fw) o délce 20 bp a pravý primer (reverse; LunX-Rev) také dlouhý 20 bp. Dále byla použita próba (LunX-P) o délce 24 bp.

Tab. 1: Sekvence a velikost primerů a próby, velikost produktu pro LunX

	Sekvence (5´- 3´)	Velikost (bp)
LunX-Fw	gatggccaccgtctctatgt	20
LunX-Rev	acagccagcctcaacagact	20
LunX-P	ccatccctctcggcataaagctcc	24
Produkt LunX		93

Protoonkogenní protein c-met

Pro určení exprese c-met mRNA byl navržen levý primer (c-met-Fw) o velikosti 20 bp a pravý primer (c-met-Rev) také o délce 20 bp. Próba c-met-P má velikost 26 bp.

Tab. 2: Sekvence a velikost primerů a próby, velikost produktu pro c-met

	Sekvence (5´- 3´)	Velikost (bp)
c-met-Fw	tggacaatgatggcaagaaa	20
c-met-Rev	gatgattccctcggtcagaa	20
c-met-P	tcactgtgctgtgaaatcctgaaca	26
Produkt c-met		99

1.1.2.2 Negativní kontrola, pozitivní kontrola, specifické standardy

V každé PCR reakci jsme současně se vzorky vyšetřovali také negativní a pozitivní kontrolu a diluční řadu specifických standardů.

Pro účely negativní kontroly byl do reakce namísto vzorku přidán 1 µl DEPC Treated Water.

Jako pozitivní kontrolu jsme použili cDNA získanou ze vzorku tkáně karcinomu plic ST 1615.

Pro absolutní kvantifikaci exprese LunX a c-met byly v práci použity diluční řady standardů (30-10⁶ kopií LunX, resp. c-met). Standardy byly tvořeny amplikony obsahujícími sekvenci LunX, resp. c-met vymezenou primery LunX Fw a LunX Rev, resp. c-met Fw a c-met Rev. Kvantifikace byla poté prováděna pomocí standardizační křivky těchto standardů.

1.1.2.3 Provedení Real-time PCR

cDNA získaná reverzní transkripcí byla amplifikována pomocí Real-time PCR za použití námi navržených primerů a prób. PCR byla provedena ze 100 ng cDNA v reakčním objemu 25 μ l.

Materiál

Specifické primery a TaqMan sondy (Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ), deoxyribonukleotid trifosfáty (Promega, Madison, WI, USA), Thermo-Start DNA Polymerase, $MgCl_2$, reakční pufr (ABgene, Epsom, UK), DEPC Treated Water (Ambion, Austin, TX, USA), 0,1 ml Tubes & Caps (Corbett-Research, Sydney, AU), epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE)

Přístroje

Skleněný PCR box, Biohazard box HERASAFE KS 18 (Thermo Scientific), kombinovaná chladnička (Gorenje, Valenje, SI), mrazák (Gorenje, Valenje, SI), vortex (LabNet, NJ, USA), minicentrifuga (Eppendorf, Hamburg, DE), real-time PCR termocyklér RotorGene 3000 (Corbett-Research, Sydney, AU)

Postup práce:

Nejprve byla připravena reakční směs (viz Tab. č. 3 a 4) za použití specifických primerů, TaqMan próby, $MgCl_2$, reakčního pufru, dNTPs, Thermo-Start DNA polymerázy a DEPC Treated Water. Směs byla rozpipetována do mikrozkušavek a byl do ní přidán buď 1 μ l vzorku cDNA, nebo 1 μ l standardů, pozitivní či negativní kontroly. Následně byly vzorky vloženy do termocykléru RotorGene, byla provedena automatická kalibrace snímání fluorescence a spuštěn příslušný program. Po ukončení teplotního cyklování byla provedena analýza Real-time PCR reakce.

Tab. 3: Složení reakční směsi (MasterMixu) pro LunX Real-time PCR, reakční objem 25 μ l

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace na reakci	Finální koncentrace
LunX-Fw	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
LunX-Rev	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
LunX-P	4 μ l	1,25 μ M	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 μ l	10 mM	5 nmol	200 μ M
Taq polymeráza	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg^{2+}	4 μ l	25 mM	100 nmol	4 mM
Pufr	2,5 μ l	10x	1x	1x
cDNA	1 μ l	0,1 μ g cDNA/ μ l	100 ng	4 ng/ μ l
H ₂ O	8,8 μ l	/	/	/

Průběh PCR reakce – cyklování pro LUNX:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA
96 °C / 15 minut
2. krok: amplifikace – dvoukroková – 50 cyklů
95 °C / 15 vteřin - 62 °C / 10 vteřin
snímání v kanálu JOE při 62 °C

Tab. 4: Složení reakční směsi (MasterMixu) pro c-met Real-time PCR, reakční objem 25 µl

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace na reakci	Finální koncentrace
c-met-Fw	2 µl	0,005 mM	10 pmol	400 nM
c-met-Rev	2 µl	0,005 mM	10 pmol	400 nM
c-met-P	4 µl	1,25 µM	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 µl	10 mM	5 nmol	200 µM
Taq polymeráza	0,2 µl	5 U/µl	1 U	0,04 U/µl
Mg ²⁺	6 µl	25 mM	150 nmol	6 mM
Pufr	2,5 µl	10x	1x	1x
cDNA	1 µl	0,1 µg cDNA/µl	100 ng	4 ng/µl
H ₂ O	6,8 µl	/	/	/

Průběh PCR reakce – cyklování pro c-met:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA
96 °C / 15 minut
2. krok: amplifikace – dvoukroková – 50 cyklů
95 °C / 15 vteřin - 58 °C / 15 vteřin
snímání v kanálu JOE při 58 °C

1.1.3 Pacienti

Do studie míry exprese markerů LunX a c-met bylo zařazeno 108 pacientů operovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc pro plicní karcinom klinického stádia I - III. U všech pacientů byl histologicky prokázán nemalobuněčný karcinom plic, žádný z pacientů nepodstoupil neoadjuvantní terapii. Klinická charakteristika pacientů je shrnuta v tabulce č. 5. Pro stanovení exprese markerů LunX a c-met byly pacientům při operaci odebrány vzorky kostní dřeně, systémové krve, krve z plicní žíly a tumoru

Všichni vyšetřovaní podepsali formulář informovaného souhlasu.

Tab. č. 5: Charakteristika celkového souboru pacientů zařazených do studie míry exprese markerů LunX a c-met

		n	Pohlaví (muži/ženy)	Průměrný věk (roky) (min;max)	Grading			Postižení uzlin	
					1	2	3	N0	N1+N2
Klinické stádium	I	57	39/18	67,0 (51;82)	4	15	26	57	0
	II	27	18/9	66,5 (54;79)	0	8	12	5	22
	III	24	18/6	63,9 (29/75)	0	7	12	0	24
Celkem		108	75/33	66,2 (29;82)	4	30	50	62	46

Do studie celkového přežití pacientů v závislosti na míře exprese markerů LunX a c-met bylo zahrnuto celkem 82 pacientů sledovaných po dobu delší než 1 rok. Ze zkoumaného souboru zemřelo 27 pacientů (32,9 %) a medián celkového přežití byl 19,8 měsíce.

Tab. č. 6: Charakteristika souboru pacientů zařazených do studie celkového přežití

		n	Pohlaví (muži/ženy)	Průměrný věk (roky) (min;max)	Grading			Postižení uzlin	
					1	2	3	N0	N1+N2
Klinické stádium	I	44	31/13	66,6 (51;82)	4	11	18	44	0
	II	21	14/7	66,2 (54;77)	0	6	8	3	18
	III	17	13/4	67,2 (53/75)	0	5	8	0	17
Celkem		82	58/24	66,6 (51;82)	4	22	34	47	35

1.2 Optimalizace markeru PTPRJ

Na základě proteomické studie provedené na Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci byl pro optimalizaci zvolen marker PTPRJ.

Materiál

Specifické primery a TaqMan sonda (Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ), deoxyribonukletotid trifosfáty (Promega, Madison, WI, USA), Thermo-Start DNA Polymerase, MgCl₂, reakční pufr (ABgene, Epsom, UK), DEPC Treated Water (Ambion, Austin, TX, USA), 0,1 ml Tubes & Caps (Corbett-Research, Sydney, AU), epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, DE), Agilent DNA LabChip (Agilent, Kalifornie, USA), Agilent DNA 1000 kit (Agilent, Kalifornie, USA)

Přístroje

Skleněný PCR box, Biohazard box HERASAFE KS 18 (Thermo Scientific), kombinovaná chladnička (Gorenje, Valenje, SI), mrazák (Gorenje, Valenje, SI), vortex (LabNet. NJ, USA),

minicentrifuga (Eppendorf, Hamburg, DE), real-time PCR termocyklér RotorGene (Corbett-Research, Sydney, AU), Agilent Bionalyzer 2100 (Agilent, Kalifornie, USA), priming station (Agilent, Kalifornie, USA), vortex pro čipy (IKA, Staufen, DE)

1.2.1 Primery a próba

Nejprve byla v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) vyhledána sekvence mRNA PTPRJ, podle níž byly navrženy primery a próba za použití programu PRIMER 3 (frodo.wi.mit.edu). Pro návrh primerů a próby byly nastaveny tyto parametry:

- Délka primerů: 18-25 bp
- Teplota tání (T_m): 57-63 °C
- Procentuální zastoupení GC bází: 30-60%
- Délka produktu: 80-200 bp

Specifita získaných sekvencí k sekvenci zkoumaného genu byla ověřena softwarem BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Pro ověření, zda-li primery netvoří vlásenkové struktury a vzájemně nehybridizují, byl použit software OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

Navržené oligonukleotidy byly syntetizovány firmou Generi Biotech, s.r.o. (Hradec Králové, CZ) a PCR reakce byla následně experimentálně optimalizována.

Tab. 7: Sekvence a velikost primerů a próby, velikost produktu pro PTPRJ

	Sekvence (5' - 3')	Velikost (bp)
PTPRJ-Fw	cattggaagccatgaggagt	20
PTPRJ-Rev	ccggcttctctctgtattgc	20
PTPRJ-P	gacttcaggtcaatatctcggg	22
Produkt PTPRJ		175

Nejprve byla optimalizována teplota a čas annealingu za použití obecného rozpisu reakční směsi. Byly testovány teploty 54, 56, 58, 60 a 62 °C a čas annealingu 15 a 10 s. Pro PCR reakci byly použity vzorky MRD 696 T 100x dil., ST 2050 5x dil., ST 1615 5x dil., MRD 726 T 5x dil. a MRD 846 T 10x dil., které jsou v laboratoři používány jako pozitivní kontroly. Po proběhnutí PCR reakce byly produkty elektroforeticky rozděleny s využitím DNA čipů a bioanalyzáru firmy Agilent.

Dle vyhodnocení PCR křivek a elektroforézy byl vybrán jako pozitivní kontrola pro další průběh optimalizace vzorek MRD 726 T 5x dil., zvolena teplota annealingu 60 °C a čas 10 s.

V dalším kroku byla optimalizována koncentrace Mg^{2+} iontů, kdy v průběhu jedné PCR reakce bylo testováno šest koncentrací Mg^{2+} : 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM a 6 mM. Na základě PCR reakce a elektroforézy byla vybrána koncentrace 3 mM.

Tab. č. 8: Výsledek optimalizace: složení reakční směsi (MasterMixu) PTPRJ Real-time PCR, reakční objem 25 μ l

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace na reakci	Finální koncentrace
PTPRJ-Fw	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
PTPRJ-Rev	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
PTPRJ-P	4 μ l	1,25 μ M	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 μ l	10 mM	5 nmol	200 μ M
Taq polymeráza	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg^{2+}	3 μ l	25 mM	75 nmol	3 mM
Pufr	2,5 μ l	10x	1x	1x
cDNA	1 μ l	0,1 μ g cDNA/ μ l	100 ng	4 ng/ μ l
H ₂ O	9,8 μ l	/	/	/

Průběh PCR reakce – cyklování pro PTPRJ:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA
96 °C / 15 minut
2. krok: amplifikace – dvoukroková
95 °C / 15 vte řin - 60 °C / 10 vte řin
snímání v kanálu JOE při 60 °C

1.2.2 Standardy

Pro vytvoření standardů byly navrženy (způsob navrhování viz. Kapitola 1.2.1 Primery a próba) a syntetizovány nové primery tzv. PTPRJ out, jejichž výsledný produkt zahrnoval sekvenci vymezenou původními primery PTPRJ. Próba zůstala stejná.

Tab. č. 9: Sekvence a velikost primerů a próby, velikost produktu pro PTPRJ out

	Sekvence (5´- 3´)	Velikost (bp)
PTPRJ-Fw out	tgtgaggaaggctgctctct	20
PTPRJ-Rev out	gagggactcatcatgcacag	20
PTPRJ-P	gacttcagggtcaatatctcggg	22
Produkt PTPRJ out		283

Nejprve byla opět optimalizována teplota a čas annealingu (60 °C, 30 s) a následně koncentrace Mg^{2+} (3 mM).

Tab. č. 10: Výsledek optimalizace: složení reakční směsi (MasterMixu) PTPRJ out Real-time PCR, reakční objem 25 μ l

Reagencie	Objem	Koncentrace	Koncentrace na reakci	Finální koncentrace
PTPRJ-Fw out	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
PTPRJ-Rev out	2 μ l	0,005 mM	10 pmol	400 nM
PTPRJ-P	4 μ l	1,25 μ M	5 pmol	200 nM
dNTPs	0,5 μ l	10 mM	5 nmol	200 μ M
Taq polymeráza	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
Mg²⁺	3 μ l	25 mM	75 nmol	3 mM
Pufr	2,5 μ l	10x	1x	1x
cDNA	1 μ l	0,1 μ g cDNA/ μ l	100 ng	4 ng/ μ l
H₂O	9,8 μ l	/	/	/

Průběh PCR reakce – cyklování pro PTPRJ out:

1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA
96 °C / 15 minut
2. krok: amplifikace – dvoukroková
95 °C / 15 vte řin - 60 °C / 30 vte řin
snímání v kanálu JOE při 60 °C

K amplifikaci standardů byla použita pozitivní kontrola MRD 726 T 5x dil. MasterMix byl připraven bez próby a reakce byla provedena v tripletu. Čistota amplifikovaných produktů byla ověřena elektroforézou na čípech Agilent. Všechny tři vzorky byly následně smíchány a pomocí NanoDropu byla změřena koncentrace DNA, na jejímž základě bylo spočítáno ředění standardů.

S naředěnými standardy byla provedena PCR reakce podle rozpisu v Tab. č. 8 a byly vybrány standardy vhodné pro vytvoření kalibrační křivky real-time PCR.

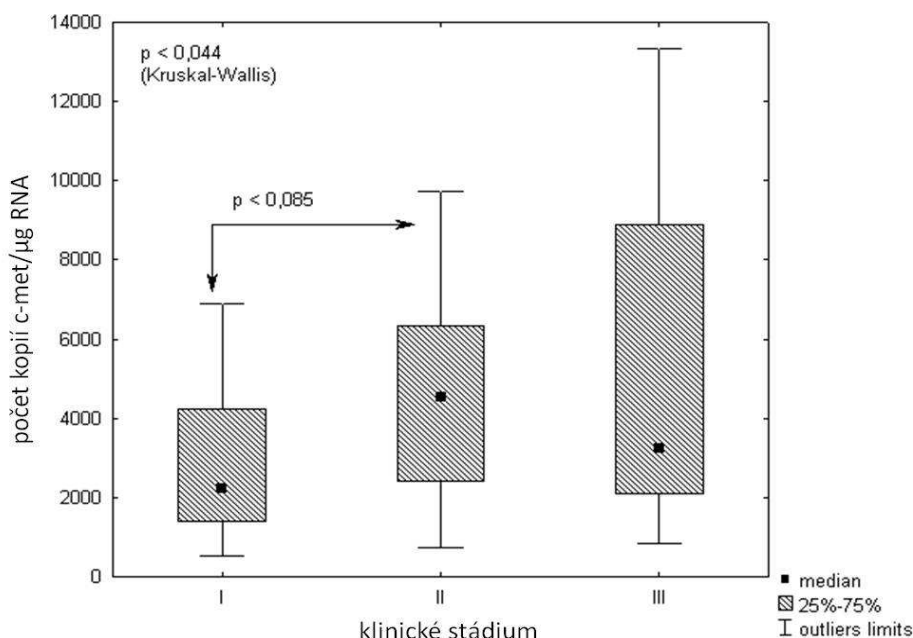
Expres PTPRJ byla poté vyšetřena u souboru vzorků negativních dárců krve a kostní dřeně a u souboru tumorů různého histogenetického původu. Dále byla stanovena exprese ve vybraných vzorcích pacientů s NSCLC.

2 Výsledky

2.1 Vyšetření míry exprese LunX a c-met u souboru pacientů s karcinomem plic

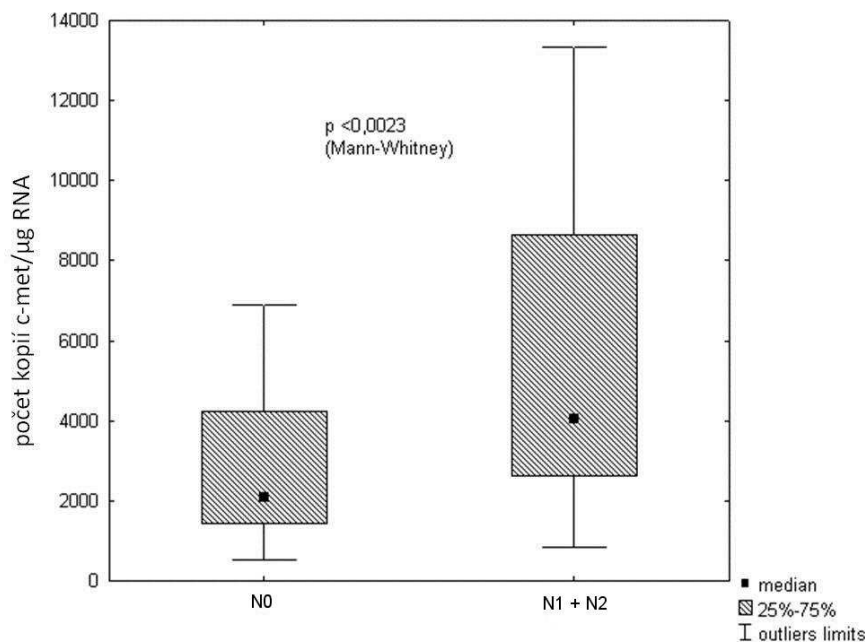
Ve vzorcích systémové krve, krve z plicní žíly a kostní dřeně jsme u 108 pacientů s karcinomem plic stanovili míru exprese markerů LunX a c-met (Tab. č. 5). Naměřené hodnoty exprese testovaných markerů byly korelovány s klinicko-patologickými charakteristikami.

Expresce markeru c-met byla statisticky významně závislá na klinickém stádiu nádoru. Nejvyšší rozdíl v expresi byl zaznamenán především mezi klinickým stádiem I a II, kdy u stádia II došlo k významnému zvýšení exprese c-met jak je patrné na Obr. č. 5.



Obr. č. 5: Expresce markeru c-met v krvi z plicní žíly v závislosti na klinickém stádiu nádoru

Dále jsme pozorovali statisticky významně vyšší míru exprese c-met v krvi pacientů s postižením lymfatických uzlin v porovnání s pacienty s histologicky negativními uzlinami (Obr. č. 6).



Obr. č. 6: Expresa markeru c-met v krvi z plicní v závislosti na postižení lymfatických uzlin

Statisticky významně vyšší míra exprese c-met ve vzorcích systémové krve a krve z plicní žíly byla pozorována u pacientů s postižením lymfatických uzlin oproti pacientům s histologicky negativními uzlinami, jak je patrné z Tab. č. 11.

Tab. č. 11: Pozitivita c-met v závislosti na postižení lymfatických uzlin

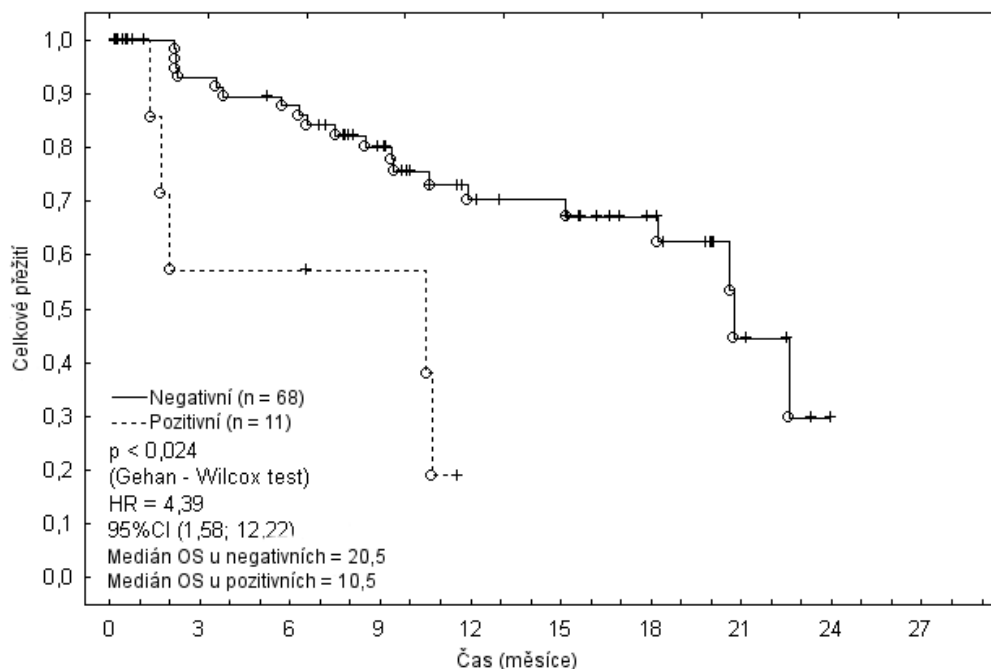
		Pozitivita c-met	
		v systémové krvi [% (pozitivní/celkem)]	v krvi z plicní žíly [% (pozitivní/celkem)]
postižení uzlin	N0	6,6 % (4/61)	10,7 % (6/56)
	N1 + N2	20,5 % (9/44)	26,8 % (11/41)
celkem		12,3 % (13/105)	17,5 % (17/97)
p-value		$p < 0,034$	$p < 0,04$

2.2 Celkové přežití pacientů v závislosti na expresi markeru c-met

Do analýzy celkového přežití (Overall Survival, OS) bylo z původního souboru 108 pacientů operovaných ve Fakultní nemocnici v Olomouci pro nemalobuněčný karcinom plic zahrnuto 82 pacientů (Tab. č. 6). Jednalo se o pacienty sledované po dobu delší než jeden rok. 27 pacientů (32,9 %) z tohoto souboru zemřelo, přičemž medián celkového přežití byl 19,8 měsíce.

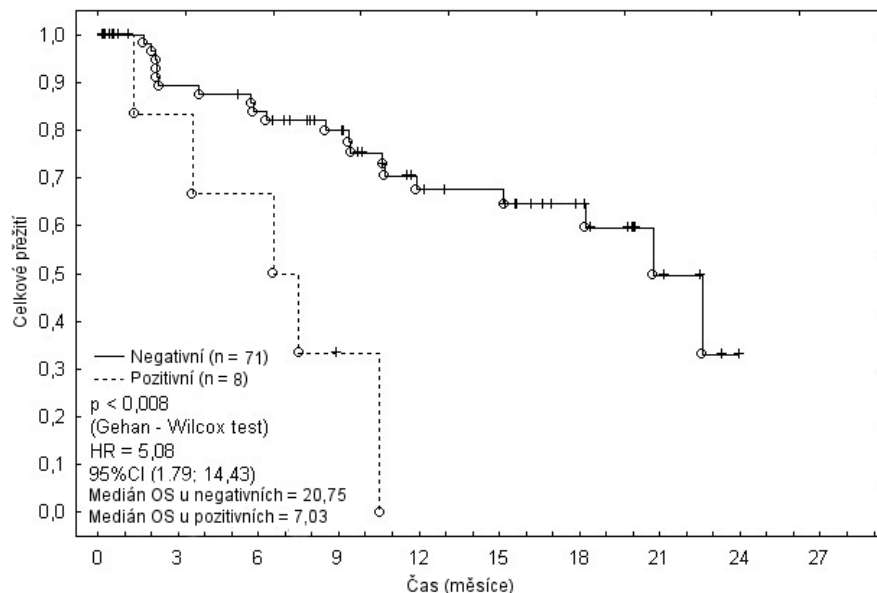
Podle předem stanovených cut-off hodnot pro expresi c-met v periferní krvi bylo 68 pacientů negativních a 11 pacientů pozitivních. Pacienti s pozitivitou c-met v periferní krvi vykazovali signifikantně kratší celkové přežití (medián přežití negativních pacientů byl 20,8

měsíce, pozitivních 10,5 měsíce; $p < 0,024$). Pozitivní pacienti mají 4,39 krát vyšší riziko úmrtí než negativní (HR = 4,39; 95% CI (1,58; 12,22)) (Obr. č. 7).



Obr. č. 7: Graf celkového přežití pacientů v závislosti na expresi c-met v periferní krvi pacientů (○ ukončení, + sledovaní pacienti)

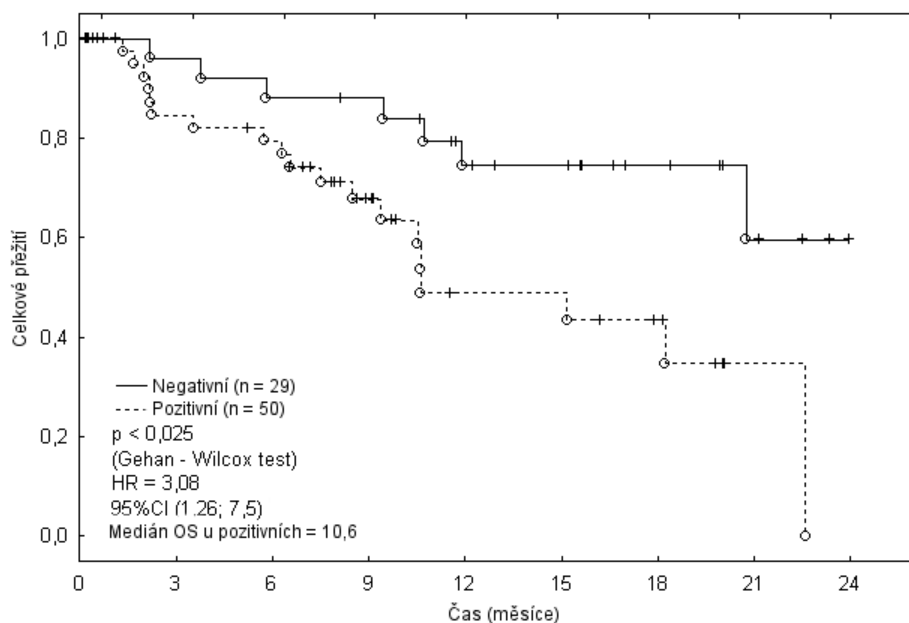
Podle cut-off hodnot stanovených pro expresi c-met v kostní dřeni bylo 71 pacientů hodnoceno jako negativní a 8 jako pozitivní. Pacienti s pozitivitou c-met v kostní dřeni také vykazovali signifikantně kratší celkové přežití (medián přežití negativních pacientů byl 20,75 měsíce, pozitivních 7,03 měsíce; $p < 0,008$). Pozitivní pacienti mají 5,08 krát vyšší riziko úmrtí než negativní (HR = 5,08; 95% CI (1,79; 14,43)) (Obr. č. 8).



Obr. č. 8: Graf celkového přežití pacientů v závislosti na expresi c-met ve vzorcích kostní dřeně (○ ukončení, + sledovaní pacienti)

Pomocí markeru c-met jsme identifikovali skupinu pacientů s kratším celkovým přežitím, což dokazuje negativní prognostický význam přítomnosti minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem plic.

Ve studii jsme sledovali, mimo v této práci zmíněných markerů c-met a LunX, také expresi markerů CEA a EGFR. Při analýze celkového přežití jsme kombinací vyšetření exprese markerů c-met a CEA v kostní dřeně pozorovali statisticky významně kratší celkové přežití u pacientů s pozitivitou c-met a/nebo CEA ($p < 0,025$; HR = 3,08; 95% CI (1,26; 7,5)) (Obr. č. 9).



Obr. č. 9: Graf celkového přežití pacientů v závislosti na expresi c-met a CEA ve vzorcích kostní dřeně (○ ukončení, + sledovaní pacienti)

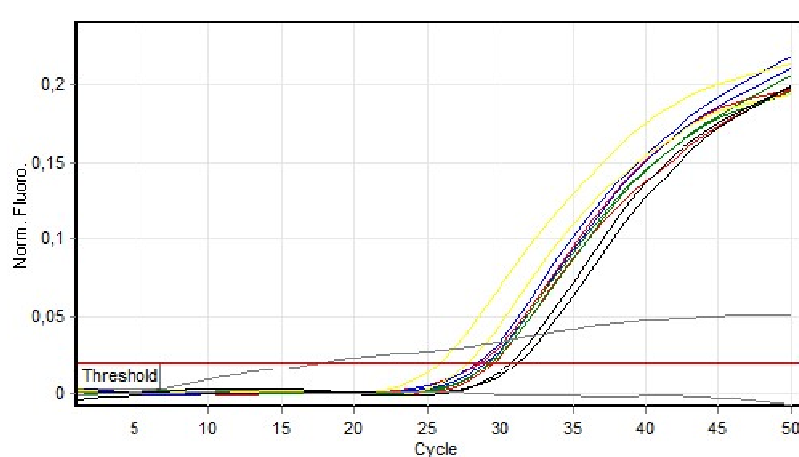
Ačkoliv se dle pilotních výsledků naší studie jevil marker LunX jako vhodný pro detekci MRD, aktuální výsledky toto nepotvrdily. Při statistických analýzách s využitím markeru LunX jsme nezaznamenali žádné signifikantní výsledky, exprese LunX tudíž dle naší studie nemá vliv na dobu přežití pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic.

2.3 Optimalizace markeru PTPRJ

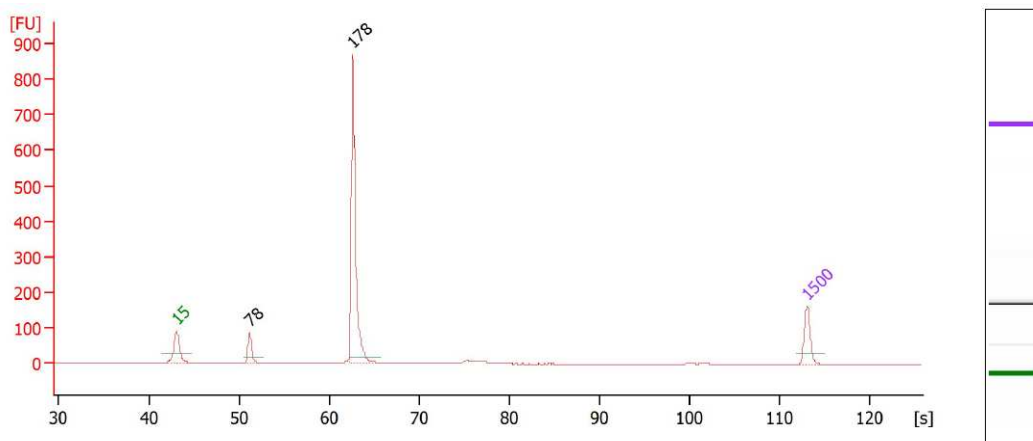
2.3.1 Optimalizace primerů PTPRJ

Nejprve jsme optimalizovali teplotu a čas annealingu za použití obecného rozpisu reakční směsi. Podle nukleotidového složení primerů jsme testovali teploty 54, 56 a 58 °C doporučené výrobcem a čas annealingu 15 a 10 s. Pro PCR reakci jsme použili vzorky MRD 696 T 100x dil, ST 2050 5x dil, ST 1615 5x dil, MRD 726 T 5x dil a MRD 846 T 10x dil, které jsou v laboratoři používány jako pozitivní kontroly. Po proběhnutí PCR reakce jsme produkty rozdělili pomocí elektroforézy na DNA čípech firmy Agilent.

Pro PCR reakci jsme vybrali teplotu 58 °C a čas annealingu 10 s, neboť za těchto podmínek vznikalo nejméně nespecifických produktů (viz Obr. č. 11). Jako pozitivní kontrolu pro další průběh optimalizace jsme vybrali vzorek MRD 726 T 5x dil., jenž měl nejnižší c_t hodnotu ($c_t = 26,8$ cyklu). C_t ostatních vzorků se pohybovaly kolem 29 cyklů a vzorek MRD 846 T 10x dil. dosáhl hodnoty 30,9 cyklu (viz Obr. č. 10).

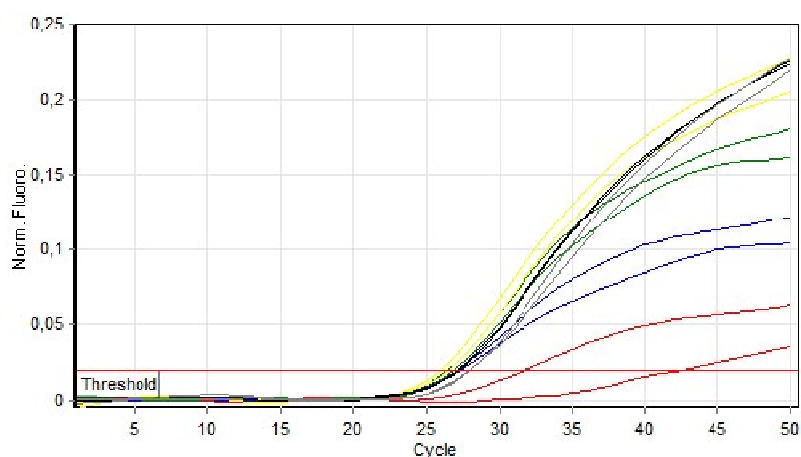


Obr. č. 10: Grafické znázornění real-time PCR s pozitivními kontrolami MRD 696 T 100x dil. ($c_t = 29,1$ cyklu; červená), ST 2050 5x dil. ($c_t = 28,7$ cyklu; modrá), ST 1615 5x dil. ($c_t = 29,3$ cyklu; zelená), MRD 726 T 5x dil. ($c_t = 26,8$ cyklu; žlutá) a MRD 846 T 10x dil. ($c_t = 30,9$ cyklu; černá), blank (šedá)

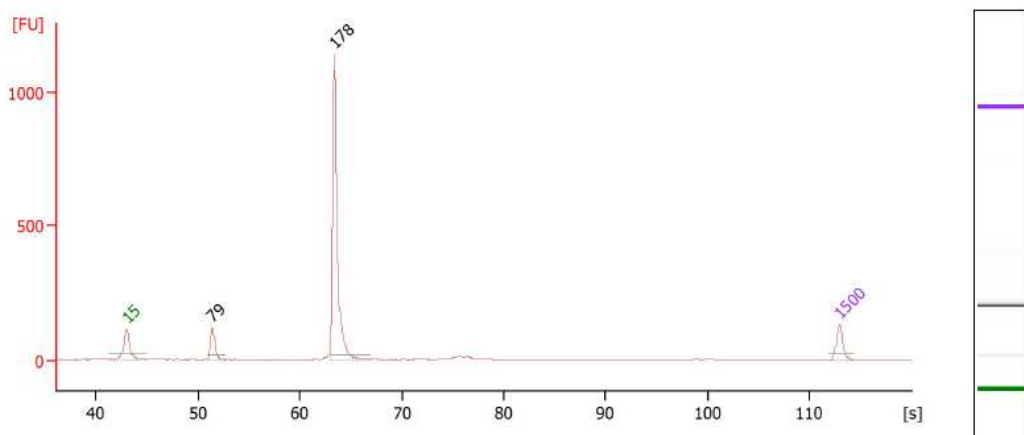


Obr. č. 11: Grafické znázornění rozdělení produktů real-time PCR (teplota annealingu 58 °C, čas 10 s, koncentrace Mg^{2+} = 3 mM) pomocí elektroforézy na DNA čípech firmy Agilent. PCR produkt: velikost = 178 bp, $c = 16,43$ ng/ μ l; nespecifický produkt: velikost = 78 bp, $c = 2,00$ ng/ μ l; spodní marker: velikost = 15 bp, horní marker: velikost = 1500 bp

V dalším kroku jsme optimalizovali koncentrace Mg^{2+} iontů, kdy v průběhu jedné PCR reakce bylo otestováno šest koncentrací Mg^{2+} : 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM a 6 mM. Na základě PCR reakce a elektroforézy jsme vybrali koncentraci 3 mM, která ze všech zkoumaných koncentrací vykazovala nejvhodnější hodnotu c_t (viz Obr. č. 12) a nejméně nespecifických produktů (viz Obr. č. 13).

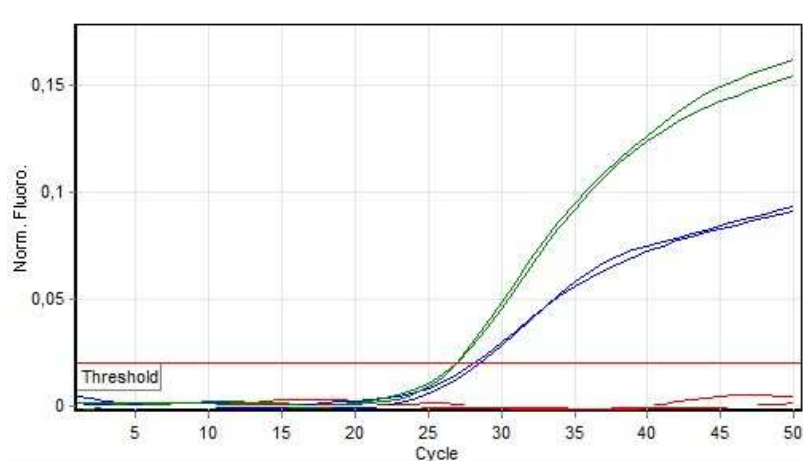


Obr. č. 12: Grafické znázornění real-time PCR pro optimalizaci koncentrace Mg^{2+} : 1 mM (c_t = 37,1 cyklu; červená), 2 mM (c_t = 27,3 cyklu; modrá), 3 mM (c_t = 26,7 cyklu; zelená), 4 mM (c_t = 26,3 cyklu; žlutá), 5 mM (c_t = 27,2 cyklu; černá) a 6 mM (c_t = 28,1 cyklu; šedá)

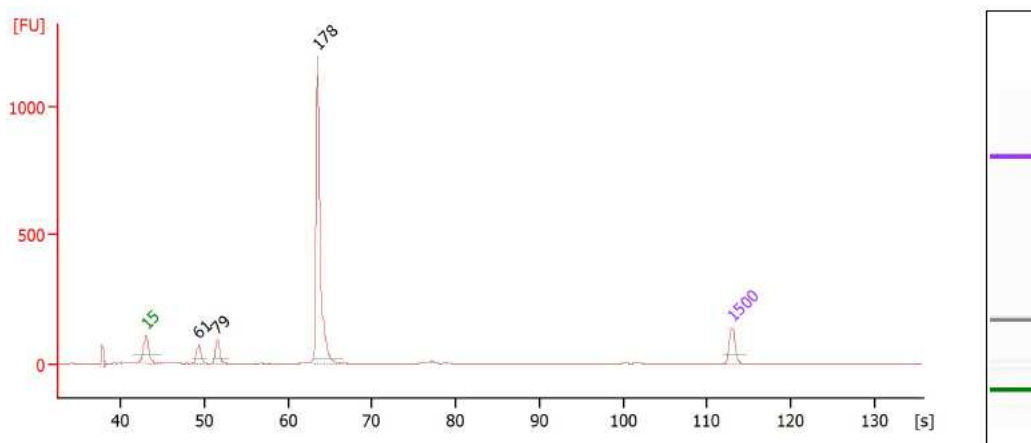


Obr. č. 13: Grafické znázornění rozdělení produktů real-time PCR (koncentrace Mg^{2+} = 3 mM) pomocí elektroforézy na DNA čípech firmy Agilent. PCR produkt: velikost = 178 bp, $c = 26,94 \text{ ng}/\mu\text{l}$; nespecifický produkt: velikost = 79 bp, $c = 3,21 \text{ ng}/\mu\text{l}$; spodní marker: velikost = 15 bp, horní marker: velikost = 1500 bp

Pro ověření jsme vyzkoušeli provést PCR reakci ještě při 60 a 62 °C s koncentracemi Mg^{2+} 1 mM, 2 mM a 3 mM. Na základě toho jsme nakonec vybrali teplotu 60 °C, neboť při této teplotě byl výsledný produkt stejné kvality jako při 58 °C, nicméně teplota kolem 60 °C je pro real-time PCR vhodnější, protože umožňuje vyšší specifičnost navázání primerů.



Obr. č. 14: Grafické znázornění real-time PCR pro teplotu annealingu 60 °C a koncentraci Mg^{2+} 1 mM ($c_t = 0$ cyklu, červená), 2 mM ($c_t = 28,4$ cyklu, modrá), 3 mM ($c_t = 26,9$ cyklu)



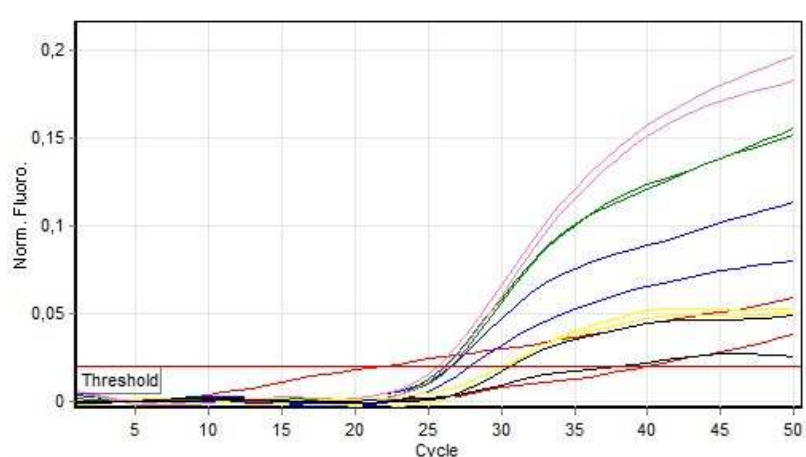
Obr. č. 15: Grafické znázornění rozdělení produktů real-time PCR při teplotě annealingu 60 °C (koncentrace Mg^{2+} = 3 mM) pomocí elektroforézy na DNA čípech firmy Agilent. PCR produkt: velikost = 178 bp, c = 27,66 ng/ μ l; 1. nespecifický produkt: velikost = 61 bp, c = 2,22 ng/ μ l; 2. nespecifický produkt: velikost = 79 bp, c = 2,44 ng/ μ l; spodní marker: velikost = 15 bp, horní marker: velikost = 1500 bp

2.3.2 Standardy

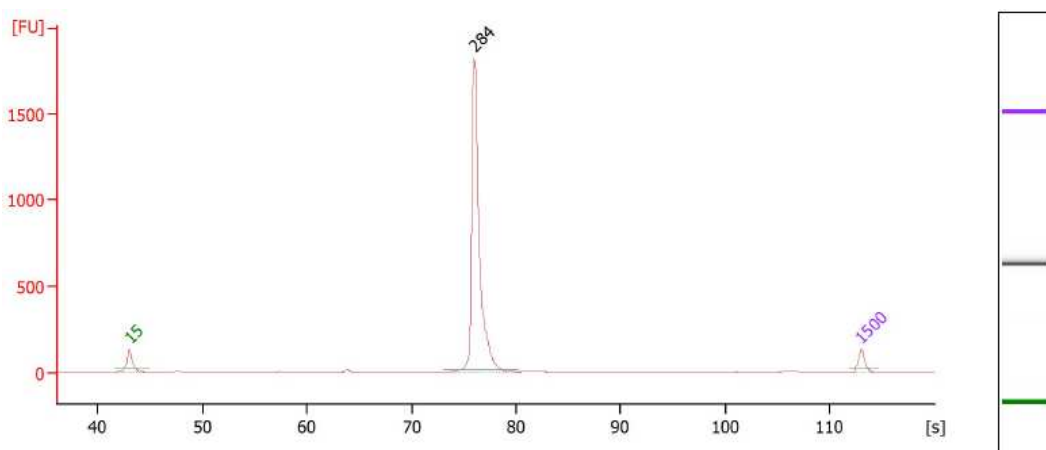
Pro přípravu standardů jsme navrhli nové primery, tzv. outer primery, PTPRJ out, jejichž výsledný produkt zahrnoval sekvenci vymezenou původními primery PTPRJ.

Nejprve jsme opět optimalizovali teplotu a čas annealingu, podle hodnoty c_t (25,9 cyklu) a množství nespecifických produktů jsme vybrali teplotu 60 °C a čas 30 s.

Následně jsme optimalizovali koncentraci Mg^{2+} . Zvolili jsme koncentraci 3 mM, která sice neměla nejnižší hodnotu c_t (26,3 cyklu) jak je patrné na Obr. č. 16, ale po elektroforetickém rozdělení pomocí čipu Agilent nebyl zjištěn žádný nespecifický produkt (viz Obr. č. 17). Při použití koncentrace Mg^{2+} = 4 mM byla c_t hodnota PCR reakce o něco nižší (c_t = 25,9 cyklu), ale vedle specifického produktu PTPRJ obsahovala směs také krátký nespecifický produkt.



Obr. č. 16: Grafické znázornění real-time PCR pro různé koncentrace Mg^{2+} při optimalizaci reakce pro přípravu standardů. Koncentrace Mg^{2+} : 1 mM ($c_t = 30,9$; červená), 2 mM ($c_t = 27,2$; modrá), 3 mM ($c_t = 26,3$; zelená), 4 mM ($c_t = 25,9$; růžová), 5 mM ($c_t = 30,3$; žlutá), 6 mM ($c_t = 34,4$; černá)

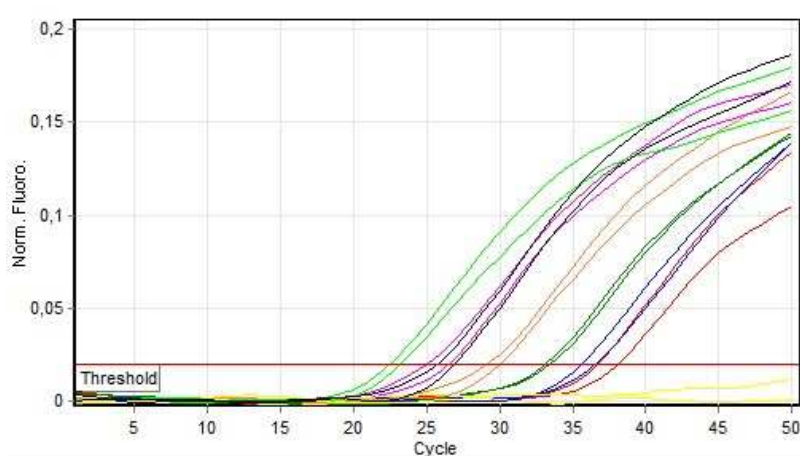


Obr. č. 17: Grafické znázornění rozdělení produktů optimalizace real-time PCR (teplota annealingu = $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, koncentrace $Mg^{2+} = 3\text{ mM}$) pro vytvoření standardů pomocí elektroforézy na DNA čípech firmy Agilent. PCR produkt: velikost = 284 bp, $c = 47,05\text{ ng}/\mu\text{l}$; spodní marker: velikost = 15 bp, horní marker: velikost = 1500 bp

K amplifikaci standardů jsme použili pozitivní kontrolu MRD 726 T 5x dil.. Reakci jsme provedli v tripletu. Čistotu amplifikovaných produktů jsme ověřili elektroforézou na čípech Agilent. Všechny tři vzorky jsme následně smíchali a pomocí NanoDropu jsme změřili koncentraci DNA ($c = 324,27\text{ ng}/\mu\text{l}$). Z této koncentrace jsme spočítali počet částic v 1 μl ($n = 1,3429 \cdot 10^{12}$) a ředění standardů, tak abychom měli $1 \cdot 10^{11}$ částic v 500 μl . Z tohoto

zásobního roztoku standardů jsme postupným ředěním vytvořili diluční řadu od $n = 1 \cdot 10^{10}$ po $n = 30$.

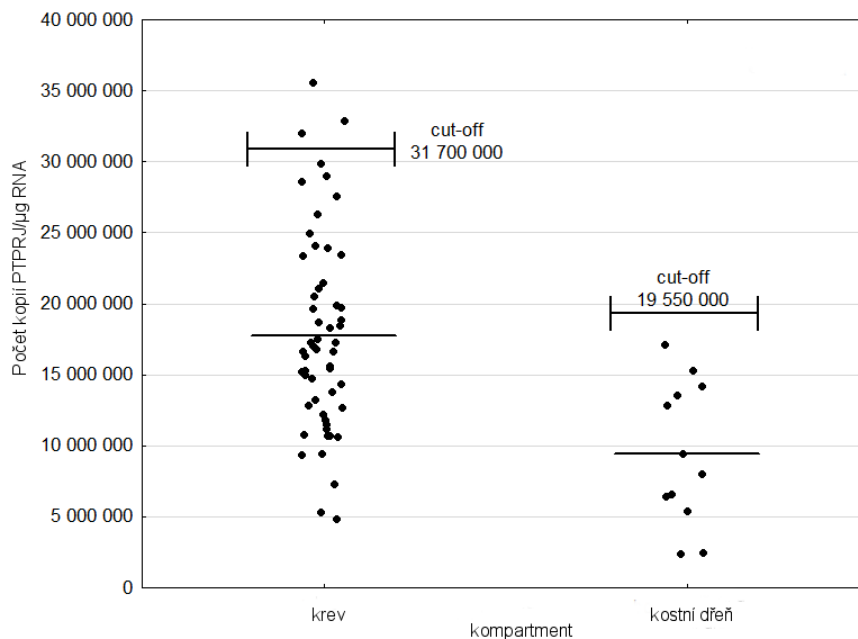
S naředěnými standardy jsme provedli PCR reakce podle rozpisu v Tab. č. 8 a vybrali 6 standardů vhodných pro vytvoření kalibrační křivky real-time PCR.



Obr. č. 18: Grafické znázornění real-time PCR s 6 vybranými standardy o počtech částic 30 (červená), $1 \cdot 10^2$ (modrá), $1 \cdot 10^3$ (tmavě zelená), $1 \cdot 10^4$ (oranžová), $1 \cdot 10^5$ (růžová), $1 \cdot 10^6$ (světle zelená), pozitivní kontrola MRD 726 T 5x dil. (černá), blank (žlutá)

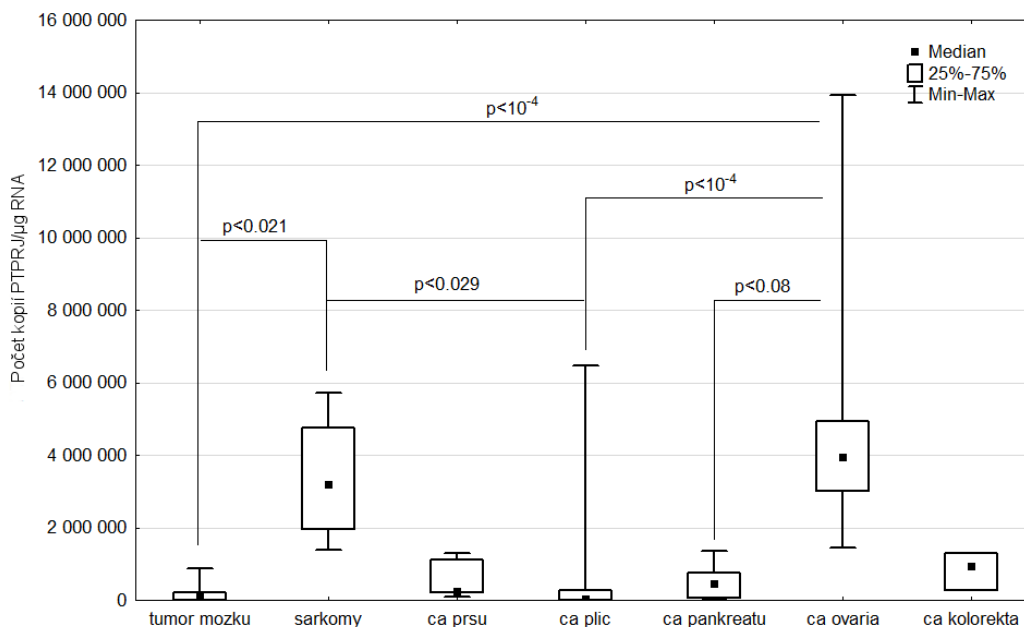
2.3.3 Vyšetření míry exprese PTPRJ u souboru zdravých dárců krve a kostní dřeně, u souboru vzorků tumorů různého histogenetického původu a u souboru pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic

Míra exprese PTPRJ byla následně vyšetřena u vzorků systémové krve ($n = 58$ dárců) a kostní dřeně ($n = 12$ dárců) od pacientů s nenádorovým a neznámým onemocněním. Na základě míry exprese PTPRJ v souboru zdravých dárců krve a kostní dřeně byly stanoveny cut-off hodnoty (cut-off hodnota = průměrná exprese + 2 směrodatné odchylky). Míra exprese PTPRJ v krvi byla výrazně vyšší, než v kostní dřeni (viz Obr. č. 19).



Obr. č. 19: Grafické znázornění stanovení cut-off hodnot pro PTPRJ v krvi a kostní dřeni (- průměrná exprese, cut-off hodnota = průměrná exprese + 2 SD)

Dále bylo pro stanovení specifity markeru PTPRJ vyšetřeno 70 vzorků tumorů různého histogenetického původu. Z Obr. č. 20 je zřejmé, že PTPRJ nevykazuje specifitu ke karcinomu plic ani k jiné skupině vyšetřených tumorů. Nejnižší míra exprese byla pozorována u tumorů mozku, dále pak u karcinomů prsu, plic, pankreatu a kolorekta. U sarkomů a karcinomu ovaria byla exprese v porovnání s ostatními nádory signifikantně vyšší.



Obr. č. 20: Grafické znázornění míry exprese PTPRJ v tumorech různého histogenetického původu

Nakonec jsme provedli stanovení exprese PTPRJ markeru u skupiny vzorků od pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (n = 19 vzorků).

Z výše uvedených výsledků je patrné, že exprese PTPRJ ve vzorcích tumorů je výrazně nižší než jeho exprese ve vzorcích krve a kostní dřeně zdravých dárců. Při vyšetření skupiny pacientů s NSCLC jsme nepozorovali statisticky významný rozdíl míry exprese v krvi a kostní dřeni oproti skupině zdravých dárců. Tato fakta zabraňují zavedení PTPRJ do panelu markerů k vyšetření přítomnosti CTCs. Dle naší studie není PTPRJ vhodným markerem k detekci MRD u karcinomu plic.

V Diskuse

Minimální reziduální choroba byla nejprve zkoumána u hematologických malignit, postupem času začala být diagnostika MRD využívána také u solidních nádorů, např. karcinomu kolorekta, prsu a pankreatu. Jak prokázali Braun *et al.* (2001) detekce minimální reziduální choroby v kostní dřeni pacientek s karcinomem prsu může přispět k přesnějšímu odhadu prognózy nemocné. Podobně v roce 2010 Srovnal *et al.* zjistili statisticky významnou závislost mezi mírou exprese EGFR v portální krvi a klinickým stádiem karcinomu pankreatu.

V současné době existuje několik různých metod používaných pro diagnostiku MRD. Mezi velmi populární patří moderní techniky přímého záchytu nádorových buněk z krve pacienta za použití protilátek proti povrchovým antigenům cirkulujících nádorových buněk, např. CellSearch System, průtoková cytometrie a *In Vivo* CellCollector. V naší laboratoři používáme metodu nepřímé detekce pomocí real-time RT-PCR, která je jednou z nejcitlivějších a nejspolehlivějších. Také proto je real-time RT-PCR stále považována za „zlatý standard“ ve vyšetření přítomnosti MRD a i když není jejím prostřednictvím možné cirkulující nádorové buňky izolovat a dále analyzovat, přináší důležitý příspěvek především ke klinickému významu MRD. Aktuálně tak stále zůstává hledání nových specifických markerů umožňujících citlivou detekci a diagnostiku MRD.

V předložené studii jsme se zabývali detekcí MRD s využitím markerů LunX a c-met a vztahu jejich exprese k celkovému přežití pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic.

Nejprve se jako vhodný potenciální marker pro diagnostiku MRD u NSCLC jevil LunX, jehož exprese byla závislá na klinickém stádiu nádoru a který byl vysoce specificky exprimován u plicního karcinomu. Tyto poznatky také korespondují se studií publikovanou skupinou Cheng *et al.* v roce 2008. Po vyhodnocení analýzy celkového přežití pacientů však nebyl zjištěn žádný statisticky významný vztah mezi mírou exprese LunX a přežitím pacientů. LunX tak není dle naší studie vhodným diagnostickým markerem MRD u pacientů s karcinomem plic.

Analýzy druhého testovaného markeru přinesly slibnější výsledky. Prokázali jsme závislost exprese c-met na stupni postižení lymfatických uzlin, kdy míra exprese c-met u pacientů s metastatickým postižením uzlin byla statisticky významně vyšší, než u pacientů s histologicky negativními uzlinami.

Lo Muzio *et al.* (2006) prokázali, že míra exprese c-met u karcinomu hlavy a krku má negativní vliv na celkové přežití pacientů. V naší studii jsme prokázali negativní vztah exprese c-met k celkovému přežití pacientů s NSCLC. Pacienti s pozitivitou c-met v krvi a kostní dřeni vykazovali signifikantně kratší celkové přežití než pacienti negativní. c-met je tak dle našich výsledků vhodným markerem pro diagnostiku MRD u karcinomu plic za použití Real-time RT-PCR. Citlivost stanovení přítomnosti MRD může být zvýšena využitím

kombinace c-met s jinými markery. Podobně jako ve studii Sheu *et al.* (2006) jsme pozorovali vyšší citlivost detekce při využití kombinace markerů c-met a CEA.

Ve druhé části své diplomové práce jsem se zabývala optimalizací nového markeru pro diagnostiku NSCLC. Na základě proteomické studie provedené na Ústavu molekulární a translační medicíny byl jako zajímavý potenciální diagnostický marker zvolen PTPRJ. Také některé další studie svým tvrzením podpořily možnost využití PTPRJ jako diagnostického markeru. Například Ruivenkamp *et al.* (2002) ve své studii uvádí, že se PTPRJ podílí na vzniku karcinomu plic, prsu a kolorektálního karcinomu a zároveň, že myší ortholog PTPRJ byl identifikován jako kandidátní gen pro lokus zvýšené citlivosti ke karcinomu tlustého střeva (*Sccl*) u myší. Podle Chabot *et al.* (2009) PTPRJ ovlivňuje fosforylaci VEGFR-2, a tudíž růst a vývoj cév, okysličení nádoru, jeho zásobení živinami a možnost šíření nádorových buněk krevním řečištěm do těla pacienta.

Jelikož delece PTPRJ ve VEGF stimulovaných buňkách vede ke zvýšení fosforylace VEGFR-2 (Chabot *et al.*, 2009) dalo se předpokládat, že v nádorových buňkách dojde ke snížení exprese PTPRJ oproti buňkám normálním. Výrazné snížení exprese jsme v naší studii pozorovali ve vzorcích nádorové tkáně u všech typů testovaných karcinomů. Ve vzorcích krve negativních dárců a krve pacientů s karcinomem plic byla exprese PTPRJ značně vysoká, nebyl však pozorován žádný statisticky významný rozdíl mezi těmito skupinami.

Vysoká exprese ve vzorcích krve je nejspíš způsobena přítomností PTPRJ ve všech hematopoetických buňkách. Podle de la Fuente-Garcia *et al.* (1998) je PTPRJ s vysokou intenzitou exprimován u granulocytů. U monocytů a lymfocytů je exprese o něco nižší. Přesto, že je PTPRJ přítomen na všech lymfocytech v periferní krvi, bývá špatně exprimován u T a B lymfoidních buněčných linií.

Vysoká exprese PTPRJ pocházející z hematopoetických buněk mohla zastínit expresi PTPRJ v buňkách nádorových. Dle naší studie tak PTPRJ není vhodným markerem pro diagnostiku cirkulujících nádorových buněk z krve. Cílem naší další práce bude prověřit možnost vlivu exprese PTPRJ v nádorové tkáni primárního tumoru na riziko vzniku metastáz.

VI Závěr

V diplomové práci jsem se zaměřila na detekci minimální reziduální choroby u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic metodou real-time reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce. Cílem práce bylo zaprvé navázat na bakalářskou práci, rozšířit soubor pacientů vyšetřených na expresi markerů LunX a c-met a zjistit vztah míry exprese těchto markerů k celkovému přežití pacientů. Druhým cílem bylo najít a zoptimalizovat nový potenciální marker a ověřit jeho vhodnost pro detekci MRD u NSCLC.

Provedli jsme korelaci exprese markerů LunX a c-met s klinicko-patologickými daty v souboru 108 pacientů s karcinomem plic. Zaznamenali jsme statisticky významnou závislost mezi mírou exprese c-met v krvi z plicní žíly a klinickým stádiem. Významně vyšší byla také pozitivita c-met v periferní krvi a v krvi z plicní žíly u pacientů s postižením lymfatických uzlin, na rozdíl od pacientů s histologicky negativními uzlinami.

U souboru 82 pacientů jsme prokázali statisticky významnou závislost celkového přežití na míře exprese markeru c-met. Pacienti s pozitivitou c-met v periferní krvi a kostní dřeni vykazovali kratší dobu přežití, než pacienti negativní. Dále jsme prokázali vyšší citlivost stanovení přítomnosti MRD s využitím kombinace markerů c-met a CEA.

V případě markeru LunX nebyla prokázána statisticky významná závislost celkového přežití pacientů na míře jeho exprese.

Dále jsme navrhli a zoptimalizovali real-time RT-PCR pro nový marker PTPRJ. Otestovali jsme jeho expresi u vzorků krve a kostní dřene zdravých dárců, pacientů s karcinomem plic a vzorků tumorů různého histogenetického původu. Zjistili jsme sníženou expresi PTPRJ ve vzorcích tkáně tumorů a vysokou expresi ve vzorcích krve a kostní dřene. Neprokázali jsme žádný statisticky významný rozdíl mezi expresí PTPRJ ve vzorcích krve a kostní dřene zdravých dárců a pacientů s karcinomem plic. Marker PTPRJ proto není dle naší studie vhodný pro detekci MRD z krve a kostní dřene u pacientů s NSCLC.

VII Seznam použité literatury

American Cancer Society: <www.cancer.org> [cit. 8. 11. 2013]

Asahara T. - Kalka C. - Isner J.M. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Therapy*, 2000, 7: 451–457.

Ballestrero A. - Garuti A. - Bertolotto M. et al. Effect of different cytokines on mammaglobin and maspin gene expression in normal leukocytes possible relevance to the assays for the detection of micrometastatic breast cancer. *British Journal of Cancer*, 2005, 92: 1948-1952.

Bellon S.F. - Kaplan-Lefko P. - Yang Y. et al. c-Met inhibitors with novel binding mode show activity against several hereditary papillary renal cell carcinoma-related mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 2675–2683.

Berset T.A. – Hoier E.F. – Hajnal A. The *C. elegans* homolog of the mammalian tumor suppressor Dep-1/Sccl inhibits EGFR signaling to regulate binary cell fate decisions. *Genes and Development*, 2005, 19: 1328-1340.

Bieche I. - Olivi M. - Champeme M.H. et al. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 1998, 78: 661-666.

Blair D.G. – Cooper C.S. – Oskarsson M.K. et al. New method for detecting cellular transforming genes. *Science*, 1982, 218: 1122-1125.

Blanes M.G. – Oubaha M. – Rautureau Y. et al. Phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2 is necessary for AKT-dependent eNOS activation and nitric oxide release from endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 10660-10669.

Borges L.G. - Seifert R.A. - Grant F.J. et al. Cloning and characterization of rat density-enhanced phosphatase-1, a protein tyrosine phosphatase expressed by vascular cells. *Circulation Research*, 1996, 79: 570-580.

Bouck N. - Stellmach V. - Hsu S.C. How tumors become angiogenic. *Advances in Cancer Research*, 1996, 69: 135–174.

Brattström D. - Bergqvist M. - Hesselius P. et al. Elevated preoperative serum levels of angiogenic cytokines correlate to larger primary tumours and poorer survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 2002, 37: 57-63.

Braun S. and Pantel K. Clinical significance of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients. *The Oncologist*, 2001, 6: 125-132.

Brock T.A. – Dvorak H.F. – Senger D.R. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *American Journal of Pathology*, 1991, 138: 213-221.

Burgess T. - Coxon A. - Meyer S. et al. Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-met-dependent human tumors. *Cancer Research*, 2006, 66: 1721-1729.

Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000, 25: 169-193.

Carmeliet P. - Dor Y. - Herbert J.M. et al. Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 1998, 394: 485–90.

Carmeliet P. – Lampugnani M.G. – Moons L. et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 1999(b), 98: 147-157.

Carmeliet P. and Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407: 249–257.

Carmeliet P. Controlling the cellular brakes. *Nature*, 1999 (a), 401: 657–658.

Cell Search Circulating Tumor Cells Test: <www.cellsearchctc.com> [cit. 9. 1. 2014]

Clauss M. – Weich H. – Breier G. et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 17629-17634.

Connolly D.T. - Heuvelman D.M. - Nelson R. et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 1989, 84: 1470–1478.

Cooper C.S. – Park M. – Blair D.G. et al. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*, 1984, 311: 29-34.

Cox G. – Jones J.L. - Walker R.A. et al. Angiogenesis and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2000, 27: 81-100.

Dance M. – Montagner A. – Yart A. et al. The adaptor protein Gab1 couples the stimulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 to the activation of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 23285-23295.

de la Fuente-Garcia M.A. – Nicolas J.M. – Freed J.H. et al. CD148 is a membrane protein tyrosine phosphatase present in all hematopoietic lineages and is involved in signal transduction on lymphocytes. *Blood*, 1998, 91: 2800-2809.

De Vries C. – Escobedo J.A. – Ueno H. et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 1992, 255: 989-991.

Dias S. – Choy M. – Alitalo K. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)–C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood*, 2002, 99: 2179-2184.

Ferrara N. – Gerber H.P. – LeCounter J. The Biology of VEGF and Its Receptors. *Nature Medicine*, 2003, 9: 669-676.

Ferrara N. - Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature Medicine*, 1999, 5: 1359–1364.

Folkman J. – Hahnfeltd P. - Hlatky L. Cancer: looking outside the genome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2000, 1: 76-79.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1995, 1: 27–31.

Folkman J. Tumor angiogenesis therapeutical implications. *The New England Journal of Medicine*, 1971, 285: 1182-1186.

Ge M. J. - Shi D. - Wu Q. C. et al. Observation of circulating tumour cells in patient with non-small cell lung cancer by real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction in peroperative period. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2006, 132: 248-256.

Gerber H.P. – Condorelli F. – Park J. et al. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 23659-23667.

Gerber H.P. – McMurtrey A. – Kowalski J. et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 30336-30343.

Gershard M. - Juhl H. - Kalthoff H. et al. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumour cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Oncology*, 1994, 12: 725-729.

Giatromanolaki A. - Koukourakis M. - Sivridis E. et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *The British Journal of Cancer*, 2001, 85: 881-90.

GILUPI nanomedizin: <www.gilupi.com> [cit. 9. 1. 2014]

Gold P. and Freedman S.O. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *The Journal of Experimental Medicine*, 1965, 121: 439-462.

Graham R.A. - Wang S. - Catalano P.J. et al. Postsurgical surveillance of colon cancer. *Annals of Surgery*, 1998, 228: 59-63.

Guinn T.P. – Peters K.G. – De Vries C. et al. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *PNAS*, 1993, 90: 7533-7537.

Gunningham S.P. – Currie M.J. – Han C. et al. The short form of the alternatively spliced flt-4 but not its ligand vascular endothelial growth factor C is related to lymph node metastasis in human breast cancers. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6: 4278-4286.

Gupta K. – Kshirsagar S. – Li W. et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Experimental Cell Research*, 1999, 247: 495–504.

Hanahan D. and Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100: 57–70.

Hansen C. and Quake S. R. Microfluidics in structural biology: smaller, faster em leader better. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003, 13: 538-544.

Hicklin D.J. and Ellis L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23: 1011-1027.

Hiratsuka S. – Maru Y. – Okada A. et al. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Research*, 2001, 61: 1207-1213.

- Honda H. – Inazawa J. – Nishida J. et al. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a novel protein tyrosine phosphatase, HPTP etc. *Blood*, 1994, 84: 4186-4194.
- Horowitz J.R. - Rivard A. - van der Zee R. et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997, 17: 2793-2800.
- Hosch S. B. - Scheunemann P. - Izbicki J. R. Minimal residual disease in nonsmall cell lung cancer. *Seminars in surgical oncology*, 2001, 20: 278-281.
- Huang L.E. - Arany Z. - Livingston D.M. et al. Activation of Hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its a subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 32253–32259.
- Huang L.E. - Gu J. - Schau M. et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *PNAS*, 1998, 95: 7987–7992.
- Chabot C. – Spring K. – Gratton J.P. et al. New Role for the Protein Tyrosine Phosphatase DEP-1 in Akt Activation and Endothelial Cell Survival. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, 29: 241–253.
- Cheng M. - Chen Y. - Yu X. et al. Diagnostic utility of LunX mRNA in peripheral blood and pleural fluid in patients with primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 2008, 8: 156.
- Cheng T.L. - Chang M.Y. - Huang S. Y. et al. Overexpression of circulating c-met messenger RNA is significantly correlated with nodal stage and early recurrence in non-small cell lung cancer. *Chest*, 2005, 128: 1453-1460.
- Chomczynski P. and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162: 156-159.
- Ignatiadis M. and Reinholz M. Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2011, 13: 222.
- International Agency for Research on Cancer: <globocan.iarc.fr> [cit. 8. 11. 2013]
- Ivan M. - Kondo K. - Yang H. et al. HIFalpha targeted for VHL mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 2001, 292: 464–468.
- Iwao K. - Watanabe T. - Fujiwara Y. et al. Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 2001, 91: 433-437.
- Jemal A. – Bray F. – Center M.M. et al. Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011; 61: 69–90.
- Johnson P. - Burchill S. - Selby P. The molecular detection of circulating tumour cells. *British Journal of Cancer*, 1995, 72: 268-276.
- Joukov V. – Pajusola K. – Kaipainen A. et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *The EMBO Journal*, 1996, 15: 290-298.

Jung R. - Kruger W. - Hosch S. et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *British Journal of Cancer*, 1998, 78: 1194-1198.

Jüttner S. - Wibmann C. – Jöns T. et al. Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2006, 24: 228-240.

Kanno S. – Oda N. – Abe M. et al. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*, 2000, 19: 2138-2146.

Karkkainen M.J. – Mäkinen T. – Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nature Cell Biology*, 2002, 4: E2 - E5.

Keane M. – Lowrey G. – Ettenberg S. et al. The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer Research*, 1996, 56: 4236-4243.

Kerbel R.S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 505–515.

Kim K.J. - Wang L. - Su Y. et al. Systemic anti-hepatocyte growth factor monoclonal antibody therapy induces the regression of intracranial glioma xenografts. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12: 1292-1298.

Klener P. et al. *Vnitřní lékařství*. 3. vydání. Praha: Galén. 2006. ISBN 80-2461- 252-6.

Kovalenko M. - Denner K. - Sandström J. et al. Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor β -receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 16219-16226.

Krüger W. H. - Stockschläder M. - Hennings S. et al. Detection of cancer cells in peripheral blood stem cells of women with breast cancer by RT-PCR and cell culture. *Bone Marrow Transplant*, 1996, 18: 18-20.

Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine Related Cancer*, 2006, 13: 1033-1067.

Lampugnani M.G. – Zanetti A. – Corada M. et al. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, β -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 161: 793-804.

Lando D. - Peet D.J. - Whelan D.A. et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, 2002, 295: 858–861.

Laramée M. – Chabot C. – Cloutier M. et al. The scaffolding adapter Gab1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 7758-7769.

Lei J. - Jiang A. - Pei D. Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1443: 400-406.

Leung D.W. - Cachianes G. - Kuang W.J. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989, 246: 1306–1309.

- Li Y. - Dong X. - Yin Y. et al. BJ-TSA-9, a novel human tumor-specific gene, has potential as a biomarker of lung cancer. *Neoplasia*, 2005, 7: 1073-1080.
- Liska D. - Chen C. - Bachleitner-Hofmann T. et al. HGF rescues colorectal cancer cells from EGFR inhibition via MET activation. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17: 472-482.
- Lo Muzio L. - Farina A.- Rubini C. et al. Effect of c-Met expression on survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*, 2006, 27: 115–121.
- Mačák J. - Mačáková J. *Patologie*. Praha: Grada publishing. 2004. ISBN 80-247-0785-3.
- Maekawa S. - Iwasaki A. - Shirakusa T. et al. Correlation between lymph node metastasis and the expression of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 in T1 lung adenocarcinoma. *Anticancer Research*, 2007, 27: 3735-3742.
- Martens T. - Schmidt N. - Eckerich C. et al. A novel one-armed anti-c-met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12: 6144-6152.
- Masson N.W. - Maxwell P.H. - Pugh C.W. et al. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by propyl hydroxylation. *The EMBO Journal*, 2001, 20: 5197–5206.
- Matsumoto T. - Claesson-Welsh L. VEGF Receptor Signal Transduction. *Science: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2001, 2001: 1-17.
- Minimal Residual Disease: <www.minimalresidualdisease.com> [cit. 20. 2. 2014]
- Mitas M. - Hoover L. - Silvestri G. et al. LunX is a superior molecular marker for detection of non-small cell lung cancer in peripheral blood [corrected]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2003, 5: 237-242.
- Miura N. - Nakamura H. - Sato R. et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Science*, 2006, 97: 1366-1373.
- Moen C.J. – Groot P.C. - Hart A.A. et al. Fine mapping of colon tumor susceptibility (Sccl) genes in the mouse, different from the genes known to be somatically mutated in colon cancer. *PNAS*, 1996, 93: 1082-1086.
- Nap M. - Mollgard K. - Burtin P. et al. Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumor Biology*, 1988, 9: 145-153.
- Olofsson B. – Korpelainen E.- Pepper M.S. et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *PNAS*, 1998, 95: 11709-11714.
- Oral A.Y. – Ulukaya E. - Yilmaz Y. VEGF, VEGF-receptors and lung cancer. *Advances in Molecular Medicine*, 2007, 3: 15-21.
- Ostman A. – Yang Q. – Tonks N. Expression of DEP-1, a receptorlike protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *PNAS*, 1994, 91: 9680-9684.
- Palka H.L. – Park M. – Tonks N.K. Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 5728-5735.

Pantel K. - Brakenhoff R. H. - Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8: 329-340.

Pantel K. - Cote R. J. - Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 1999, 91: 1113-1124.

Park J.E. – Chen H.H. – Winer J. et al. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269: 25646-25654.

Paterlini-Brechot P. and Benali N. L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Letters*, 2007, 253: 180-204.

QUIAGEN: <www.sabioscience.com> [cit. 24. 1. 2014]

Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000, 105: 17–19.

Rahimi N. – Dayanir V. – Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 16986-16992.

Ratcliffe P.J. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117: 862-865.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997, 386: 671–674.

Roberts W.G. and Palade G.E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*, 1995, 108: 2369-2379.

Robinson C.J.- Stringer S.E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of Cell Science*, 2001, 114: 853-865.

Salceda S. and Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions: its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 22642–22647.

Sattler M. - Pride Y.B. - Ma P. et al. A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase. *Cancer Research*, 2003, 63: 5462-5469.

Saucedo-Zeni N. – Mewes S. – Niestroj R. et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *International Journal of Oncology*, 2012, 41: 1241-1250.

Semenza G. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3: 721-732.

Semenza G.L. and Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*, 1992, 12: 5447–54.

Senger D.R. - Connolly D.T. - Van De Water L. et al. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Research*, 1990, 50: 1774–1778.

Senger D.R. - Galli S.J. - Dvorak A.M. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983, 219: 983–985.

Senger D.R. - Perruzzi C.A. - Feder J. et al. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Research*, 1986, 46: 5629–5632.

Sequist L. V. - Nagrath S. - Toner M. et al. The CTC-chip an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *Journal of Thoracic Oncology*, 2009, 4: 281-283.

Sheu C.C. - Chang M.Y. - Chang H.C. et al. Combined detection of CEA, CK-19 and c-met mRNAs in peripheral blood: a highly sensitive panel for potential molecular diagnosis of non-small cell lung cancer. *Oncology*, 2006, 70: 203-211.

Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2001, 33: 409-420.

Shingyoji M. - Takiguchi Y. - Watanabe R. et al. Detection of tumor specific gene expression in bone marrow and peripheral blood from patients with small cell lung carcinoma. *American Cancer Society*, 2003, 97: 1057-1062.

Singhal S. - Vachani A. - Antin-Ozerkis D. et al. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: A Review. *Clinical Cancer Research*, 2005, 11: 3974-3986.

Smith B. - Selby P. - Southgate J. et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet*, 1991, 338: 1227-1229.

Srovnal J. - Benedíková A. – Klos D. et al. Minimální reziduální choroba u pacientů s karcinomem pankreatu - pilotní studie. In: Edukační sborník: Brněnské onkologické dny a ... Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky: Brno. Brno: Masarykův onkologický ústav, [1976]-. 2010, 285-286.

Srovnal J. - Kořínková G. - Vysloužil K. et al. Předběžné výsledky vyšetření minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu - korelace s klinickopatologickými charakteristikami nemoci. In: Edukační sborník: Brněnské onkologické dny a ... Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky: Brno. Brno: Masarykův onkologický ústav, [1976]-. 2005, 168.

Stabile L.P. - Rothstein M.E. - Keohavong P. et al. Targeting of both the c-Met and EGFR pathways results in additive inhibition of lung tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer*, 2010, 2: 2153-2170.

Stott S. L. - Hsua C. - Tsukrova D. I. et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *PNAS*, 2010, 43: 18392- 1839.

Su J.L. - Yang P.C. - Shih J.Y. et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell*, 2006, 9: 209-223.

Takahashi T. – Takahashi K. - St. John P.L. et al. A mutant receptor tyrosine phosphatase, CD148, causes defects in vascular development. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23: 1817-1831.

Takahashi Y. – Kitadai Y. – Bucana C.D. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Research*, 1995, 55: 3964-3968.

Takizawa H. – Kondo K. – Fujino H. et al. The balance of VEGF-C and VEGFR-3 mRNA is a predictor of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 2006, 95: 75-79.

Trapasso F. – Iuliano R. – Boccia A. et al. Rat protein tyrosine phosphatase η suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27Kip1. *Molecular Cellular Biology*, 2000, 20: 9236-9246.

Ushio-Fukai M. and Nakamura Y. Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy. *Cancer Letters*, 2008, 266: 37–52.

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: <www.uzis.cz> [cit. 8. 11. 2013]

Van der Auwera I. - Peeters D. - Benoy I. H. et al. Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *British Journal of Cancer*, 2010, 102: 276-284.

van Nieuw Amerongen G. P. – Koolwijk P. – Versteilen A. et al. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2003, 23: 211-217.

Vaupel P. Tumor Microenvironmental Physiology and Its Implications for Radiation Oncology. *Seminars of Radiation Oncology*, 2004, 14: 198-206.

Volm M. - Mattern J. - Koomagi R. Angiostatin expression in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6: 3236 -3240.

Went P. T. et al. Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas. *Human Pathology*, 2004, 35: 122-128.

World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: World Health Organization. 2008. ISBN 978-92-4-156371-0.

Yuan A. - Yang P.C. - Yu C.J. et al. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, 162: 1957-1963.

Zhang X. – Xie J. – Yu C. et al. mRNA expression of CK19, EGFR and LUNX in patients with lung cancer micrometastasis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2014, 7: 360-364.

VIII Seznam zkratek

Akt = PKB = proteinová kináza B (Protein Kinase B)

ARNT1 = aryl-uhlovodíkový-jaderný receptorový translokátor 1 (Aryl-Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator 1)

BAD = promotor buněčné smrti asociovaný s Bcl-2 (Bcl-2-Associated Death Promotor)

BCL-2 = lymfom B-buněk 2 (B-Cell Lymphoma 2)

bFGF = bazický růstový faktor fibroblastů (Basic Fibroblastic Growth Factor)

CD148 = klastr diferenciaci 148 (Cluster of Differentiation 148)

CD45 = klastr diferenciaci 45 (Cluster of Differentiation 45)

cDNA = komplementární deoxyribonukleová kyselina (Complementary Deoxyribonucleic Acid)

CEA = karcinoembryonální antigen (Carcinoembryonic Antigen)

CK19 = cytokeratin 19

cPLA2 = cytosolická fosfolipáza A2 (Cytosolic Phospholipase A2)

c_t = počet cyklů, při kterém fluorescence vzorku překročí threshold (prahovou hodnotu) (Threshold Cycle)

CT = počítačová tomografie (Computed Tomography)

CTCs = cirkulující nádorové buňky (Circulated Tumor Cells)

DAPI = 4'-6-diamidino-2-phenylindol

DEP-1 = Density-Enhanced Phosphatase 1

DEPC = diethyl pyrokarbonát

DNA = deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)

dNTPs = deoxynukleotidtrifosfáty

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

eNOS = syntáza endoteliálního oxidu dusnatého (Endothelial Nitric-Oxide Synthase)

EpCAM = adhezní molekula epiteliálních buněk (Epithelial Cell Adhesion Molecule)

FAK = fokální adhezní kináza (Focal Adhesion Kinase)

FKHR1 = „forkhead“ transkripční faktor 1 (Forkhead Transcription Factor-1)

Fik-1 = fetální jaterní kináza 1 (Fetal Liver Kinase 1)

Flt-1 = fms příbuzná tyrosin kináza 1 (fms-Related Tyrosin Kinase 1)

Flt-4 = fms příbuzná tyrosin kináza 4 (fms-Related Tyrosin Kinase 4)

FOXO1/4 = Forkhead Box „Other“ 1/4

Fw = levý primer (Forward)

HEX = hexachlorofluorescein

HGFR (c-met) = receptor pro růstový faktor hepatocytů (Hepatocyte Growth Factor Receptor)

HIF = hypoxií indukovatelný faktor (Hypoxia-Inducible Factor)

HIF-1 α = hypoxií indukovatelný faktor 1alpha (Hypoxia-Inducible Factor 1alpha)

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)

HR = poměr rizika (Hazard Ratio)

HRCT = počítačová tomografie s vysokým rozlišením (High Resolution Computed Tomography)

HSP27 = Heat Shock Protein-27

HUVECs = lidské pupečnickové cévní endoteliální buňky (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

IGF 1 = insulínu podobný růstový faktor 1 (Insulin-like Growth Factor 1)

IL-8 = interleukin 8

KDR = kináza vložená na doménu obsahující receptor (Kinase Insert Domain-Containing Receptor)

LunX = plicní specifický X protein (Lung Specific X Protein)

MAPK = mitogenem aktivovaná proteinová kináza (Mitogen-Activated Protein Kinase)

MAPK/ERK = mitogenem aktivovaná proteinová kináza/extracelulární signál regulující kináza (Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase)

M-MuLV = Moloneyho virus myší leukemie (Moloney Murine Leukemia Virus)

MRD = minimální reziduální choroba (Minimal Residual Disease)

mRNA = mediátorová ribonukleová kyselina (Messenger Ribonucleic Acid)

NSCLC = nemalobuněčný karcinom plic (Non-Small Cell Lung Cancer)

NSE = neuron specifická enolasa (Neuron Specific Enolase)

ODD = na kyslíku závislá degradace (Oxygen-Dependent Degradation)

OPC = purifikační oligonukleotidové kazety (Oligonucleotide Purification Cartridge)

PCR = polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

PD-ECGF = z krevních destiček odvozený endoteliální růstový faktor (Plateled-Derived Endothelial Cell Growth Factor)

PDGF = z krevních destiček odvozený růstový faktor (Plateled-Derived Growth Factor)

PDGFR = receptor pro z krevních destiček odvozený růstový faktor (Plateled-Derived Growth Factor Receptor)

PET = pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography)

PET-CT = kombinace pozitronové emisní tomografie a počítačové tomografie (Positron Emission Tomography – Computed Tomography)

PH = homologie plekstrinu (Pleckstrin Homology)

PI-3-K = fosfatidylinositol-3-kináza (Phosphatidylinositol-3-Kinase)

PKC = proteinová kináza C (Protein Kinase C)

PLC-gama = fosfolipáza C-gamma (Phospholipase C – Gamma)

PIGF = placentální růstový faktor (Placental Growth Factor)

pO₂ = parciální kyslík

Ptg = prostaglandin

PTPRJ = protein tyrosin fosfatázový receptor typu J (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type J)

PTP-η = protein tyrosin fosfatáza η (Protein Tyrosine Phosphatase η)

pVHL = Von Hippel-Lindau nádorový supresor

Raf1-MEK-ERK = signální dráha s postupnou aktivací Raf1-MEK-ERK (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma 1 - Mitogen-Activated Kinase - Extracellular Signal-Regulated Kinase)

Rev = pravý primer (Reverse)

RhoA = homolog genové rodiny Ras, typu A (Ras Homolog Gene Family, Member A)

RNA = ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)

RT-PCR = reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

SCC = antigen skvamózních nádorových buněk (Squamous Cell Carcinoma Antigen)

Sck = protein podobný Shc (Shc-Like Protein)

SCLC = malobuněčný karcinom plic (Small Cell Lung Carcinoma)

Scr = tzv. „zametací“ receptor (Scavenger Receptor)

SD = směrodatná odchylka

SHC-GRB2 = doména obsahující homolog Src 2/růstový faktor receptoru vážícího protein-2 (Src Homology 2 Domain-Containing/Growth Factor Receptor-Bound Protein-2)

TGF α = transformující růstový faktor alfa (Transforming Growth Factor Alpha)

T_m = teplota tání (Melting Temperature)

TPA = tkáňový polypeptidový antigen (Tissue Polypeptide Antigen)

VEGF = vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGFR-1 = receptor 1 pro vaskulární endoteliální faktor (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1)

VEGFR-2 = receptor 2 pro vaskulární endoteliální faktor (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2)

VEGFR-3 = receptor 3 pro vaskulární endoteliální faktor (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3)

VRAP = protein asociovaný s VEGF receptorem (VEGF Receptor Associated Protein)