

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Diplomová práce

Olomouc 2013

Bc. Zuzana Crlíková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Význam molekulárně cytogenetických změn u
nemalobuněčného karcinomu plic**

Diplomová práce

Bc. Zuzana Crlíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: **RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma "Molekulárně cytogenetické změny u nemalobuněčného karcinomu plic" vypracovala samostatně, pouze za užití literatury uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Souhrn

Karcinom plic je charakterizován vysokou úmrtností a počet pacientů umírajících na karcinom plic meziročně přibývá. Karcinom plic je rozdělen podle histologického vyšetření na malobuněčný a nemalobuněčný karcinom. Nemalobuněčný karcinom plic je dále rozdělen na squamózní karcinom, velkobuněčný karcinom a adenokarcinom. Při vzniku karcinomu plic dochází k morfogenetickým změnám v regulaci růstu a dělení buněk. Na vzniku karcinomu plic se podílí kumulace genetických změn, a to především genů, které kontrolují buněčnou proliferaci, přežití, diferenciaci, migraci a interakce s okolními buňkami. Geny regulující tyto pochody jsou označeny jako protoonkogeny a tumor-supresorové geny.

U nemalobuněčného karcinomu dochází často k molekulárním změnám v genech pro C-MET, EGFR, FGFR nebo dochází ke vzniku fúzního genu EML4-ALK. Praktická část zahrnuje vyšetření genetických změn souboru 80 pacientů s karcinomem plic pomocí metody FISH. Byl stanoven status genů C-MET, FGFR1 a EGFR. Pomocí centromerických sond byl zároveň stanoven počet kopií chromozomu 7 (na kterém jsou lokalizovány geny C-MET a EGFR) a chromozomu 8, na kterém je lokalizován gen FGFR1. Současně byla metodou FISH vyšetřována přítomnost aberace genu ALK. Určení těchto změn je součástí většího projektu probíhajícího na ÚMTM, ve spolupráci s Plicní klinikou FN Olomouc. Cílem celého projektu je vyšetřit vybrané biomarkery pacientů s operabilním nemalobuněčným karcinomem plic a objasnit jejich prognostickou a prediktivní hodnotu pro odhad biologického chování nemoci a účinnost adjuvantní chemoterapie a navržení vhodného algoritmu vyšetřování jednotlivých markerů, použitelného v rutinní praxi a vedoucího ke zkvalitnění léčebné péče o pacienty s NSCLC.

Bohužel, zejména u karcinomu plic se laboratoře velmi často potýkají s problémem, že kvalita dodaných vzorků je nízká a nelze získat další materiál pro vyšetření. Až 20 % patientských vzorků nelze v rutinní diagnostice vyšetřit na přítomnost aberace ALK. Z tohoto důvodu bylo součástí zavést techniku PCR pro sledování fúzního genu EML4-ALK (varianty 1, 3ab a 6) u pacientů, u nichž selhala FISH diagnostika.

Summary

Lung carcinoma is characterized by high mortality and number of patient dying of lung carcinoma is increasing year on year. Lung carcinoma can be categorised as small cell and non-small cell lung carcinoma based on histological screening. Non-small cell carcinoma is divided into squamous, large cell carcinoma and adenocarcinoma. During development of lung carcinoma, morfogenetic changes in regulation of growth and cell division occure. Cumulation of abberations in the genes that control cell proliferation, survival, differentiation, migration and interactions with the other cells is involved in the development of lung carcinoma. The genes that control mentioned functions are called protooncogenes and tumor-supresor genes.

Molecular changes in C-MET, EGFR, FGFR genes and fusion of EML4-ALK genes are often present in non-small cell carcinoma. Practical part of this thesis involves examination of 80 patients suffering from lung carcinoma by FISH assay. Status of C-MET, EGFR, FGFR1 genes was investigated. Number of copies of chromosome 7 (on which genes C-MET and EGFR are localised) and 8 (gene FGFR1 is localised there) was determined by using centromeric probes. Aberration of ALK gene was also examined by FISH method. Identifying these changes is the part of a larger ongoing project on IMTM, in collaboration with the Pulmonary Clinic, University Hospital Olomouc. The aim of the whole project is to examine selected biomarkers in patients suffering from operable non-small cell lung carcinoma and help to clarify their prognostic and predictive value for estimation of biological behaviour of the disease and for the efficiency of adjuvant chemotherapy. We also would like to suggest a suitable algorithm for examination of each marker applicable in routine practice and therefore help to improve the management of medical care provided to patients suffering from NSCLC.

Unfortunately, the greatest problem of routine diagnostics is the quality of samples provided for evaluation. Up to 20% of patients' samples are impossible to examine for presence of ALK aberrations. For this reason, PCR method for investigation of EMLK4-ALK fusion gene (variants, 3ab and 6) in patients where FISH diagnostics failed was in this thesis designed.

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce a kolegům z Laboratoře experimentální medicíny Ústavu molekulární a translační medicíny za jejich cenné rady, odborné připomínky, trpělivost a čas, který mi věnovali během psaní a vypracovávání mé diplomové práce. Také děkuji rodičům, sourozencům a příteli za psychickou podporu po celou dobu studia.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Současný stav řešené problematiky	9
	2.1 Přeměna buňky v nádorovou.....	9
	2.2 Rakovina plic a NSCLC.....	9
	2.3 C-MET.....	11
	2.4 EML4 - ALK	20
	2.5 EGFR.....	26
	2.6 FGFR	31
	2.7 Současný stav a budoucnost NSCLC.....	36
3	Cíle práce.....	38
	3.1 Vyšetření cytogenetických změn pacientů s karcinomem plic metodou FISH.....	38
	Chemikálie	38
	Kity	39
	Pomůcky	39
	Přístroje.....	39
	3.2 Detekce varianty fúzního genu EML4-ALK	44
	Chemikálie	44
	Kity	45
	Pomůcky	45
	Přístroje.....	45
4	Výsledky.....	51
	4.1 Analýza aberací FISH metodou.....	51
	4.2 Reverzně transkriptázová real-time PCR fúzního genu EML4-ALK	63
5	Diskuze	72
6	Závěr.....	76
7	Literatura.....	77

1 Úvod

Každoročně v České republice onemocní rakovinou 73000 lidí a každý rok na ni umře přes 27000 lidí. Česká republika zaujímá v Evropě první příčku v četnosti výskytu rakoviny tlustého střeva. Pozadu však nezůstává ani v případě karcinomu plic – ten se nejčastěji vyskytuje u českých mužů, meziročně přibývá i počet žen s karcinomem plic. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem vzniku tohoto karcinomu je kouření tabákových výrobků, zejména cigaret. Nejdůležitější pro prevenci vzniku nádoru plic je tedy nekouřit (www.linkos.cz).

V zahraničí - například v USA, bylo v roce 2010 až 157300 úmrtí spojeno s karcinomem plic, a proto se tedy řadí na první příčku. Obecně vede ke smrti 29 % případů u mužů a 26 % žen. Nejčastějším podtypem karcinomu plic je nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC), který reprezentuje asi 85 % všech případů.

Od roku 2000 dochází k postupnému odkrývání molekulární podstaty karcinomu plic, zejména u NSCLC, a rozvoji cílené (biologické léčby), která podstatně rozšiřuje terapeutické možnosti. Pro predikci účinnosti léčby se využívá přesné identifikace mutací v genech EGFR, KRAS, C-MET a fúzního genu EML4/ALK. Tyto změny jsou spojovány se vznikem karcinomu plic. Mutace nebo přestavby genů způsobují změny exprese mnoha molekul, které jsou zapojeny do buněčné signalizace. Zmíněné poruchy buňky vedou k nekontrolovatelnému buněčnému růstu a poruchám apoptózy. Na základě vyšetření buněk karcinomu plic je pacientům přesně určena léčba (Brandao *et al.* , 2012).

2 Současný stav řešené problematiky

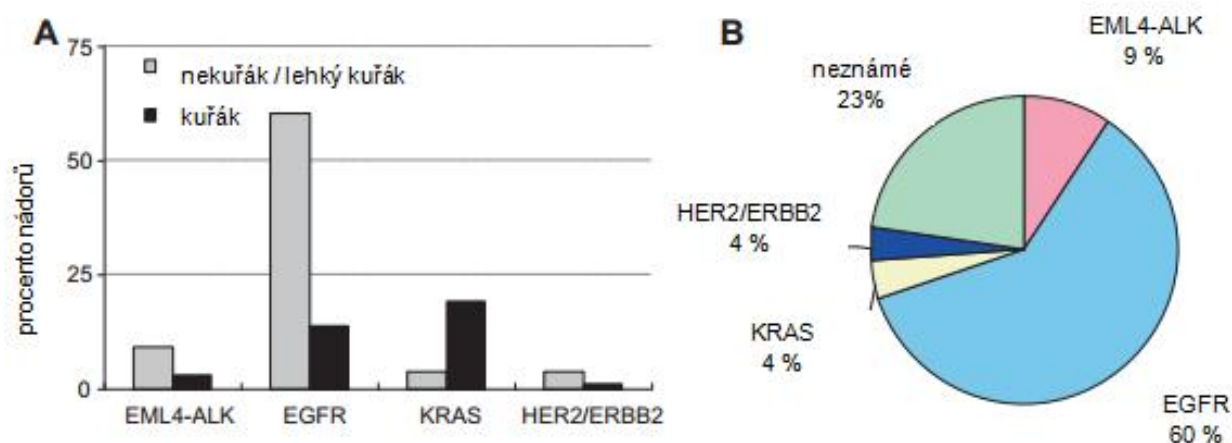
2.1 Přeměna buňky v nádorovou

Přeměně buňky v nádorovou předchází mnoho morfogenetických změn. Růst buněk je regulován několika mechanismy. Pokud jsou tyto regulační mechanismy porušeny, dochází k nekontrolovatelnému dělení buněk a vzniku nádorového onemocnění. Vzniká tak masa buněk nereagující na vnější ani vnitřní podněty a vymaňuje se z regulačního vlivu okolních buněk i celého organismu. Vznik nádoru zahrnuje kumulaci mnoha genetických změn, které kontrolují buněčnou proliferaci, přežití, diferenciaci, migraci a interakce s okolními buňkami (Pelengaris *et Khan*, 2006). Geny podílející na regulaci těchto pochodů se nazývají protoonkogeny a tumor-supresorové geny.

Invazivní růst maligního nádoru má několik kroků – migraci, přežití, degradaci matrix a navození buněčné polarity. Prvním krokem migrace buňky je přerušení intracelulárních spojů realizovaných pomocí kadherinů, cytoskeletální přestavba a zvýšená produkce matrixových proteáz, které narušují bazální laminu. Na základě tohoto procesu se buňka přemísť do okolních tkání. V místě invaze je obnovena buněčná polarizace a následně dochází k buněčnému pomnožení. Vzniká tak organizovaná trojrozměrná struktura (Comoglio *et Trusolino*, 2002).

2.2 Rakovina plic a NSCLC

Karcinom plic patří mezi nejrozšířenější typy nádorových onemocnění západního světa a má špatnou prognózu – jen 10-15 % pacientů přežije 5 let nebo více. Na základě histologického vyšetření plic rozdělujeme dva hlavní typy: nemalobuněčný karcinom plic čítající asi 85 % výskytu a malobuněčný (SCLC) s 15 % (Brandao *et al.*, 2012). Toto rozlišení je základem pro stanovení prognózy pacientů i následnou léčbu. Malobuněčný karcinom plic je diagnostikován nejčastěji u kuřáků; z 90 % jsou pacienti současnými nebo bývalými kuřáky. Ačkoli je kouření považováno za hlavní rizikový faktor rakoviny plic, okolo 25 % pacientů s rakovinou plic jsou nekuřáci. NSCLC postihuje jen asi 10 - 20 % kuřáků což naznačuje, že na vzniku NSCLC se podílí genetické predispozice a životní prostředí (Johnson *et al.*, 2012). Bylo dokázáno, že u kuřáků a nekuřáků dochází jak k expresi různých genů, tak i k jiným mutacím odlišných genů (Subramanian *et Govindan*, 2007). U NSCLC vznikají často mutace v genech: EGFR, EML4-ALK, KRAS, C-MET atd. Frekvence těchto mutací podílejících se na NSCLC je uvedena na obr. 1.



Obr. 1: Frekvence somaticko-genetických změn u NSCLC. A – Četnost mutací EML4-ALK, EGFR, KRAS a HER2/ERBB2 v závislosti na kouření pacienta. B – Frekvence somatických mutací u nekuřáků nebo bývalých lehkých kuřáků. Převzato z Sasaki *et al.*, 2010.

Histologicky se NSCLC dělí na squamózní karcinom (SCC), velkobuněčný karcinom a adenokarcinom. Typ je určen na základě rozdílné exprese jednotlivých biomarkerů (např. cytokeratiny, TTF1, chromogranin) z biopsie nebo resekovaného tumoru. Dále se používá hematoxilin-eozinové barvení pro rozlišení nádorové tkáně a základní charakteristiku nádoru. (Kim *et al.*, 2013).

SCC čítá asi 20 % NSCLC a nejvíce se pojí s účinky cigaretového kouře. SCC se nejčastěji vyskytuje v centru dýchacích cest a zasahuje až do segmentů bronchů (Sakurai *et al.*, 2004). Metastázy se u SCC vyskytují jen zřídka, mají spíše lokální agresivní účinky. SCC obsahuje unikátní biomarkery jakými jsou amplifikace genů SOX2 a FGFR1, mutace NFE2L2, KEAP1 a DDR2, změny PI3K dráhy. Histologicky je nádor charakterizován keratinizovanými buňkami, intercelulárními spoji a perlovou formací. Buňky SCC jsou velké s objemnou hustou cytoplazmou, nepravidelným barevným jádrem a malým jadérkem (Drilon *et al.*, 2012).

Velkobuněčný karcinom se vyskytuje asi ve 12 % případů. Pacientem je většinou kuřák ve věku okolo 60 let. Z histologického hlediska nemá velkobuněčný karcinom výrazné znaky a jeho vzhled záleží na místě vzniku nádoru. Buňky se mohou shlukovat do agregátů, ojediněle však mohou být i rozptýleny. Jádro má různý tvar - od extrémně pravidelného až po absolutně nepravidelný tvar s nerovnoměrným rozložením chromatinu. Často se objevuje v periferních částech plic (shrnuto v Travis *et al.*, 2004).

Adenokarcinom je nejrozšířenější v asijské populaci (cca 40%), ale jeho podíl se zvyšuje i v USA a Evropě. Nejčastěji se vyskytuje u primárního karcinomu kuřáků (Travis, 2002) nebo bývalých kuřáků, ale stále častěji jej lze identifikovat i u nekuřáků. Adenokarcinom je rozdělen do několika podtypů a hojně vykazuje smíšenou histologii.

Smíšená histologie je charakterizována kombinací znaků bronchoalveolárních, papilárních, acinárních nebo znaků solidního nádoru (Brambilla *et al.*, 2001).

Určení stádia rakoviny plic bývá nejčastěji posuzováno dle TNM klasifikace (T-primární nádor, N-místní lymfatické uzliny, M-vzdálené metastázy). TNM klasifikace byla zavedena roku 1946 a v aktualizované formě z roku 2009 je používána dodnes. Na základě T, N a M je u pacientů určeno chirurgicko-patologické stádium (IA-IV).

Histopatologické určování stádia je pro predikci a prognózu mnohem přesnější než klinické určení. Podle novodobého určování TNM se NSCLC dělí do stádia I až IV a do podskupin A a B založených na velikosti primárního nádoru. Stádium I zasahuje pouze plíce - bez invaze do okolních tkání. Stádium I je rozděleno na IA s nejlepší prognózou (61 % pacientů přežije 5 let) a IB (38 % pacientů přežije 5 let). Stádium IIA mají pacienti s T1 primárními nádory, intrapulmonálními metastázemi nebo metastázemi v lymfatických uzlinách. Tito pacienti mají 34% šanci žít dalších 5 let. Stádium IIB zahrnuje pacienty s velkými nádory plic, rozšířenými v lymfatických uzlinách, bránici a mediastinu. U pacientů se stádiem IIB je 22-34% šance na přežití 5 let. Stádium IIIA obsahuje 4 podskupiny; základní charakteristikou jsou T3 nádory a nádory v lymfatických uzlinách. Léčba je založena na lobektomii plic s odstraněním uzlin a často se využívá i preoperativní chemoterapie. Jen 9-13 % pacientů přežije dobu 5 let. Stádium IIIB zahrnuje pacienty s T4 nádory nebo s N3 lymfadenopatií bez metastáz vně hrudníku. Přežití 5 let dosáhne jen asi 1-8 % pacientů. Tato stádia jsou většinou inoperabilní. Ve stádiu IV mají pacienti vzdálené metastázy; jen 1 % pacientů přežije dobu 5 let. (Beadsmoore *et Screamore*, 2002). Pro léčbu IV stádia NSCLC se v současné době využívá chemoterapie – cisplatinu či karboplatinu spolu s dalším aktivním činidlem nebo také biologická léčba (Azzoli *et al.*, 2009).

2.3 C-MET (receptor hepatocytárního růstového faktoru)

C-MET je protoonkogen kódující receptor hepatocytárního růstového faktoru s tyrozinkinázovou aktivitou. C-MET je lokalizován v chromozomální oblasti 7q31 a délka je 132982 bp (RefSeq). Poprvé byl izolován z lidské buněčné linie osteogenního sarkomu, která byla chemicky zmutována *in vitro*. Transformující aktivita byla zjištěna na základě přestavby DNA, kde sekvence z TPR lokusu na chromozomu 1 fúzovala do sekvence C-MET na chromozomu 7. Později byla přestavba nalezena i u pacientů s karcinomem žaludku (Furge *et al.*, 2000).

Primární a nejdůležitější funkce C-MET receptoru je při embryonálním vývoji, léčbě poranění a při formování orgánů v dospělosti. Během dospělého života využívají epitelální buňky program invazivního růstu při léčení poranění. Buňky na okraji rány prolifерují

a migrují, aby obnovily integritu tkáně. C-MET je zahrnut i v procesech regenerace jater a obnovování tkáně při poranění kůže (Gentile *et al.*, 2008).

Ligandem C-MET je HGF (Hepatocyte Growth Factor). Gen pro HGF leží v chromozomální oblasti 7q21.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov) a jeho exprese je často zvýšená u NSCLC. HGF je silným mitogenním faktorem motility v různých typech buněk, který reaguje s tyrozin kinázovým receptorem kódovaným C-MET protoonkogenem (Bussolino *et al.*, 1992). HGF je produkován mezenchymálními buňkami a indukuje expresi C-MET u epiteliálních buněk. HGF je sekretován jako jednořetězcový inaktivní prekurzor (pro-HGF) a musí být proteolyticky naštěpen do aktivní formy pomocí proteázám podobným serinu (Danilkovitch-Miagkova *et Zbar*, 2002).

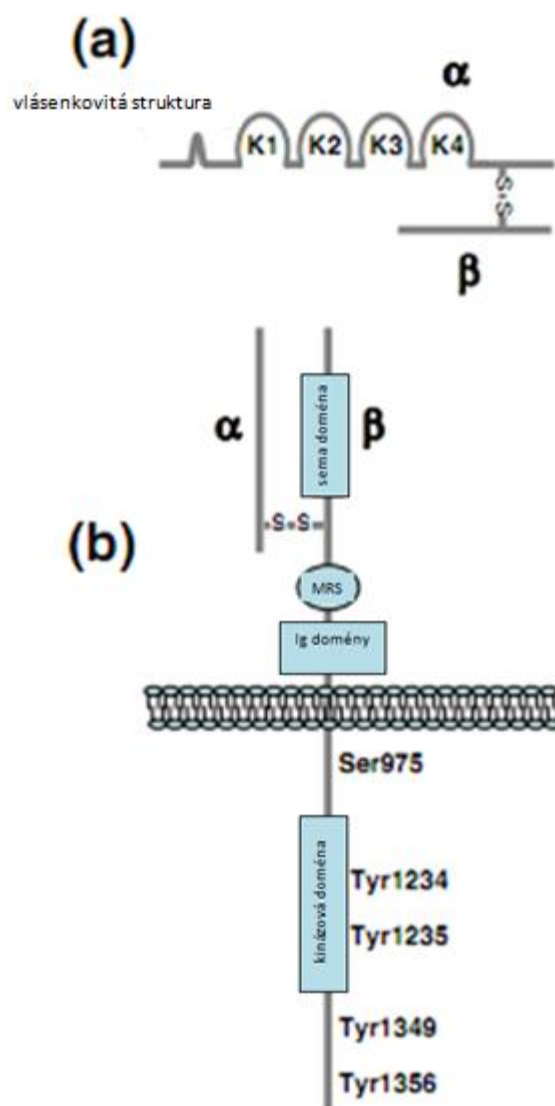
Po vazbě ligandu HGF aktivuje C-MET signalizační molekuly jako jsou PI3K, Src, signální transduktory i aktivátory transkripce a spouští klíčové kroky metastáze (Xu *et al.*, 2010) jako jsou motilita, proliferace, přežití a morfogeneze (Corso *et al.*, 2005). Buňky karcinomu plic s genovou amplifikací C-MET jsou invazivnější, jsou odolnější vůči apoptóze a C-MET rovněž podporuje angiogenezi (Pal *et al.*, 2010). Somatické mutace MET byly popsány u několika typů rakoviny včetně rakoviny žaludku, prsu, močového měchýře, vaječníků, ledvin, jater (Corso *et al.*, 2005), hlavy, krku a plic – jak u NSCLC tak SCLC (Peruzzi *et Bottaro*, 2006).

2.3.1 Struktura

C-MET je produkován jako jednořetězcový prekurzor. Prekurzor je naštěpen ve furinovém místě. Takto vzniká vysoce glykosylovaná extracelulární α -podjednotka a β -podjednotka s velkou extracelulární oblastí, na kterou se váže ligand. Řetězce α (50kDa) a β (140kDa) jsou spojeny disulfidickými můstky (Gentile *et al.*, 2008). Extracelulární část C-MET obsahuje oblast homologní k sematoforinům - sema doménu, MRS oblast bohatou na cystein, která je následována repetitivními bohatými na glycin a prolin a dále návazují čtyři imunoglobulinům podobné struktury. Sema doména se skládá z α -řetězce a N-terminální části β řetězce C-MET (Birchmeier *et al.*, 2003). Intracelulární část C-MET obsahuje tři oblasti. První je juxtamembránový segment zahrnující serinové zbytky (Ser 985), který po fosforylaci protein kinázou C nebo Ca^{2+} kalmodulin-dependentními kinázami, downreguluje kinázovou aktivitu receptoru. Dále je zde tyrozin (Tyr1003), který váže ubiquitin ligázu Cbl zodpovědnou za polyubiquitinaci C-MET, endocytózu a degradaci. Druhou částí je tyrozinkinázová doména, která po aktivaci receptoru prochází transfosforylací na tyrozinech Tyr1230, Tyr1234 a Tyr1235. Třetí částí je C-terminální oblast skládající se ze dvou klíčových tyrozinů Tyr1349 a Tyr1356 vložených

v degenerovaném motivu, který reprezentuje multisubstrátové vazebné místo. Zde se váží adaptory obsahující Src homologní-2 domény. Znakem receptoru C-MET je multifunkční vazebné místo, do něhož se vážou specifické signální molekuly. Tyroziny Tyr1349 a Tyr1356 ve vazebném místě jsou důležité pro signální transdukci jak *in vitro* tak *in vivo* (Gentile *et al.*, 2008).

Pro-HGF je štěpen v místech Arg494-Val495, dochází ke změně na heterodimerickou aktivní HGF formu. Ta se skládá z řetězců α (65 kDa, 463 aminokyselin) a β (30 kDa, 234 aminokyselin) spojených disulfidickou vazbou. Řetězec α obsahuje N-terminální smyčku následovanou čtyřmi doménami ve tvaru preclíku, tzv. kringle domény – 80 aminokyselin dvojitě zasmyčkových a formovaných pomocí tří vnitřních disulfidických můstků. Řetězec je homologní k serinovým proteázám z kaskády krevní sraženiny. α řetězec je zodpovědný za vazbu receptoru a β řetězec je potřebný pro plnou receptorovou aktivaci a biologickou odpověď (Comoglio *et Trusolino*, 2002). Štěpení je provedeno pomocí serinových proteáz jakými jsou HGF konvertující enzym, krevní koagulační faktor VIII a urokinázový typ plazminogenního aktivátoru. Existují i přirozeně se vyskytující izoformy HGF obsahující domény NK1 a NK2. Obě izoformy NK1 a NK2 jsou jak antagonisté, tak agonisté a mohou modulovat kinázovou aktivitu C-MET. HGF a také izoformy NK1 a NK2 jsou overexprimovány v tkáních NSCLC a některých NSCLC buněčných liniích. Overexprese HGF způsobuje aktivaci HGF/C-MET autokrinní smyčky a tím zvyšuje tumorogenicitu (Qiao *et al.*, 2002). Na obrázku 2 je schématicky zobrazena struktura C-MET a HGF.



Obr. 2: Strukturní znaky C-MET a HGF. A - HGF je složen z α a β disulfidicky spojeného heterodimeru obsahujícího vlásenkovou strukturu, následovanou čtyřmi „kringle“ doménami (K1-K4) a serinproteázovou doménou postrádající proteolytickou aktivitu. B - C-MET je složen z α a β disulfidicky spojeného heterodimeru. Extracelulární oblast obsahuje Sema doménu, MRS doménu a čtyři imunoglobulinům podobné struktury. Intracelulární část C-MET se skládá z katalytické oblasti a C-terminální regulační části. Převzato z Gentile *et al.*, 2008.

2.3.2 Mutace a její důsledky

Aberovaný C-MET se podílí na širokém spektru malignit. Parakrinní signalizací, overexpresí ligandu a/nebo receptoru, tvorbou autokrinní smyčky a/nebo mutací receptoru, přeskupením genů a/nebo amplifikací může dojít k proliferaci rakovinných buněk, jejich přežití, motilitě a invazi (Peruzzi *et Bottaro*, 2006).

Nejčastější příčinou konstitutivní aktivity C-MET u lidských nádorů je zvýšená exprese proteinu, která je následkem transkripční upregulace bez přítomnosti amplifikace genu (Danilkovitch-Miagkova *et al.*, 2002). Overexprese receptorů vede k jejich oligomerizaci a reciproké aktivaci. Proto jsou buňky citlivé i na velmi malé koncentrace ligandu (Boccaccio *et al.*, 1994). Abnormální aktivace receptoru C-MET je často pozorována u neoplastických buněk indukujících přechod přes fyzické bariéry, které udržují buňky v jejich přirozeném prostředí. Aktivace C-MET umožňuje přežití buněk v krevním řečišti a jejich ukotvení. Buňky extravazují a kolonizují nové oblasti, proliferují a tím vznikají populace známé jako metastazující léze (Trusolino *et al.*, 2002). HGF je v tomto případě silným angiogenním cytokininem (Bussolino *et al.*, 1992). Aktivace C-MET v pre-neoplastických lézích vede k aktivaci genů kontrolujících krevní koagulační kaskádu a uvolnění koagulačních faktorů, které podporují zahánění nádoru (Boccaccio *et al.*, 2006). U Trosseova syndromu je vztah mezi progresí nádorového onemocnění a zvýšenou koagulací krve znám více než jedno století. C-MET zde slouží jako prokoagulační induktor (Rickles *et al.*, 2001).

C-MET amplifikace vede k receptorové overexpresi a konstitutivní HGF-independentní aktivaci. C-MET a HGF hrají roli při progresi onemocnění, v angiogenním procesu a jako prvek mezi nádorovými buňkami a mikroprostředím. Většina C-MET amplifikací je spojených a polyzomii chromozomu 7. Asi u 20 % pacientů léčených gefitinibem nebo erlotinibem dochází k amplifikaci C-MET a k následnému vzniku sekundární rezistence (Chen *et al.*, 2009). V současné době je známo několik příčin rezistence, mezi nejvýznamnější z nich patří právě amplifikace C-MET a mutace v EGFR, označovaná jako T790M. Bylo prokázáno, že lze již před léčbou identifikovat buňky s mutací T790M nebo amplifikací C-MET. Zdá se, že si tyto buňky už před léčbou vytváří určitý rezistentní mechanismus a selekčním tlakem léčby vzniká množství rezistentních klonů po léčbě (Suda *et al.*, 2010). Jen asi 4-7 % pacientů s rakovinou plic vykazuje pravou amplifikaci C-MET *de novo* (Sierra *et al.*, 2011), která je znakem pokročilejšího stádia onemocnění a pacienti s touto aberací mají kratší dobu přežití (Zhao *et al.*, 2005). Amplifikace C-MET je spojena se vznikem metastáz, tzn. amplifikace C-MET je tedy spojována s pozní fází maligní progresy (Zeng *et al.*, 2008).

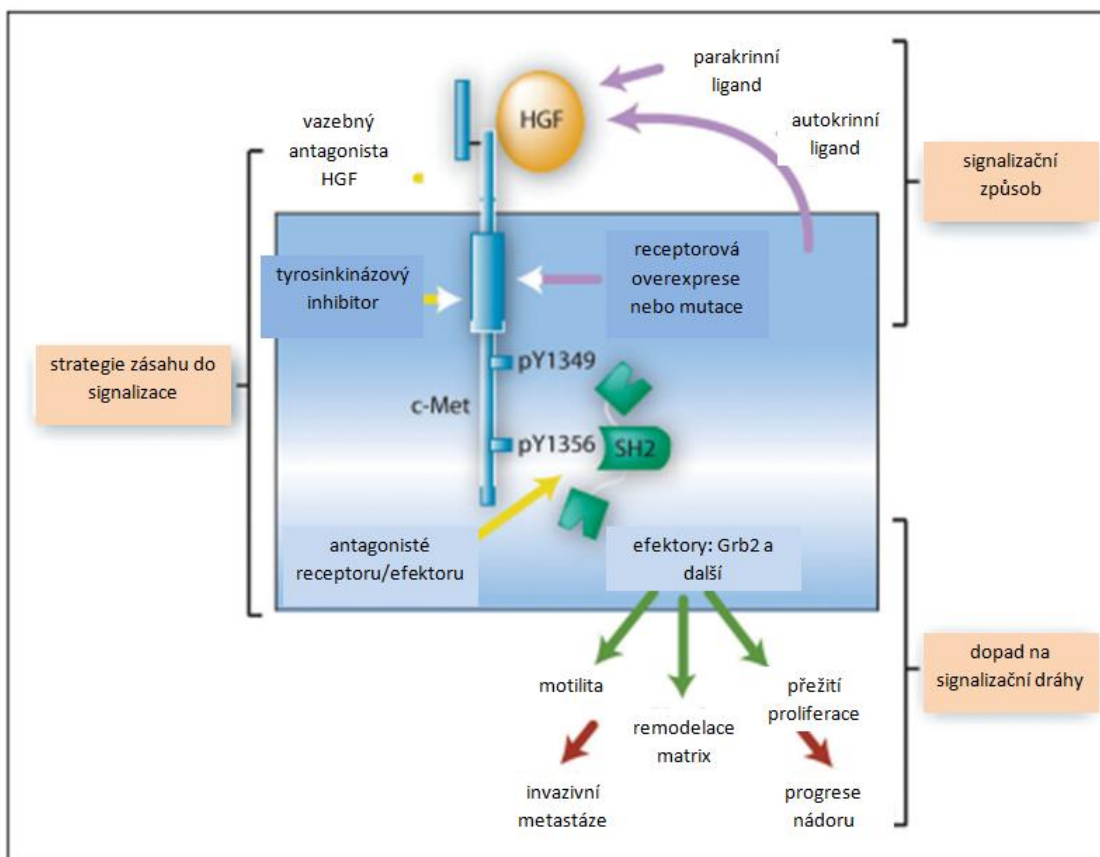
Konstitutivní aktivace C-MET může být dosaženo třemi různými cestami: vznikem HGF-C-MET autokrinních smyček; overexpresí C-MET; přítomností mutace v sekvenci kódující receptor. Autokrinní nebo parakrinní produkce HGF je často spojována s mnohem agresivnějším chováním nádoru. Ve druhém případě vede kvantitativní upregulace ke zvýšené citlivosti na HGF nebo k oligomerizaci receptoru a k reciproké aktivaci i v nepřítomnosti ligandu. Nejčastějším mechanismem onkogenní aktivity u lidí je vysoká

exprese C-MET. Tato overexprese je způsobena zvýšeným počtem kopií genu kódujícího C-MET, ale mnohem častěji dochází k nadměrné produkci při transkripci. Zvýšená exprese C-MET byla popsána u mnoha solidních tumorů – karcinomu žaludku (Kijima *et al.*, 2002), žlučových (Nakazawa *et al.*, 2005) či plic (Lutterbach *et al.*, 2007). Prognóza je většinou špatná. Bodové mutace mohou generovat konstitučně aktivní receptory, popsanych případů však není mnoho (Gentile *et al.*, 2008).

Na vzniku karcinomu plic se může podílet i nadměrná exprese ligandu HGF pro receptor C-MET. Kouření cigaret indukuje zvýšenou expresi HGF v alveolárních pneumocytech typu II a v rakovinných buňkách plic. Dochází k diferenciaci a/nebo proliferaci a aktivaci C-MET (Beau-Faller *et al.*, 2008). Další mutace se vyskytují v exonech genu pro tyrozinkinázové domény, hlavně juxtamembránové části, která se u rakoviny plic vyskytuje zhruba ve 12 % případů (Peruzzi *et al.*, 2006). Amplifikace C-MET byly popsány u karcinomu prsu, vaječníků, kolorektálního karcinomu, melanomu, osteosarkomu (Qiao *et al.*, 2002) a v neposlední řadě v 4-7 % případů u NSCLC (Cappuzzo *et al.*, 2009).

2.3.3 Signalizace

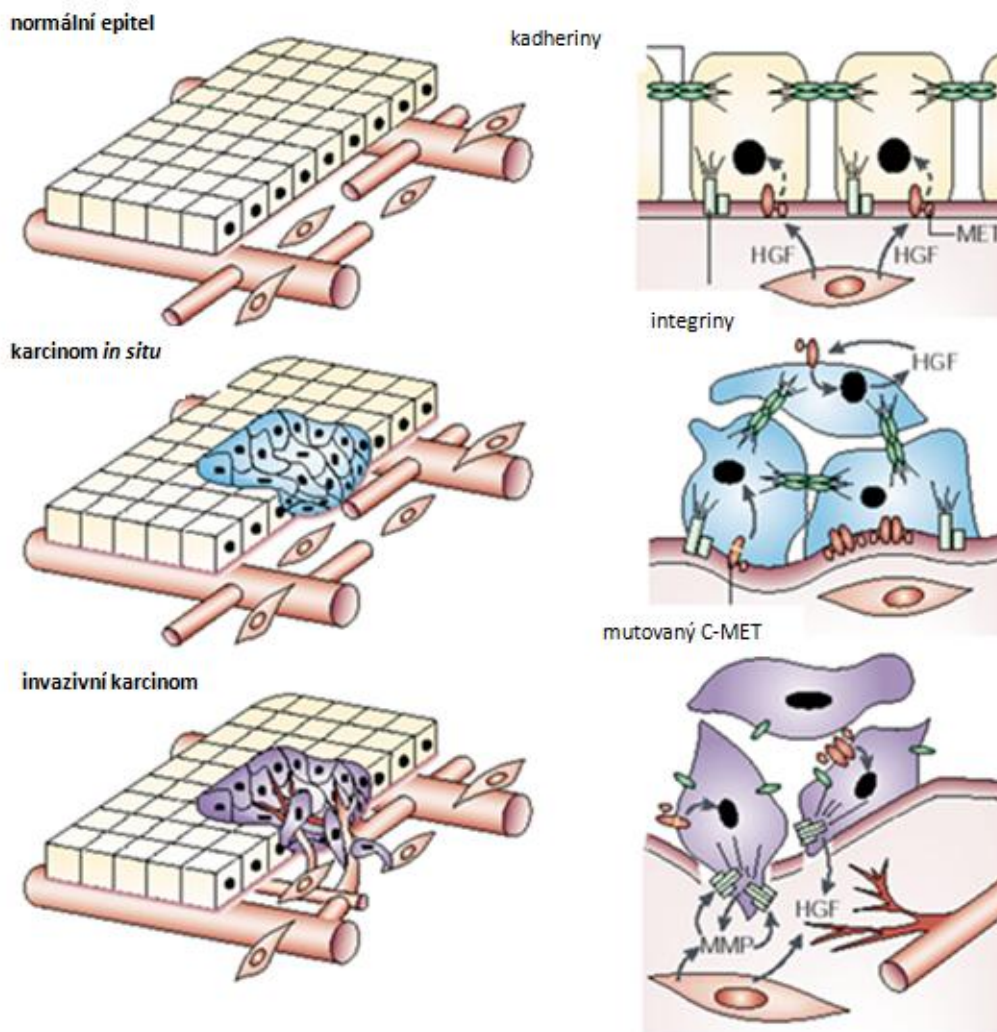
Vazbou HGF na C-MET dochází k autofosforylaci dvou tyrozinových zbytků (Y1234 a Y1356) v aktivační smyčce, která reguluje kinázovou aktivitu. Takto se zformuje multifunkční dokovací místo, na které se mohou vázat intracelulární adaptory pomocí Src „homology-2“ domény a dalších rozpoznávacích motivů, což vede k signalizaci (Corso *et al.*, 2005). Mezi adaptorové proteiny a substráty patří Grb2, Gab1, PI3K, fosfolipáza C- γ , Shc, Src, Shp2, Ship1, signální transduktor a aktivátor transkripce 3 (Gentile *et al.*, 2008). Gab a Grb2 jsou důležitými efektory a přímo interagují s receptorem. Přímá vazba Grb2 do dokovacího místa C-MET Y1356 reguluje postup buněčného cyklu. Gab1 se přímo váže na C-MET nebo nepřímo pomocí Grb2, což spouští morfogenezi v epitelálních a vaskulárních endoteliálních buňkách. Gab1 tyrosylfosforylací C-MET aktivuje druhého posla PI3K, tím dochází k postupu v buněčném cyklu, k ochraně před apoptózou a zvýšené motilitě (Rosário *et al.*, 2003). Odpovědí na HGF je prodloužená fosforylace Gab1, zatímco jiné růstové faktory způsobují rychlou přechodnou fosforylací. Prodloužená odpověď aktivuje transduktory a zapíná proces morfogeneze, viz obr. 3 (Gentile *et al.*, 2008). Tím dochází ke vzniku a vývoje nádorového onemocnění. Hlavním induktorem procesu morfogeneze je cigaretový kouř, spouští overexpresi HGF v rakovinných buňkách plic a dále diferenciaci a proliferaci buněk (Beau-Faller *et al.*, 2008).



Obr. 3: Signalizace onkogenním C-MET se nejčastěji aktivuje abnormální parakrinní stimulací HGF a následnou receptorovou overexpresí nebo autokrinní produkcí HGF, receptorovou mutací, genovou amplifikací nebo přestavbou. Zvýšená buněčná proliferace, přežití, motilita a degradace matrix jsou důsledkem aktivace drah podílejících se na nádorovém růstu, invazivitě a metastazování. Převzato z Peruzzi *et* Bottaro, 2006.

2.3.4 C-MET a adheze buněk

Během vzniku metastatického karcinomu musí vznikající nádorové buňky potlačit adhezivní síly udržující epiteliální buňky v multiceulární organizaci. Dojde k reorganizaci integrinů a ke změně vazby k bazální membráně, která epiteliální buňky dělí od okolní pojivové tkáně. Buňka vytvoří proteolytické defekty jak v bazální membráně, tak v matrix, což umožní migraci a vstup do krevního řečiště (Trusolino *et* Comoglio, 2002). Morfogenetické změny jsou shrnuty na obr. 4.



Obr. 4: Aktivace C-MET v normálním epitelu závisí na parakrinní stimulaci HGF. Epiteliální buňky začínají nekontrolovaně proliferovat kvůli mutaci C-MET, overexpresi a produkci HGF- dependentní autokrinní smyčky. Při progresi nádoru vede aktivace C-MET k rozrušení vazeb buňka-buňka a infiltraci do krevního řečiště. Převzato z Trusolino *et Comoglio*, 2002.

Intracelulární adheze je primárně zprostředkována pomocí adherentních spojů. V těchto místech je fyzické připojení realizováno transmembránovými kadheriny, které jsou připojeny k cytoskeletu kateniny. Kateniny formují lešení pod membránou, která strukturálně a funkčně spojuje kadheriny k aktinovým mikrofilamentům (Nagafuchi, 2001). HGF spouští destabilizaci adherentních spojů transkripční downregulací kadherinů (Miura *et al.*, 2001), a redistribucí kadherin-kateninových komplexů z aktinového cytoskeletu na rozpustné frakce membrány (Balkovetz *et Sambandam*, 1999). Kadherin-kateninové komplexy jsou rozpouštěny matrixovými metaloproteinázami (Davies *et al.*, 2001) nebo dochází k disrupci strukturální integrity adherentních spojů pomocí tyrozinové fosforylace kateninů (Shibamoto *et al.*, 1994).

HGF zeslabuje shlukování rakovinných buněk, usnadňuje jejich disociaci a rozptyl (Trusolino *et Comoglio*, 2002). Po uvolnění do okolí mohou nádorové buňky získat schopnost rozpoznat modifikované extracelulární prostředí pomocí vystavení univerzálních adhezivních receptorů, a to buď expresí nových integrinů nebo funkční aktivací už vystavených ale dormantních integrinů (Plow *et al.*, 2000). HGF silně ovlivňuje buněčnou strategii upregulací transkripce integrinů (Nebe *et al.*, 1998) a stimulací jejich agregace v místech bohatých na aktin bez změny počtu integrinových molekul v membráně (Trusolino *et al.*, 2000). Zmíněná pozitivní modulace syntézy integrinů anebo avidita pomůže rozeznat receptorové ligandy. To umožní rakovinným buňkám přežití a migraci, aniž by došlo ke smíchání s buňkami epiteliálního původu (Trusolino *et Comoglio*, 2002). HGF hraje důležitou roli v regulaci proteolýzy matrixovými metaloproteinázami. Toho je dosaženo zesílením transkripční hladiny velkého počtu matrixových metaloproteináz a stimulací přeměny jejich prekurzorů na aktivní formy enzymů (Rosenthal *et al.*, 2002).

2.3.5 Cílená léčba

Léčba C-MET pozitivních pacientů může být na základě znalosti C-MET signalizace rozdělena do 3 skupin: antagonismus interakce ligand-receptor, inhibice tyrozinkinázové katalytické aktivity a blokování interakcí receptor-efektor (Peruzzi *et Bottaro*, 2006). Inhibují transaktivaci receptoru a tím aktivaci efektorů. Nejčastějším léčba amplifikace/overexprese C-MET je pomocí na nízkomolekulárních kinázových inhibitorů a monoklonálních protilátek. Kinázové inhibitory jsou založeny na prevenci vazby ATP na C-MET. V současné době jsou nejdiskutovanějšími tyrozinkinázovými inhibitory crizotinib, tivantinib, cabozantinib a monoklonální protilátka s názvem onartuzumab.

Cabozantinib je duální inhibitor VEGFR2 a C-MET. Účinek kombinace cabozantinibu a erlotinibu je porovnáván s účinkem samotného erlotinibu ve fázi I/II klinické studie. Tento inhibitor inhibuje angiogenezi a metastáze u NSCLC vykazujícího deregulaci C-MET. Dalším inhibitorem je tivantinib, který je ve fázi III klinického testování. Sequist *et al.* vydali v roce 2011 studii o klinické fázi II zahrnující 167 pacientů s NSCLC. Pacientům byl podáván erlotinib+tivantinib (ET) a erlotinib+placebo (EP). Období bez známek progresu bylo u ET 3,8 měsíce a u EP 2,3 měsíce. U pacientů léčených ET byla značně prodloužena doba vzniku nových metastáz (7,3 vs. 3,6 měsíců). Dále byla pozorována lepší odpověď pacientů s mutacemi v KRAS léčených ET v porovnání s EP. Ze 167 pacientů byli 2 pacienti s pravou amplifikací v C-MET a zvýšený počet kopií (≥ 4 kopie/buňku) byl nalezen u 37 pacientů. Účinek ET se zvyšoval s počtem kopií pro C-MET. Kombinace erlotinibu a tivantinibu může prodloužit období bez známek progresu, prodloužit přežití a čas vzniku

metastází v porovnání s erlotinibem samotným. Dalším léčivem je crizotinib, ten je v současné době ve fázi I/II klinické studie. Sleduje se účinek erlotinibu v kombinaci s crizotinibem v porovnání se samotným erlotinibem. Onartuzumab je ve fázi III klinického testování, jeho účinky byly potvrzeny ve fázi II klinického testování, kde bylo období bez známek progresu (PFS) 2,9 měsíců u skupiny s onartuzumabem vs. 1,5 měsíce u skupiny, která obdržela erlotinib+placebo (u C-MET pozitivní skupiny). Další klinické studie probíhají v kombinaci s erlotinibem, bevacizumabem/pemetrexed a paclitaxelem s platinou (shrnuto v Koudeláková *et al.*, 2013).

2.4 EML4 - ALK (echinoderm microtubule-associated protein-like 4 – anaplastic lymfoma kinase)

Poprvé byl EML4 popsán Heidebrechtem *et al.* v roce 2000, když našel overexpresi EML4/ROPP120 během mitózy. EML4 leží na chromozomu 2p21 a řadí se do rodiny „echinoderm microtubule associated protein-like“ proteinů lokalizovaných v cytoplazmě. EML4 má velikost 120 kDa (Pollmann *et al.*, 2006) a je mu připisována základní role v proliferaci buněk a v buněčném přežití (Radtke *et al.*, 2010). Je nezbytný pro správný vznik mikrotubulů (Inamura *et al.*, 2008) a sestavení vřeténka u nově vznikajících buněk. Supresí EML4 transkripce pomocí RNA interference dochází k dramatickému snížení proliferace už po 72 h od transfekce a zároveň dochází ke zvýšení počtu apoptotických buněk (Pollmann *et al.*, 2006).

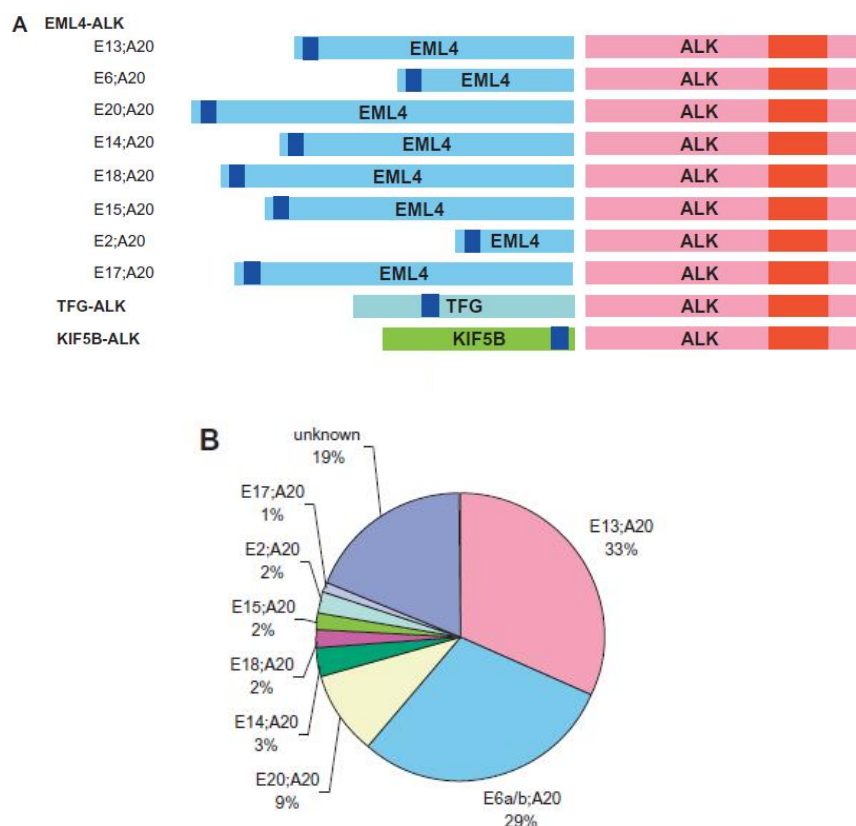
ALK byl poprvé objeven ve fúzním genu s nukleofosminem NPM1 u anaplastického velkobuněčného lymfomu, což dalo tomuto genu název (Morris *et al.*, 1994). ALK leží v chromozomální oblasti 2p23, kóduje tyrozin kinázový receptor a je členem inzulinové superrodiny. ALK je fyziologicky exprimována jen v nervovém systému, tenkém střevě a varlatech (Reungwetwattana *et al.*, 2012). ALK a EML4 se vyskytují na krátkém rameni chromozomu 2, jsou odděleny 12 Mb a jsou orientovány opačnými směry (Koivunen *et al.*, 2008).

Fúzní gen EML4-ALK poprvé popsali Soda a kol. v roce 2007 pomocí tvorby retrovirální komplementární cDNA expresní knihovny ze vzorku adenokarcinomu plic. Jedna z amplifikovaných cDNA měla délku 3 946 bp a obsahovala otevřený čtecí rámec pro protein tvořený 1 059 aminokyselinami. Tento protein měl aminoterminální část shodnou s lidským EML4 a karboxyterminální část odpovídala intracelulární doméně lidské ALK. cDNA byla odvozena z fúzního produktu genů EML4 a ALK. Fúze EML4-ALK vznikla na základě malé inverze krátkého ramene chromozomu 2. Transformující potenciál fúzního genu EML4-ALK byl demonstrován za použití plazmidů pro EML4-ALK, které byly

přeneseny do myších fibroblastů 3T3. U myší byly transfekované 3T3 buňky dokonce schopny formovat podkožní tumory. Na základě této práce byl fúzní transkript EML4-ALK detekován u 5 ze 75 NSCLC pacientů, tj. 6,7 %. Zpočátku se předpokládalo, že fúze EML4-ALK se vyskytuje jen u NSCLC. Avšak pomocí RT-PCR bylo prokázáno, že EML4-ALK fúze je detekována u 2,4 % karcinomu prsu, 2,4 % kolorektálního karcinomu a 4 % NSCLC. Fúzní gen EML4-ALK často doprovází mutace v EGFR a KRAS (Brandao *et al.*, 2012).

2.4.1 Varianty inverzí/translokací

K inverzi nedochází pokaždé na stejných místech, proto vzniká množství variant EML4-ALK (obr. 5). Varianty vždy obsahují intracelulární tyrozinkinázovou doménu ALK od exonu 20 až 29 (Takeuchi *et al.*, 2008). EML4 je variabilně připojen a vznikají tím různé varianty EML4-ALK. Tzv. coiled-coil doména uvnitř EML4 je přítomná u všech variant, je nezbytná a dostačující pro transformující aktivitu EML4-ALK. Zřejmě je to způsobeno díky dimerizaci fúzního proteinu.

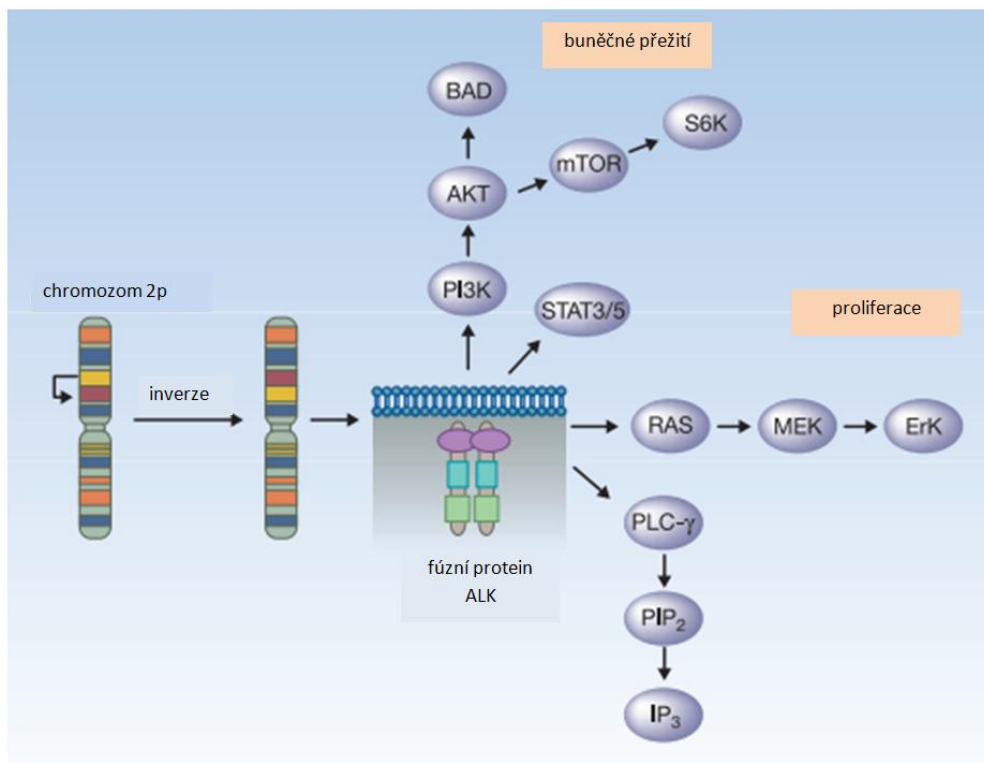


Obr. 5: Různé varianty EML4-ALK a dalších fúzních partnerů. A – různé varianty EML4-ALK, nomenklatura odkazuje k translokovanému exonu EML4 do exonu ALK. B – frekvence různých EML4-ALK variant. Převzato z Sasaki *et al.*, 2010.

Dosud bylo objeveno více než 13 variant ALK přestaveb a většina z nich je onkogenních. Nejčastější variantou inverze je E13;A20 a E6a/b;A20 – tj. varianty 1 a 3a/b. Tyto dvě varianty EML4-ALK byly detekovány u 33 % a 29 % pacientů s NSCLC. ALK je však schopno fúzovat nejen s EML4, ale také s TGF, KIF5B, KLC1 a tyto proteiny také fúzují s intracelulární doménou ALK (Sasaki *et al.*, 2010 a Togashi *et al.*, 2012). Několik EML4-ALK fúzních variant i fúzní partneri, jako je například KIF5B, bylo popsáno u NSCLC a vykazují transformující aktivitu (Brandao, 2012).

2.4.2 Signalizace

ALK se skládá jako všechny kinázy z intracelulární domény vázající ligand, transmembránové oblasti a intracelulární domény. Za fyziologických podmínek indukuje ligand homodimerizaci ALK vedoucí k transfosforylaci a kinázové aktivaci (Shaw *et al.*, 2011). Inverze chromozomu 2p vede k vytvoření EML4-ALK fúzního onkogenu (obr. 6). Kódující protein obsahuje N-terminální konec EML4 a intracelulární katalytickou doménu z ALK. Nahrazení extracelulární a transmembránové domény ALK oblastí EML4 má za následek dimerizaci kinázové domény bez aktivace ligandu a tudíž zvýšení její katalytické aktivity (Soda *et al.*, 2007). Tato translokace způsobuje aktivaci downstreamových onkogenních signálních drah, jakými jsou aktivace STAT3, AKT/PI3K a RAS/ERK drah, které řídí buněčnou proliferaci, přežití a buněčný cyklus (Mossé *et al.*, 2009).

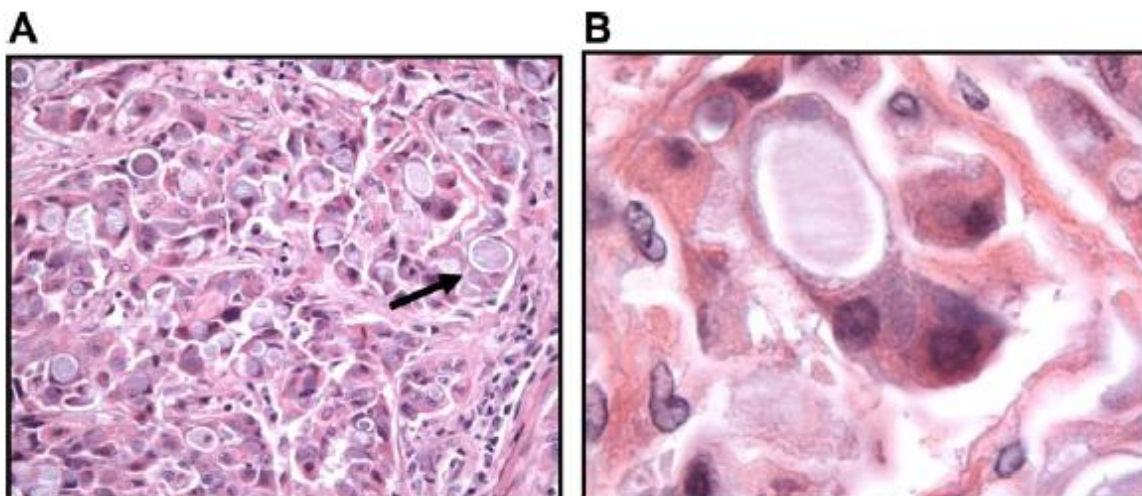


Obr. 6: Schématický vznik EML4-ALK fúzního onkogenu a jeho dowstreamové signální dráhy. Vznik EML4-ALK inverzí chromozomu 2p. Fúzní protein je exprimován a aktivuje signální dráhy, jako jsou Ras/Mek/Erk a PI3K/Akt. Úloha STAT3 signální dráhy u EML4-ALK pozitivního NSCLC je dosud neznámá. Převzato z Shaw *et al.*, 2011.

2.4.3 Znaky nádoru s ALK přestavbou

Typický pacient s EML4-ALK přestavbou má adenokarcinom, je nekuřák nebo lehký kuřák a má nižší věk než typický pacient s karcinomem plic (Sasaki *et al.*, 2010). Existují i výjimky. Fúze ALK byla detekována i u starších pacientů (76 let) s kuřáckou minulostí (Rodig *et al.*, 2009). ALK přestavba je také ve většině případů mutačně exkluzivní s mutací EGFR s KRAS.

Adenokarcinomy s EML4-ALK přestavbou jsou histologicky velmi různorodé, obsahující od acinárních až po dokonale kulaté buněčné shluky s produkcí hlenu. Acinární uspořádání je nejčastější u adenokarcinomů asijské populace, zatímco kulovité buňky se vyskytují u kavkazské populace. Pacienti ze západních zemí vykazují nádorové buňky se vzory podobným listům, které jsou jednoduše odlišitelné od acinárního, papilárního a bronchoalveolárního schématu. Nádory s přestavbou EML4-ALK jsou charakterizovány buňkami s přebytkem intracelulárního mucinu a malým jádrem odsunutým ze středu. Většina nádorů s přestavbou ALK (>60 %) má znaky růstu solidního nádoru s >10 % kulatými („signet ring“) buňkami znázorněnými na obr. 7 (Sasaki *et al.*, 2010).

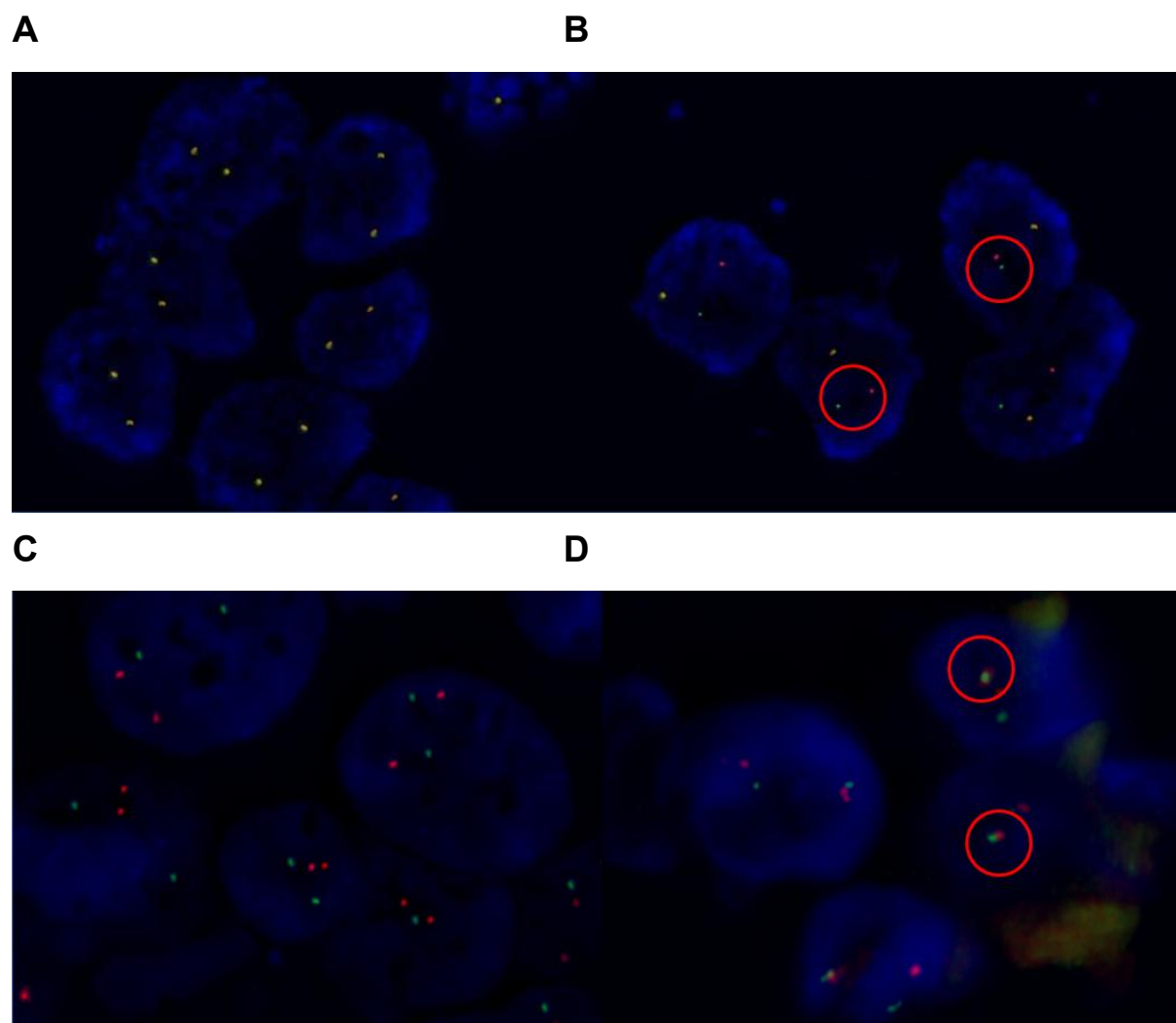


Obr. 7: Patologická charakteristika EML4-ALK u NSCLC. NSCLC je charakterizováno buňkami ve tvaru prstence (signet ring: viz šipka): A - zvětšení 40x, B - zvětšení 1000x. Převzato z Sasaki *et al.*, 2010.

2.4.4 Diagnostika

Pro detekci EML4-ALK přestavby u NSCLC se využívá nejčastěji reverzní transkripční PCR (RT-PCR), imunohistochemie (IHC) a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). RT-PCR je využívána pro extrémní citlivost při detekci mutovaného transkriptu. Avšak jak již bylo zmíněno, existuje více než 13 variant, a proto musí být RT-PCR multiplexní a obsahovat primery pro všechny varianty. Problémem této detekce je uchování biopsie pacientů. Běžně je bioptovaná tkáň fixována formalínem a zalita do parafínového bloku („FFPE tissue“). RNA izolovaná z tohoto materiálu je vysoce degradována a není pro PCR metodiku nejvhodnější. Další metodou je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), využívající hybridizace fluorescenčně značených DNA sond (prób) na cílovou DNA vyšetřovaného vzorku. Na testování se využívají break-apart či translokační próby. Při použití break-apart sondy je gen ALK označen z každé strany zlomu nahybridizovanou sondou s jiným fluoroforem (např. Spectrum Orange a Spectrum Green). Fyziologický ALK lze tedy pozorovat jako dvoubarevnou „dvojtečku“. Dojde-li k rozštěpení ALK, signály se od sebe oddálí a lze je pozorovat odděleně (obr.8 A, B). Druhým typem je translokační sonda: při jejím použití lze detekovat pouze zvolený typ translokace. ALK gen a translokační partner (v 99 % EML4) jsou označeni nahybridizováním sond s různými fluorofory. Ve fyziologickém vzorku lze signály těchto sond pozorovat odděleně. Dojde-li k translokaci, oba translokační partneři se k sobě přiblíží a signály tvoří dvojtečku (obr. 8 C, D). IHC využívá vazby protilátek na tumor-specifické antigeny (Sasaki *et al.*, 2010). Citlivost imunohistochemické analýzy závisí na faktorech, kterými jsou klon protilátky a použitá

detekční metoda (Brandao *et al.*, 2012). IHC metoda má výhody jako jsou nízké náklady, jednoduchost a teoretické stanovení všech variant. Wallander *et al.* však popisuje, že komerční protilátky postrádají citlivost k detekci EML4-ALK fúzního proteinu - hlavně u varianty 1. To je zřejmě způsobeno menší mírou exprese než u varianty 3. V současné době je pro indikaci cílené léčby doporučena detekce ALK přestavby pomocí FISH.



Obr. 8: Detekce fúzního genu EML4-ALK pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. A,B- break apart sonda: A- genotyp bez přestavby; B- přestavba genu EML4-ALK. C, D: translokační sonda: C- fyziologický stav, D- translokace EML4-ALK. Převzato z Koudeláková *et al.*, 2012.

2.4.5 Léčba a prognóza

Průměrné přežití pacientů s neléčeným metastazujícím NSCLC je jen 4 až 5 měsíců; pouze 10 % pacientů žije déle než 1 rok. Chemoterapie u pokročilého NSCLC je často považována za neefektivní nebo dokonce příliš toxickou. Avšak analýzy ukázaly, že v porovnání s podpůrnou léčbou poskytuje chemoterapie vyšší přežití pacientů s pokročilým

stádiem NSCLC. Chemoterapie redukuje symptomy a zlepšuje kvalitu života (Schiller *et al.*, 2002).

Ačkoli je hlavním pilířem léčby NSCLC cytotoxická terapie, hrají zde čím dál větší roli tyrozin kinázové inhibitory. Farmakologická inhibice EML4-ALK využívá inhibitory k downregulaci Ras/Mek/Erk, PI3/Akt a k apoptóze. EML4-ALK translokace se vyskytují často společně s EGFR nebo KRAS mutacemi. Tento výskyt má za následek rezistenci a špatnou odpověď na EGFR tyrozinkinázové inhibitory (Shaw *et al.*, 2009). Crizotinib je duální inhibitor fosforylace ALK a C-MET, který má slibné výsledky v léčbě pacientů s tumory vykazujícími přestavbu ALK. V druhé fázi testování bylo pacientům podáváno 250 mg tohoto léčiva dvakrát denně ve 3-týdenním cyklu. Přežití jednoho roku bylo dosaženo u 74 % pacientů a přežití dvou let u 54 % pacientů (Shaw *et al.*, 2011). Na základě pozitivních výsledků léčby byl crizotinib v roce 2012 schválen v Evropě jako léčivý přípravek NSCLC se zvýšenou expresí ALK.

2.5 EGFR (receptor epidermálního růstového faktoru)

EGFR patří spolu s HER2 (c-erbB-2), HER3 (c-erbB-3), a HER (c-erbB-4) do rodiny c-erbB (HER) receptorů. EGFR je 170 kDa glykoprotein skládající se z extracelulární transmembránové a intracelulární domény s tyrosinkinázovou funkcí (Yarden *et al.*, 2001). EGFR je specifický tyrozinkinázový receptor, jehož gen je umístěn v chromozomální oblasti 7p12 (RefSeq). EGFR byl objeven v roce 1975, v 80. letech byl osekvenován a poté označen jako tyrozinkinázový receptor (shrnuto v Brand *et al.*, 2011). Patologická aktivace overexpresí, mutací a/nebo iniciací autokrinní produkce ligandu, hraje důležitou roli v karcinogenezi a progresi nádoru. Mutace genu EGFR se pojí s buněčnou proliferací, buněčným růstem, invazivitou, metastatickým šířením, apoptózou a nádorovou angiogenezí (Brandao *et al.*, 2012). Overexprese EGFR se vyskytuje u většiny solidních tumorů včetně karcinomu prsu, krku a hlavy, NSCLC, ledvin, vaječníků a střev (Herbst *et al.*, 2002). Overexprese receptoru se v malé míře vyskytuje i u karcinomu močového měchýře, slinivky břišní a gliomu (Salomon *et al.*, 1995). Vlivem zmnožení receptorů EGFR je generován signál a aktivovány downstreamové signální dráhy, což způsobuje agresivní a invazivní růst buňky (Ethier, 2002). U NSCLC dochází v závislosti na histologii ve 40-80 % případů k overexpresi EGFR (Fujino *et al.*, 1996). Dále dochází asi v 10 % případů k mutacím v EGFR u pacientů s NSCLC (Paez *et al.*, 2004).

K dalším ligandům vázajícím se na EGFR patří transformující růstový faktor- α , amphiregulin, heparin-vazebný EGF a betacelulin (Salomon *et al.*, 1995). Po navázání ligandu dochází na povrchu buňky k homodimerizaci nebo k heterodimerizaci, nejčastěji

s HER2 (Bazley *et al.*, 2005), k autofosforylaci intracelulární domény EGFR (Franklin *et al.*, 2002) a ke spuštění signální dráhy do buňky (Herbst, 2004).

2.5.1 Struktura

Extracelulární doména obsahuje dvě domény bohaté na cystein (C1 a C2) a dvě domény bohaté na leucin (L1 a L2). Spolu tvoří ligand vazebnou doménu s délkou cca 620 aminokyselin. Intracelulární doména má délku 542 aminokyselin a obsahuje juxtamembránovou doménu sloužící primárně jako místo zpětnovazebného oslabování proteinkinázou C a ERK MAP kinázami. Je prokázáno, že motiv v této oblasti může vázat i G proteiny (Sun *et al.*, 1997). Na tuto část navazuje asi 250 aminokyselin dlouhá tyrozinkinázová doména. Její karboxyterminální část obsahuje pět autofosforylačních motivů, které spojují proteiny obsahující SH2 a PTB domény. Karboxyterminální část funguje také jako autoinhibiční substrát - při nedostatku nebo odstranění její části není ligandem aktivovaný EGFR schopen fosforylovat substrát (Songyang *et al.*, 1993).

2.5.2 Mutace

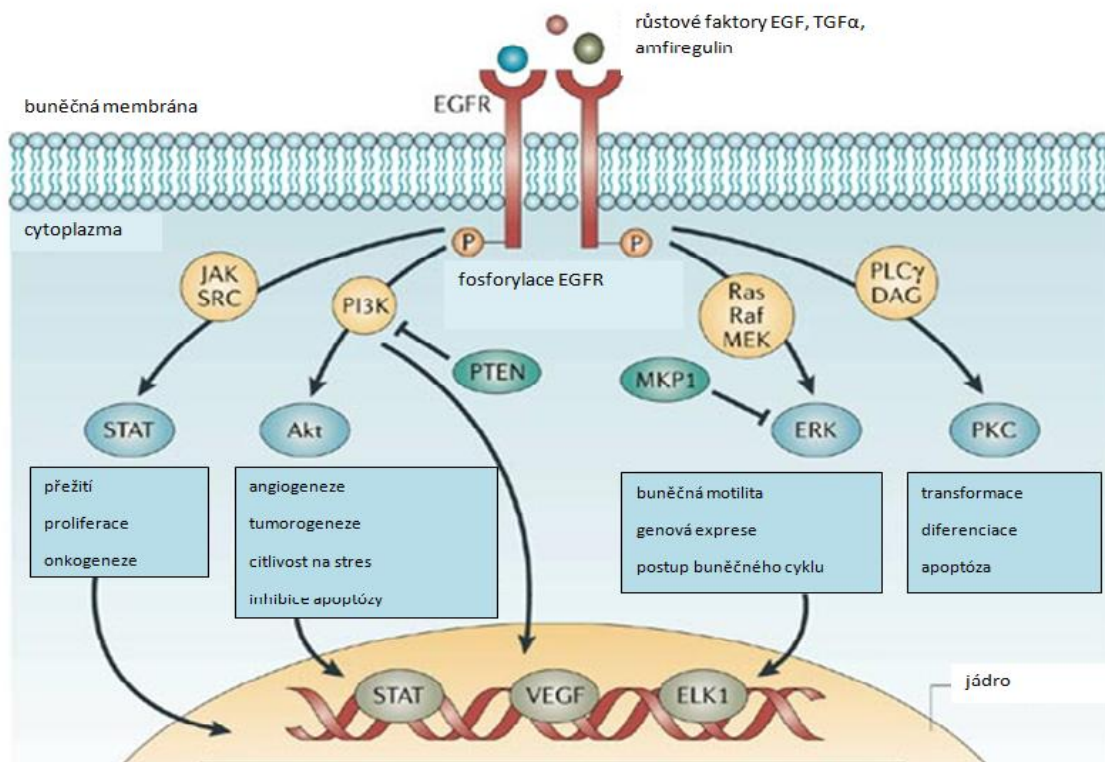
Z důvodu jejich vztahu ke klinické odpovědi na tyrozinkinázové inhibitory jsou mutace EGFR nejlépe charakterizované mutace u NSCLC. Mutace v tomto místě se nazývají aktivačními mutacemi, protože vedou k ligand-independentní aktivaci EGFR receptoru. Aktivační mutace jsou mnohem častější u Asiatických, nekuřáckých a pacientek a s adenokarcinomem (Jänne *et al.*, 2006). Aktivační mutace v genu pro EGFR byly nalezeny v prvních čtyřech exonech (18-21) tyrozinkinázové domény (Shigematsu *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008). Tyto mutace se dělí do tří skupin. První skupinou jsou in frame delece v exonu 19, ten kóduje část kinázové domény. Druhou skupinou jsou jednonukleotidové substituce, které způsobují záměnu aminokyselin. Převažující jednonukleotidová mutace se nachází v exonu 21, kde dochází k substituci argininu za leucin na kodonu 858 a čítá asi 41 % EGFR tyrozinkinázových mutací. Další mutací druhé skupiny je záměna glycinu-719 za serin, alanin nebo cystein se zhruba 4% výskytem. Další missense mutací je asi 6 %. Třetí skupinou mutací jsou rámcové duplikace anebo inserce v exonu 20 čítající 5 % (Sharma *et al.*, 2007). Nejvýznamnější sekundární mutací je záměna threoninu za metionin v exonu 20 z treoninu na metionin. Její označení je T790M a je spojena s rezistencí na EGFR tyrozinkinázové inhibitory - gefitinib a erlotinib. Zmíněná mutace je umístěna v ATP-vazebné kapse, která je kritickým místem vazby inhibitoru, a proto je tato vazba oslabena (Kobayashi *et al.*, 2005).

Dalším typem patologické aktivace EGFR může být amplifikace genu. Amplifikace EGFR jsou spojeny s vysokým stupněm rakoviny a jejich výskyt je málo častý u primárních lézí rakoviny (Yatabe *et al.*, 2008). EGFR mutace jsou častým fenoménem a amplifikace EGFR se může vyskytnout během progresu rakoviny. Asi 30 % až 60 % pacientů s pokročilým NSCLC vykazuje zvýšený počet EGFR (Reungwetwattana *et al.*, 2012) - v případě kdy je poměr genu EGFR ku chromozomu 7 \geq 2,1 (Hirsch *et al.*, 2003). Nejnovější studie prokazují, že vysoká amplifikace genu EGFR je spojena s dobrou odezvou na tyrozinkinázové inhibitory (Wang *et al.*, 2013).

V dnešní době se k vyšetření EGFR amplifikací nejčastěji používá FISH metoda. Zvýšené množství kopií EGFR je spojeno s dobrou odpovědí na tyrozinkinázové receptory, zastavením progresu nádoru a přežitím pacienta. Liang *et al.* potvrdili spojitost mezi počtem kopií EGFR a mutacemi v tomto genu. Dále prokázali, že exprese proteinu pro EGFR koreluje s počtem kopií EGFR a jeho mutacemi (Liang *et al.*, 2010).

2.5.3 Signalizace

Signální diverzita je u EGFR způsobena vysokým počtem EGFR členů, velkým repertoárem ligandů a kombinačními možnostmi dimerizace receptorů. Buňky NSCLC produkují a uvolňují mnoho ligandů EGFR (Volante *et al.*, 2007). Izoformy umístěné v membráně a rozpustné růstové faktory mohou za určitých podmínek fungovat také jako biologicky aktivní ligandy. Právě tyto ligandy mohou indukovat autokrinní, parakrinní anebo endokrinní signalizaci (Singh *et al.*, 2005). U NSCLC je nejčastěji overexprimován epiregulin (Zhang *et al.*, 2008), vazbou na EGFR následuje aktivace receptoru, receptorová dimerizace, aktivace intracelulární tyrozinkinázy a signalizace. Abnormální aktivace EGFR a signalizace do buňky je několikastupňová signální síť, jejíž výsledkem je proliferace buněk, apoptóza, angiogeneze a metastáze. Existuje několik mechanismů vedoucích ke stálé aktivaci receptoru - overexprese a mutace receptoru, ligand-dependentní a ligand-independentní mechanismy, konečná fosforylace klíčových tyrozinových zbytků a aktivace cytoplazmatických substrátů (shrnutí v Lurje *et al.*, 2009). Tyto pochody jsou prováděny aktivací drah Ras/Raf/MEK, PLC γ , PI3K/Akt a STAT (Nyati *et al.*, 2006). Dráhy způsobující transformační změny buněk u NSCLC jsou shrnuty na níže uvedeném obr. 9.

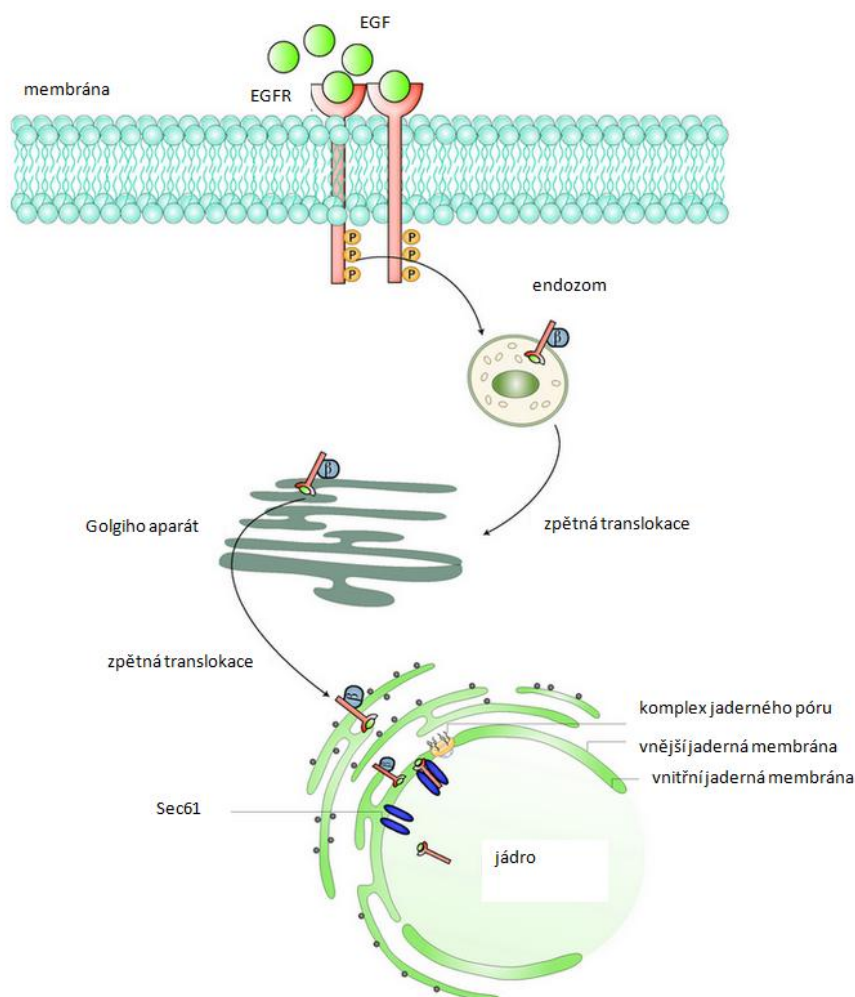


Obr. 9: Shrnutí buněčných drah, které jsou iniciovány vazbou ligandu na EGFR a jejich účinek na buňku. Převzato z Nyati *et al.*, 2006.

2.5.4 Translokace EGFR do jádra

Jaderná lokalizace EGFR byla poprvé popsána v regenerujících hepatocytech u primárního adenokarcinomu. Vysoká hladina EGFR v jádře byla detekována i u dalších nádorů jakými jsou například rakovina kůže, prsu, močového měchýře, děložního čípku, adrenokortikoidního karcinomu, štítné žlázy a dutiny ústní (shrnuto v Brand *et al.*, 2011). Přesný mechanismus endocytózy EGFR z cytoplazmatické membrány do jádra není dosud zcela prozkoumán. Jaderné lokalizační sekvence jsou umístěny v intracelulární části a jejich další využití je při internalizaci receptoru (Hsu *et al.*, 2007). Mezistupeň přenosu je přechod přes Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum (Wang *et al.*, 2010). Internalizace EGFR a jeho transport do jádra probíhá častěji než jeho degradace nebo zpětná recyklace na buněčný povrch. Spojkou je PI3kyve, která řídí endozomální dynamiku a intracelulární přenos EGFR do buňky (Ikononov *et al.*, 2003). Následuje klasický cytoplazmaticko-nukleární transport, kde proteiny obsahující jaderné lokalizační sekvence formují komplexy s importiny. Ty interagují s nukleoporiny a vazbou importinu do Sec61 na vnitřní jaderné membráně dochází ke vstupu do jádra (Harel *et al.*, 2004). EGFR neobsahuje DNA vazebnou doménu, a proto se váže na jiné transkripční faktory. Bylo zjištěno, že EGFR

funguje jako koaktivátor minimálně sedmi genů podporujících vznik onkologického onemocnění - cyklinu D1, NO syntázy, B-Myb, aurora kinázy A, cyklooxygenázy 2, c-Myc a breast cancer resistant proteinu BCRP (Brand *et al.*, 2011).



Obr. 10: Shrnutí přesunu EGFR do jádra. Převzato z Brand *et al.*, 2011.

2.5.5 Léčba a prognóza

Nádory s patologicky aktivovaným EGFR se častěji vyskytují u Asiatů než u neasijské rasy (30 % vs. 8 %), u žen než u mužů (59 % vs. 26 %), u nekuřáků než u kuřáků (66 % vs. 22 %) a u adenokarcinomů než u ostatních podtypů NSCLC (49 % vs. 2 %) (Brandao *et al.*, 2012).

Léčba EGFR pozitivních pacientů se dělí na dvě hlavní kategorie. První kategorií jsou humanizované formy monoklonálních protilátek, které zabraňují vazbě ligand-receptor. Druhou kategorií jsou malé molekulární inhibitory tyrozinkináz. Monoklonální protilátky se vážou na extracelulární doménu, a tím zabraňují vazbě ligandu na receptor (Baselga,

2002). Tyrozinkinázové inhibitory erlotinib a gefitinib se reverzibilně vážou do ATP vazebné kapsy. Tím zabraňují vazbě ATP a fosforylaci a signalizaci do buňky (Gazar *et* Mina, 2005).

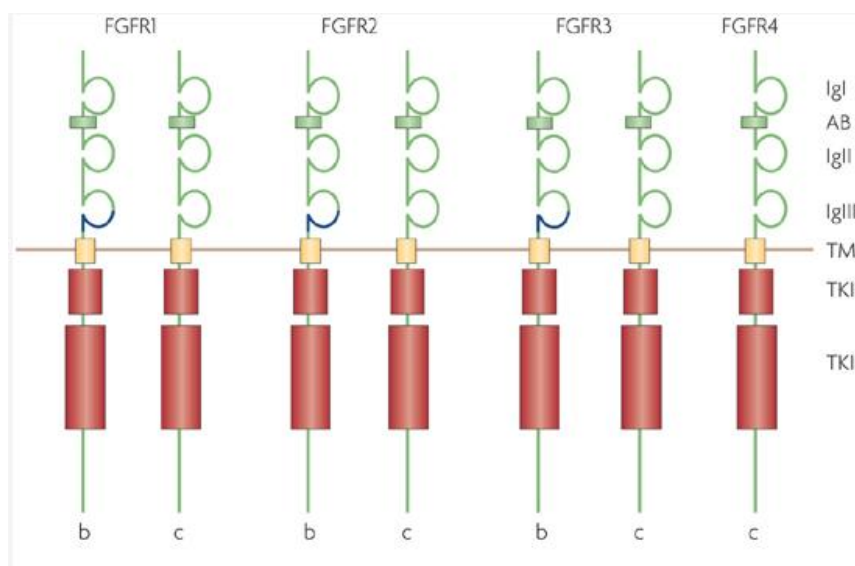
Všechny somaticky aktivované mutace EGFR se vyskytují v ATP-vazebné kapse v tyrozinkinázové doméně, což je vazebné místo tyrozinkinázových inhibitorů, kterými jsou erlotinib a gefitinib. Gefitinib byl v červnu 2009 schválen jako léčivo pro pacienty s aktivačními mutacemi v EGFR. Objektivní odpovědi byly popsány u 10 - 20 % pacientů v klinických testech (Miller *et al.*, 2004). Erlotinib vykazuje protinádorovou aktivitu v preklinických studiích fáze I, II a III. Erlotinib byl v roce 2004 poprvé oficiálně použit jako léčba EGFR pozitivních nádorů. Přežití jednoho roku bylo u erlotinibu stanoveno na 31 % (shrnutí v Koudeláková *et al.*, 2013). Ačkoli malé molekuly, gefitinib a erlotinib snižují tyrozinkinázovou aktivitu EGFR a mají velkou účinnost (Sharma *et al.*, 2007), dochází u pacientů během 6 měsíců až dvou let k vyvinutí získané rezistence (Oxnard *et al.*, 2011). Okolo 50 % pacientů s NSCLC, kteří byli léčeni v první linii, si vyvinulo rezistenci na léčivo vznikem sekundární missens mutace v tyrozinkinázové doméně EGFR. Nejčastější mutací (>90 %) je substituce T790M, která byla popsána již výše. I některé další mutace jako D761Y a T854A způsobují rezistenci na první generaci tyrozinkinázových inhibitorů (shrnutí v Ma *et al.*, 2012).

2.6 FGFR (receptor fibroblastového růstového faktoru)

FGFR je tyrozinkinázový receptor, jehož ligand patří do rodiny fibroblastových růstových faktorů, jež jsou zapojeny do mnoha fyziologických procesů včetně angiogeneze, organogeneze, vývoje tkání a endokrinní signalizace (Beenken *et* Mohhamadi, 2009). Gen pro FGFR1 leží v chromozomální oblasti 8p12. Ve 20 % případů je vysoká exprese FGFR1 spojována se zvýšeným počtem kopií genů FGFR1 u SCC u kuřáků (Kohler *et al.*, 2012). V několika případech jsou uváděny bodové mutace ve FGFR2 u SCC (Davies *et al.*, 2005). Signalizace pomocí FGFR je zapojena do autokrinní signalizační smyčky, která vede k proliferaci nádorů a jejich angiogenezi (Marek *et al.*, 2009). Disregulovaná signalizace byla nalezena také u několika malignit. Amplifikace, bodové mutace nebo translokace přispívají ke karcinogenezi zvýšenou proliferací, antiapoptózou, buněčnou migrací a angiogenezí (Turner *et* Grose, 2010).

2.6.1 Struktura

FGFR tyrozinkinázy jsou kódovány 4 geny (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4), avšak z důvodu existence alternativního mRNA splicingu se objevuje i mnoho izoform ilustrovaných na obr. 11 (Beenken *et* Mohhamadi, 2009). FGFR1 až FGFR4 se skládají z extracelulární ligand vazebné domény, transmembránové domény a cytoplazmatické domény, která obsahuje katalytické tyrozinkinázové jádro spolu s regulačními sekvencemi (Schlessinger, 2000). Extracelulární doména je složena z 2 až 3 imunoglobulinu podobných vazebných smyček (Grose *et* Dickson, 2005) označených jako D1 - D3. Mezi D1 a D2 je sedm až osm kyselých zbytků nazývaných "kyselý box". Jedná se o konzervovaně pozitivně nabitou oblast (Schlessinger *et al.*, 2000). Cytoplazmatická doména FGFR obsahuje několik regulačních sekvencí. Juxtamembránová doména je mnohem delší než u jiných tyrozinkináz. Tato oblast obsahuje vysoce konzervované sekvence, které slouží jako vazebné místo pro fosfotyrozinvazebné domény proteinů FRS2 α a FRS2 β (Ong *et al.*, 2000).

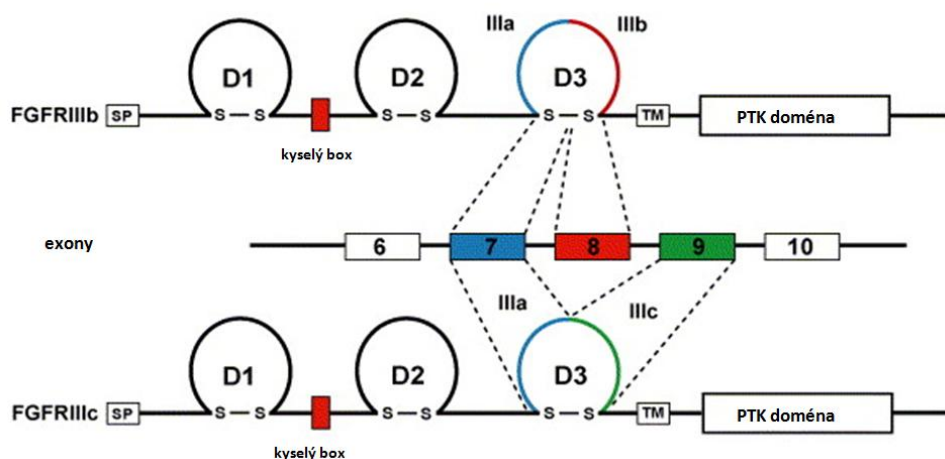


Obr. 11: Isoformy vyskytující se u obratlovců. Extracelulární doména se skládá ze tří imunoglobulinových smyček (Igl-III) a "kyselého boxu" (AB). Alternativní splicing u IglIII je zvýrazněn modrou barvou. Následuje transmembránová doména (TM) a intracelulární sekvence enzymatické části tyrozinkinázy (TKI, TKII). Převzato z Mason, 2007.

První FGF byl objeven jako mitogen pro kultivované fibroblasty (Gospodarowicz, 1974). Existuje 18 savčích FGF, které jsou na základě homologie a fylogeneze uskupeny do 6 podrodin. Během embryonálního vývoje a v dospělém organismu zprostředkovává FGF mnoho buněčných odpovědí. V morfogenezi hraje roli u embryonálního vývoje tím, že reguluje vývoj nervového systému, buněčnou proliferaci, diferenciaci a buněčnou migraci. V dospělém organismu reguluje opravu tkání, hojení ran a angiogenezi u nádorů (Beenken *et* Mohammadi, 2009).

2.6.2 Varianty

Různé FGFR izoformy obsahují extracelulární doménu se dvěma nebo třemi imunoglobulinům podobnými doménami. Rozpustné sekretované izoformy, stejně jako alternativní splicing ve třetí imunoglobulinům podobné doméně D3, mění ligand vazebnou specifitu (Yayon *et al.*, 1992). Alternativní sestřih D3 existuje u FGFR1-3, ale nevyskytuje se u FGFR4. Exon 7 u FGFR2 genu kóduje N-terminální polovinu D3 (značí se jako izoforma a), zatímco exony 8 a 9 alternativně kódují C-terminální polovinu D3 (značí se jako izoforma b a c). Alternativní splicing a vznik různých izoforem jsou ilustrovány na obr. 12.



Obr. 12: FGFR izoformy jsou vytvářeny na základě alternativního splicingu FGFR transkriptu. Dvě izoformy FGFR jsou generovány na základě alternativního splicingu exonu 8 a 9. C-terminální polovina D3 je kódována exonem 8 a vytváří FGFR-IIIb izoformu. Zatímco C-terminální polovina DIII je kódována exonem 9 a vytváří FGFR-IIIc izoformu. Převzato z Eswarakumar *et al.*, 2005.

Dvě alternativní formy FGFR vykazují různé ligand vazebné charakteristiky. Například FGFR2b váže FGF7 a FGF10, ale už neváže FGF2; FGFR2c izoforma váže FGF2 a FGF18, avšak již neváže FGF7 a FGF10. Tabulka I shrnuje možné ligandy různých EGFR.

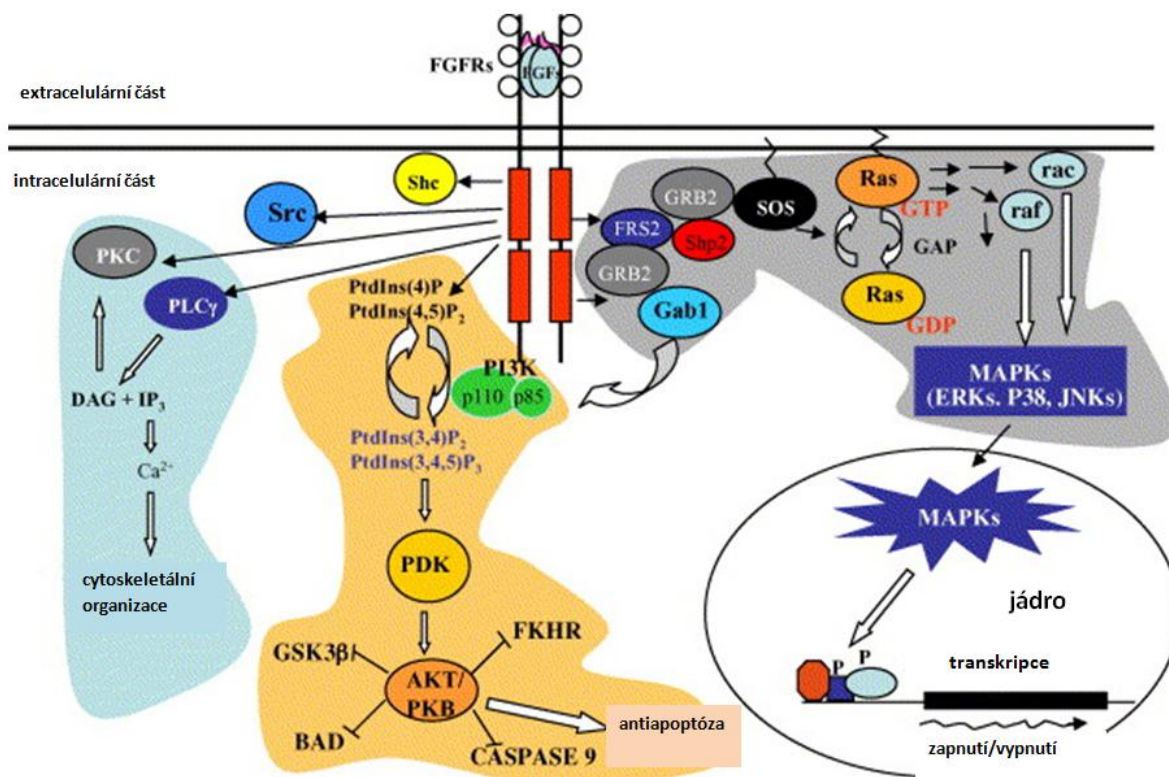
Tab. I: Izoformy FGFR mají afinitu k různým FGF ligandům. Převzato z Eswarakumar *et al.*, 2005

FGFR izoforma	specifita ligandu
FGFR1b	FGF1, -2, -3, -10
FGFR1c	FGF1, -2, -4, -5, -6
FGFR2b	FGF1, -3, -7, -10, -22
FGFR2c	FGF1, -2, -4, -6, -9, -17, -18
FGFR3b	FGF1, -9
FGFR3c	FGF1, -2, -4, -8, -9, -17, -18, -23
FGFR4	FGF1, -2, -4, -6, -8, -9, -16, -17, -18, -19

Bylo dokázáno, že izoforma FGFR2b je exprimována jen u epiteliálních buněk a FGFR2c jen u mezenchymálních buněk (Orr-Urtreger *et al.*, 1993). Tato exprese je specifická pro určité buněčné linie a umožňuje interakce mezi epiteliálními a mezenchymálními vrstvami během vývoje jako odpověď na ligandy FGF.

2.6.3 Signalizace

Po navázání ligandu a heparinu nebo heparan sulfát glykosaminoglykanu do FGFR komplexu dochází k dimerizaci D2 domén, autofosforylaci a aktivaci intracelulární signalizace (Beenken *et al.*, 2009). Heparan sulfát glykosaminoglykan a heparin stabilizují FGF proti degradaci (Hacker *et al.*, 2005). Signalizace FGFR je provedena pomocí signalizačních mezičlánků do autofosforylačních míst na aktivovaném receptoru a fosforylaci substrátu. Aktivovaný FGFR fosforyluje FRS2 α a FRS2 β proteiny, které zapnou multiproteinový adaptorový komplex. Tento komplex aktivuje signální dráhu PI3K/AKT, Ras/MAPK a PLC γ (Dailey *et al.*, 2005). Dráhy, sekundární poslové a výsledný efekt jsou shrnuty v obr. 13.



Obr. 13: Dráhy FGF signalizace. Aktivovaný FGFR stimuluje PI3K/AKT, Ras/MAPK a PLC γ dráhy. MAP kinázy jsou translokovány do jádra a fosforylují transkripční faktory, které regulují cílové geny. Převzato z Dailey *et al.*, 2005.

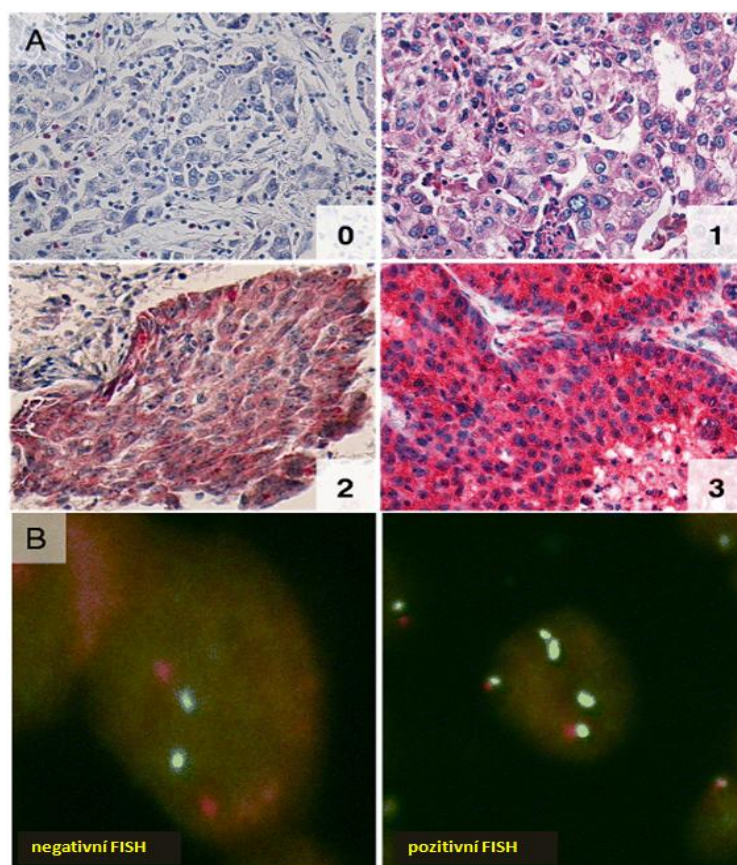
Signalizace pomocí FGFR dráhy je regulována několika mechanizmy. Například „Sprouty-related“ proteiny SPRED negativně regulují MAPK signalizaci vazbou do vazebného receptorového proteinu 2 a na Raf1 (Murphy *et al.*, 2010). MAPK fosforylace FRS2 α redukuje svou vazbu na FGFR a tím redukuje signalizaci (Lax *et al.*, 2002). Také vazba s integriny, syndekany a N-kadheriny mění intenzitu signálu (Murakami *et al.*, 2008).

2.6.4 FGFR a onkologické onemocnění

Nedávným výzkumem bylo zjištěno, že vysoká hladina amplifikace FGFR1 se vyskytuje asi ve 20 % případů spinocelulárních karcinomů u kuřáků (Weiss *et al.*, 2010). Dále bylo zjištěno, že v asi 2 % případů se FGFR1 amplifikace vyskytuje u dalších histologických typů karcinomu plic. U adenokarcinomu se amplifikace FGFR1 vyskytuje ve 3 % případů a u SCC ve 21 % případů (Dutt *et al.*, 2011). Amplifikace FGFR1 u NSCLC se častěji vyskytuje u mužů (39,4 % vs. ženy 13,8 %), u kuřáků (40,8 % vs. nekuřáci 4,2 %), ale už nelze určit přesnou korelaci s věkem (Sasaki *et al.*, 2012). U NSCLC dochází často ke koexpresi FGFR1 s FGFR2 (Marek *et al.*, 2009). U spinocelulárních karcinomů dále vznikají bodové mutace ve FGFR2. U NSCLC je FGF často exprimován spolu s FGFR1 a FGFR2.

Dochází k autokrinní signalizaci, která může být inhibována malými molekulami tyrozinkinázových inhibitorů (Marek *et al.*, 2009). Bylo zjištěno, že tyrozinkinázové inhibitory inhibující VEGFR také inhibují FGFR izoformy. Momentálně probíhají studie fáze I a II, které objasní účinky pazopanibu, BIBF1120, brivanibu a cediranibu na FGFR pozitivní buňky různých tkání včetně NSCLC (shrnutí v Kono *et al.*, 2012).

Overexprese FGFR je vyšetřována imunohistochemickou metodou. FISH metoda se sondami na centromeru chromozomu 8 a FGFR1 se využívá při detekci amplifikace genu. Kohler *et al.* stanovili maximální hranici amplifikace genu FGFR ku chromozomu 8 na 2,75. Imunohistochemická detekce a FISH metoda pro FGFR1 je zobrazena na obr. 14.



Obr. 14: A - Imunohistochemická detekce FGFR1: 0 - žádná, 1 - nízká, 2 - střední, 3 - silná exprese (zvětšení 630x). B – Detekce genu FGFR1 (zelená) a CEN8 (červená) pomocí FISH. Převzato z Kohler *et al.*, 2012.

2.7 Současný stav a budoucnost NSCLC

Karcinom plic je nejčastějším případem rakoviny. Odhaduje se, že v roce 2008 přibýlo 1,61 milionů nových případů, což je 12,7 % ze všech typů rakoviny. 1,38 milionů lidí zemřelo na karcinom plic, to je 18,2 % všech úmrtí na rakovinu. Většina nových případů se vyskytuje v rozvojových zemích. Karcinom plic je stále celosvětově nejčastějším typem karcinomu u mužů (1,1 milionů případů; 16,5 % z celku). U žen je incidence karcinomu plic všeobecně nižší, avšak je to čtvrtý nejčastější typ karcinomu (516000 případů; 8,5 % z celku) a druhý typ s nejvyšší mortalitou (427000; 12,8 % z celku) (<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/lung.asp>).

V současné době dochází k intenzivnímu studiu molekulární podstaty vzniku nemalobuněčného karcinomu plic. Dochází k objevování nových molekulárních markerů a genů zapojených do vzniku karcinomu plic. Dochází také k identifikaci signálních drah v buňce, které vedou k morfologickým změnám a vzniku rakovinné buňky. Toho lze využít

v blokaci signálních drah pomocí inhibitorů. Dochází také k vývoji nových inhibitorů tyrozinkinázových receptorů zapojených do vzniku NSCLC.

Cílem do budoucna je stanovení přesného histologického subtypu NSCLC a jeho charakterizace pomocí prognosticko-prediktivních markerů a jejich mutací. Na základě těchto kroků je možné přesně specifikovat cílenou léčbu NSCLC a vývoj těchto léčiv.

3 Cíle práce

Cílem práce bylo připravit vlastní duální DNA sondy FGFR1/CEP8 a C-MET/CEP7 pro metodu FISH, ověřit jejich specifitu a kvalitu hybridizace jak na buněčných liniích, tak i patientských vzorcích. V následující části projektu pomocí připravených a dalších komerčních sond vyšetřit metodu FISH status C-MET, FGFR1 a EGFR genů a centromer chromozomů 7 a 8, u souboru 80 pacientů s karcinomem plic. U těchto pacientů dále metodou FISH stanovit přítomnost aberace genu ALK. Práce je součástí projektu ÚMTM a Plicní kliniky FN Olomouc, hledajícího prognostickou a prediktivní hodnotu vybraných biomarkerů pro odhad biologického chování nemoci a účinnost adjuvantní chemoterapie u pacientů především s operabilním nemalobuněčným karcinomem plic (non-small cell lung cancer; NSCLC). Cílem další práce bylo navrhnout techniku PCR pro sledování fúzního genu EML4-ALK (varianty 1, 3ab a 6) u pacientů, u nichž selhala metoda FISH.

3.1 Vyšetření cytogenetických změn pacientů s karcinomem plic metodou FISH

Metodou FISH byl charakterizován soubor pacientů s karcinomem plic. Pro toto vyšetření byly připraveny sondy FGFR1/CEP8 a C-MET/CEP7. DNA pro jednotlivé sondy byly vyizolovány z bakteriálních plazmidů, následně naznačeny a purifikovány. U připravených sond byla ověřena vazebná oblast na chromozomálních preparátech. Specifita sondy FGFR1/CEP8 byla rovněž ověřena hybridizací na pozitivní buněčnou linii. Kvalita hybridizace byla testována na parafinových tkáňových řezech. Připravené sondy a komerčně získané sondy (EGFR/CEP7 a ALK Break Apart) byly použity na stanovení počtu kopií genů C-MET, FGFR1, EGFR, centromer chromozomů 7 a 8 a aberace ALK na souboru patientských vzorků karcinomu plic.

Chemikálie:

70%, 85%, 95%, a 99,6% etanol; isopropanol; 3M octan sodný pH=5,5; LB Broth Miller (Amresco); TE pufr (200 μ l 0,5M TRIS; 20 μ l 0,05M EDTA; 960 μ l deionizované vody); Human Hybloc DNA (Applied Genetics Laboratories, Inc.); hybridizační pufr (5 ml formamidu; 2 ml 50% dextran sulfátu; 100 μ l 10% SDS; 16,5 μ l 0,5M TRIS; 16,5 μ l 0,05M EDTA; 250 μ l Salmon sperm; 2620 μ l deionizované vody); DAPI Antifade ES (Cytocell); 20xSSC (175 g NaCl s 88 g dihydrátu citrátu sodného, doplněno do 1 l deionizovanou vodou, pH=5,3); 0,2 M kyselina chlorovodíková; xylen NP-40; NaCl; deionizovaná voda;

dihydrát citrátu sodného; formamid; promývací roztok I (20 ml 20xSSC a 3 ml NP-40 doplněno do 1 l deionizovanou vodou, pH=7-7,5); promývací roztok II (100 ml 20xSSC a 1 ml NP-40 doplněno na 1 l deionizovanou vodou, pH=7); pepsin from porcine gastric mucosa (Sigma-Aldrich); KCl·Na₂HPO₄·12H₂O; KH₂PO₄; formaldehyd; fyziologický roztok; HCl a NaOH na úpravu pH roztoků; 10xPBS (80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g KCl·Na₂HPO₄·12H₂O, 2 g KH₂PO₄ - doplněno do 1 l deionizovanou vodou); NaSCN; 10% formalín (4% formaldehyd v PBS); chloramfenikol (Sigma); ampicilin (Sigma-Aldrich); Orange-dUTP (Enzo); Green-dUTP (Enzo); 0,5M TRIS; 0,05M EDTA; 10% SDS; 50% dextran sulfát; Salmon Sperm DNA (Invitrogen).

Kity:

QIAfilter Plasmid Mega (Qiagen), BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System (Invitrogen).

Pomůcky:

Vyšetřovaný vzorek (FFPE tkáň na pozitivně nabitém skle), cytospin buněčné linie NCI-H520 na podložním skle, rukavice, mikrozskumavky, pipety (Eppendorf), špičky ep Dualfilter T.I.P.S. (Eppendorf), odměrné válce, sterilní jehly, pozitivně nabitá podložní skla (Menzel Gläser), krycí skla (Merienfeld), rubber cement Fixogum (Marabu), imerzní olej type-F (Olympus), teploměr, buničina nebo filtrační papír, barvicí nádobky, stojánky, *E. coli* (bA333B24) s plazmidem obsahující DNA sekvenci genu FGFR1, *E. coli* (153D24) s plazmidem obsahující DNA sekvenci genu C-MET, *E. coli* (PZ75) s plazmidem obsahujícím centromerickou DNA sekvenci chromozomu 7, *E. coli* (p28.4) s plazmidem obsahujícím centromerickou DNA sekvenci chromozomu 8, led, buničina.

Přístroje:

minicentrifuga Minispin (Eppendorf), chlazená centrifuga Z 513 K (Hermle LaborTechnik), laminární box (BioAir), kombinovaná chladnička (Gorenje a Liebherr), NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), Rotor-gene 3000 Classic (Corbett Research), vodní lázeň ED-5 a TW2 (Julabo), pH-metr (Hanna Instruments), fluorescenční mikroskop BX-60 (Olympus) s příslušnými filtry, imerzními objektivy a obrazovou analýzou (MetaSystems), hybridizační stanice HyBrite (Vysis, Downers Grove), hybridizační stanice Thermobrite (StatSpin), digestoř N1200 (Merici), laminární box Herasafe KS (Thermo Scientific), váha MAXX (Denver Instruments), vortex Vortex Genie 2 (Scientific Industries), termoblok Driblock DB2A (Techne), temperovaná třepačka Innova 40 (New Brunswick), termostat (Mettler).

3.1.1 Izolace plazmidové DNA

1. Bakteriální klon bA333B24 (obsahující plazmidy s inzertem DNA sekvence pro gen FGFR1) byl inokulován do 1 l LB média. K LB médiu bylo přidáno 25 mg chloramfenikolu a následovala kultivace 12-16 hod při 200 rcf a 37 °C. Postup byl stejný i u bakteriálního klonu 153D24 obsahujícího plazmid se sekvencí pro gen C-MET.
2. Bakteriální klon obsahující plazmidy s centromerickou DNA chromozomu 7 (PZ75) byl inokulován do 1 l LB média s 50 mg ampicilinu. Stejný postup byl proveden i u bakteriálního klonu obsahujícího centromerickou DNA chromozomu 8 (p28.4). Následovala kultivace 12-16 hod při 200 rcf a 37 °C.
3. Vykultivované bakterie v LB médiu byly 15 min centrifugovány při 6000 g a 4°C a supernatant byl slit.
4. Peleta byla resuspendována v 50 ml pufru P1.
5. Poté bylo přidáno 50 ml pufru P2 (lyzační roztok), směs byla promíchána a 5 min inkubována při pokojové teplotě. Správným smícháním došlo ke změně barvy na modrou (kit obsahuje systém pro indikaci správného postupu).
6. Bylo přidáno 50 ml zchlazeného pufru P3 a směs promíchána (došlo k odbarvení směsi jako potvrzení správného postupu).
7. QIA filter cartridge byla připevněna k lahvi. Byla nanesena připravená směs a inkubována 10 min při laboratorní teplotě.
8. Směs byla přefiltrována pomocí vakua.
9. Na cartridge bylo přidáno 50 ml pufru FWB2. Směs byla promíchána špičkou a opět byla vakuem přefiltrována.
10. QIAGEN-tip byl kalibrován pomocí 35 ml pufru QBT, následně byl přefiltrován lyzát získaný předchozím krokem.
11. QIAGEN-tip byl poté promyt 2 x 100 ml pufru QC.
12. DNA byla eluována 35 ml pufru QF.
13. DNA byla precipitována přidávkem 24,5 ml isopropanolu a centrifugována při 15000 g a 4 °C po dobu 30 min.
14. Supernatant byl slit a k peletě bylo přidáno 7 ml 70% etanolu a směs centrifugována 10 min při 15000 g.
15. Supernatant byl opět slit, peleta byla 20 min sušena ve flowboxu a poté rozpuštěna ve 100 µl TE pufru.
16. Vyizolovaná DNA byla uchována v mrazáku při -20 °C.

3.1.2 Příprava sondy

1. 500 ng plazmidové DNA bylo doplněno do 21 μ l deionizovanou vodou.
2. K vzorku bylo přidáno 20 μ l 2,5x koncentrovaného roztoku primerů (Random Primers Solution).
3. Následovala 5 min inkubace při 95°C ve vodní lázni a poté 5 min chlazení na ledu.
4. Na ledu bylo k vzorku napipetováno 5 μ l 10x dCTP/dUTP Nukleotide Mix, 3 μ l Cy3TM-dCTP/dUTP nebo Cy5TM-dCTP/dUTP a 1 μ l Exo-Klenow Fragment.
5. Směs byla jemně propipetována a krátce stočena na minicentrifuze a inkubována v termobloku 2 hod při 37°C.
6. Následovala purifikace: Nejprve bylo přidáno 200 μ l Binding Buffer B2 a roztok vortexován.
7. Následně byla směs napipetována na PureLinkTM Spin Column a 1 min centrifugována při 10000 g.
8. Zachycený roztok byl odstraněn a na kolonu bylo přidáno 650 μ l Wash Buffer W1, centrifugace při 10000 g na 1 min.
9. Zachycený roztok byl odstraněn a byla provedena centrifugace při 14000 g po dobu 3 min.
10. Kolona byla umístěna do sterilní Amber Recovery Tube, bylo přidáno 55 μ l Elution Buffer E1 s následnou inkubací 1 min při laboratorní teplotě.
11. Značená DNA próba byla získána centrifugací na maximální výkon po dobu 2 min.
12. K próbě bylo přidáno 25 μ l Human Hybloc DNA a směs vysrážena přidávkem 7,5 μ l octanu sodného (3M; pH 5,5) a 206 μ l 99,5% etanolu.
13. Směs byla inkubována při -20 °C v mrazáku, na závěr proběhla 15 min centrifugace na maximální výkon při teplotě 4°C.
14. Supernatant byl vylit a peleta byla sušena 10 min ve flowboxu.
15. Peleta byla rozpuštěna v 50 μ l hybridizačního pufru.
16. Takto připravená sonda byla uchována při -20°C v mrazáku.

3.1.3 Vyšetření FGFR1/CEP8 u buněčné linie NCI-H520

1. Buněčná linie lidského karcinomu plic NCI-H520 (American Type Culture Collection, ATCC) byla rozmrazena (uchovávána nad parami tekutého dusíku v kultivačním médiu, s přidávkem dimethyl sulfoxidu -DMSO) a kultivována v termostatu s 5% atmosférou CO₂ a 37°C. Ke kultivaci bylo (dle doporučení ATCC) použito médium RPMI-1640, s 10% fetálním hovězím sérem (FBS). V průběhu kultivace bylo obměňováno médium dle potřeby.

2. Po narostení linie (buňky pokrývaly převážnou část dna kultivační láhve) bylo médium slito, kultivační láhev vypláchnuta sterilním PBS a buňky uvolněny přidavkem 0,25% trypsinu v 0,03% EDTA. V průběhu působení trypsinu bylo s láhví poklepáváno, aby došlo k uvolnění co největšího počtu buněk a stav kontrolován pod mikroskopem. Ihned po uvolnění většiny buněk byl proces trypsinizace zastaven přidavkem FBS.
3. Buňky byly z láhve přelity do dvou 50 ml zkumavek, přidáno PBS do plného objemu a směs centrifugována 8 min při 1200 g. Supernatant byl vylit.
4. Sediment z jedné zkumavky byl rozsuspendován v cca 2 ml BPS. Do centrifugační komůrky pro přípravu cytospinů bylo vloženo podložní sklo a do komůrky nepipetováno cca 50 μ l suspenze. Komůrka byla centrifugována 3 min při 1000 g. Po ukončení centrifugace byla odsáta nadbytečná tekutina a sklo (cytospin) necháno volně zasychat.
5. Sediment druhé zkumavky byl rozsuspendován v kultivačním médiu s FBS tak, aby se koncentrace buněk pohybovala v rozmezí cca 500 tisíc - 1 mil. buněk/ml. Touto suspenzí byla naplněna jednorázová kultivační komůrka na přípravu buněčných preparátů na podložním skle a celá sada kultivována v termostatu (5% CO₂, 37°C). Stav linie v této komůrce byl kontrolován na mikroskopu. Jakmile došlo k uchycení buněk na podložní sklo, byla z komůrky odsáta tekutina, komůrka promyta PBS, rozložena a podložní sklo necháno volně zasychat.
6. Podložní skla připravená oběma metodami byla fixována 10 min ve směsi etanolu a kyseliny octové v poměru 3:1 a nechána volně schnout po dobu 30 min.
7. Na skla s buněčnými vzorky bylo nanášeno 5 μ l duální sondy pro FGFR1/CEP8.
8. Následovala kodenaturace sondy 1 min při teplotě 75°C a následně byly vzorky hybridizovány se sondou při 37°C 12-18 hod.
9. Skla se vzorky a sondami byly promyty v promývacím roztoku I o teplotě 73°C na 1 min a 45 s, lehce osušeny a přeneseny do promývacího roztoku II na 30 s.
10. Skla byla volně sušena bez přístupu světla alespoň 30 min.
11. Na vzorky bylo nanášeno 3-9 μ l DAPI a vzorky překryty krycím sklíčkem.
12. Signály byly odečteny ve fluorescenčním mikroskopu. Hodnocen byl počet kopií genu FGFR1 a počet centromerických signálů pro chromozom 8 a výsledek porovnán s literárními údaji.
13. Skla, u kterých nebyla prováděna FISH byla uchována při -20°C pro další použití

3.1.4 Ověření specifity připravených sond na chromozomálních preparátech

Na komerčně dodaných chromozomálních preparátech (Vysis) byla provedena FISH s připravenými sondami FGFR1/CEP8 a C-MET/CEP7, dle bodů 7-11, kapitoly 3.1.3. Signály byly odečteny ve fluorescenčním mikroskopu a hodnocena byla vazebná oblast a výskyt případné cross-hybridizace

3.1.5 Ověření kvality hybridizace na parafinových řezech

1. Tkáňové řezy fixované formalínem a zalité v parafínu (FFPE: Formalin-fixed, Paraffin-Embedded) byly nakrájeny na řezy o tloušťce 4-6 μm , přeneseny na pozitivně nabitá, tzv. „plus“ podložní skla a imobilizovány inkubací při 56°C přes noc.
2. Podložní skla se vzorky byla v digestoři třikrát promyta v xylenu po dobu 7 min.
3. Následovalo dvakrát promytí v 96% etanolu po dobu 5 min.
4. Poté proběhlo sušení na vyhřevné plotýnce o teplotě 45-50°C na 3-5 min.
5. Sklo se vzorky bylo po dobu 20 min vloženo do 0,2M roztoku kyseliny chlorovodíkové.
6. Následoval oplach na 3 min v deionizované vodě.
7. Sklo bylo 3 min promýváno v 2x koncentrovaném SSC (2xSSC) o pH=7.
8. Následovala inkubace po dobu 20 min v NaSCN o teplotě 80 °C.
9. Sklo bylo promyto 1 min v deionizované vodě.
10. Poté bylo sklo promyto v 2xSSC o pH=7 po dobu 5 min.
11. V termostatu o teplotě 37°C bylo vytemperováno 50 ml proteázového pufru o pH=2. Těsně před použitím bylo přidáno 24 mg pepsinu. Sklo se vzorky bylo v tomto roztoku inkubováno po dobu 50 min.
12. Následovalo dvakrát promytí v 2xSSC o pH=7 po 5 min.
13. Vzorky byl usušeny na vyhřevné plotýnce při teplotě 45-50°C po dobu 3-5 min.
14. Poté byly fixovány v 10% pufovaném formalínu po dobu 10 min.
15. Následovalo dvakrát promytí v 2xSSC o pH=7 po 5 min.
16. Vzorky byly rychle opláchnuty krátkým ponořením do deionizované vody a usušeny na vyhřevné plotýnce při teplotě 45-50°C 10 min.
17. Na takto opracované tkáň bylo nanášeno 4-10 μl duální sondy pro C-MET/CEP7, FGFR1/CEP8 a vzorky překryty krycími skly a zalepeny, aby nedošlo k jejich vysychání.
18. Kodinaturace sond se vzorky probíhala 1 min při 85°C a následně byly vzorky hybridizovány se sondami při 37 °C 12-18 hod.
19. Druhý den byla krycí sklíčka odstraněna.
20. Sklo se vzorkem a sondami bylo promyto v promývacím roztoku I o teplotě 73°C na 1 min a 45 s, lehce osušeno a přeneseno do promývacího roztoku II na 30 s.

21. Sklo se vzorky bylo volně sušeno bez přístupu světla alespoň 30 min.
22. Na vzorky bylo nanášeno 3-9 µl DAPI a vzorky překryty krycím sklíčkem.
23. Signály byly odečteny ve fluorescenčním mikroskopu.

3.1.6 Vyšetření statusu genů C-MET, FGFR1, EGFR, centromer chromozomů 7 a 8 přítomnosti ALK aberace u pacientů s karcinomem plic

1. Pro vyšetření byly dodány histologicky ověřené FFPE tkáňové řezy karcinomu plic, na pozitivně nabitých podložních sklech. Jejich pretreatment a následná FISH byla provedena dle kapitoly 3.1.5.
2. Hodnocen byl počet kopií genů C-MET, FGFR1, EGFR, centromer chromozomů 7 a 8. U ALK byl hodnocen nejen počet kopií genu, ale i přítomnost rozštěpených signálů, značících přítomnost aberace, viz 2.4.4.
3. U každého preparátu bylo hodnoceno 100 nepřekrývajících se jader a získaná data statisticky zpracována.

3.2 Detekce varianty fúzního genu EML4-ALK

V další části práce jsem se pokusila navrhnout vhodnou metodiku detekce přítomnosti aberovaného ALK, především nejčastější varianty EML4-ALK fúze.

Chemikálie:

99,5% a 75% etanol; chloroform bez aditiv; DEPC Treated Water (Ambion); Random Primers (Promega); Thermo-Start PCR Buffer (Thermo Scientific); RNAsin Ribonuclease Inhibitor (Promega); 10 mM Deoxyribonucleotide Triphosphates (Promega); RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas); Deparaffinization Solution (Qiagen); TRI reagent (Molecular Research Center); isopropanol; primery pro EML4-ALK (5'-TGC AGA CAA GCA TAA AGA TGT CA-3'; 5'-CGG AGC TTG CTC AGC TTG TA-3'; 5'-GAC TCA GGT GGA GTC ATG CTT-3'; 5'-CTC CAT CTG CAT GGC TTG-3'; 5'-CGG AGC TTG CTC AGC TTG TA-3'; 5'-GCA TAA AGA TGT CAT CAT CAA CCA AG-3'; 5'-TAG AGC CCA CAC CTG GGA AA-3'); primery pro GAPDH (5'-ACA ACA GCC TCA AGA TCA TCA G-3'; 5'-TCT TCT GGG TGG CAG TGA TG-3'); 5x Reaction Buffer for RT (Fermentas); Magnesium Chloride 25mM (Thermo Scientific); SybrGreen 1:1000 (Biotium); program Primer3; Thermo-Star Taq DNA polymerase (Thermo Scientific); 10 mM Deoxyribonucleotide triphosphates (Promega).

Kity:

RNeasy® FFPE Kit (Qiagen), Agilent DNA 1000 Kit (Agilent), Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent).

Pomůcky:

FFPE vzorky tkáně plic pacientů, rukavice, mikrozkušavky, pipety (Eppendorf), špičky ep Dualfilter T.I.P.S. (Eppendorf), sterilní jehly, led, chladicí stojan, TRI lyzát buněčné linie NCI-H2228, genomická DNA vyizolovaná z buněčné linie CEM.

Přístroje:

minicentrifuga Minispin (Eppendorf), chlazená centrifuga Z 513 K (Hermle LaborTechnik), laminární box (BioAir), kombinovaná chladnička (Gorenje a Liebherr), vortex (Scientific Industries), koncentrátor (Eppendorf), cykler Thermal Cycler PTC 100 (MJR), NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), Rotor-gene 3000 Classic a program Rotor Gene 6 (Corbett Research), BioAnalyzer 2100 a vortex IKA (Agilent), vodní lázeň ED-5 a TW2 (Julabo), pH-metr (Hanna Instruments), fluorescenční mikroskop BX-60 s příslušnými filtry a imerzním objektivem (Olympus), hybridizér HyBrite (Vysis, Downers Grove), Dri-Block DB2A (Techne), hybridizér Thermobrite (StatSpin), digestoř N 1200 (Merci), flowbox Herasafe KS (Thermo Scientific), váha MAXX (Denver Instruments), vortex Vortex Genie 2 (Scientific Industries), termoblok Driblock DB2A (Techne).

3.2.1 Izolace RNA z buněčné linie NCI-H2228

1. Byl připraven TRI lyzát buněčné linie NCI-H2228, byl rozmražen na ledu asi 15 min a poté 5 min při laboratorní teplotě. Zbytek byl uchován při -20°C.
2. K lyzátu bylo přidáno 200 µl chloroformu a vše silně vortexováno po dobu 30 s: poté proběhla inkubace 5 min při laboratorní teplotě.
3. Následovala centrifugace po dobu 15 min při 4°C a 12000 g.
4. 500 µl vrchní vodní fáze bylo přeneseno do nové mikrozkušavky a bylo přidáno 500 µl isopropanolu a následovalo krátké protřepání (2x - 4x).
5. Vzorek byl inkubován 5 min při laboratorní teplotě.
6. Následovala centrifugace 10 min při 4°C a 12000 g.
7. Supernatant byl odstraněn a peleta promyta 1,5 ml 75% etanolu a zkušavka několikrát převrácena tak, aby se peleta uvolnila do etanolu.
8. Byla provedena centrifugace po dobu 5 min při 4°C a 12000 g.
9. Supernatant byl odstraněn a peleta sušena 3 až 10 min na vzduchu ve flow boxu.

10. K peletě bylo přidáno 30 μ l vody bez nukleáz s přísadkou DEPC (DEPC Treated Water) a obsah byl několikrát promíchán. Rozpuštění RNA bylo urychleno zahřátím vzorku na 60 °C po dobu 10 min a poté byl ochlazen v chladicím stojanu.
11. Rozpuštěná RNA byla krátkodobě uchována při -20°C a dále byla použita pro přepis do cDNA.

3.2.2 Izolace RNA pomocí RNeasy® FFPE Kitu

1. FFPE tkáňové řezy plic pacientů a buňky buněčné linie NCI-H2228 zalité v parafínu byly přeneseny do mikrozkušavky.
2. Ke vzorkům bylo přidáno 160 μ l Deparaffinization Solution, vzorky byly vortexovány po dobu 10 s a centrifugovány v mikrozkušavkách.
3. Vzorky byly inkubovány 3 min při 56°C v termobloku a poté byly zchlazeny na laboratorní teplotu.
4. Bylo přidáno 150 μ l PKD Buffer a směs vortexována.
5. Následně byly vzorky centrifugovány 1 min při 11000 g.
6. Ke vzniklé spodní čiré fázi vzorků bylo přidáno 10 μ l proteinase K, spodní fáze byla propipetována.
7. Následovala inkubace při 56°C po dobu 15 min a poté při 80°C po dobu 15 min.
8. Spodní čirá fáze byla přenesena do nové 2ml mikrozkušavky, inkubována po dobu 3 min na ledu.
9. Následně byla provedena centrifugace při 13500 rpm.
10. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a k němu bylo přidáno 16 μ l Booster Buffer a 10 μ l DNase 1 Stock Solution. Směs byla promíchána invertováním mikrozkušavky s následnou krátkou centrifugací.
11. Poté byla inkubována 15 min při pokojové teplotě.
12. Dále bylo přidáno 320 μ l Buffer RBC a vše promícháno na vortexu.
13. K vzorku bylo přidáno 720 μ l 100% etanolu a vše řádně promícháno pipetováním.
14. Do kolonky RNeasy MinElute Spin, vložené ve sběrné zkumavce (Collection Tube) bylo přeneseno 700 μ l vzorku. Po zavření víčka následovala centrifugace po dobu 15 s při 8000 g. Roztok, který prošel kolonkou, byl odstraněn.
15. Předchozí krok byl opakován, dokud nebyl vzorek vyčerpán.
16. Do RNeasy MinElute Spin kolonky bylo přeneseno 500 μ l Buffer RPE, víčko bylo uzavřeno a kolonka centrifugována 15 s při 8000 g. Zachycený roztok byl odstraněn.
17. Opět bylo přidáno 500 μ l a následně centrifugováno 2 min při 8000 g.

18. RNeasy MinElute Spin kolonka byla vložena do nové Collection Tube a byla provedena centrifugace při 12100 g po dobu 5 min.
19. RNeasy MinElute Spin kolonka byla vložena do nové 1,5ml Collection Tube a na filtr bylo napipetováno 14-30 μ l RNase-free vody. Víčko bylo uzavřeno a následovala centrifugace 1 min při 12100 g.
20. Vyizolovaná RNA byla co nejdříve použita k přepisu do cDNA.

3.2.3 Reverzní transkripce

1. Chemikálie uchovávané v mraznici (-18°C až -30°C) byly před začátkem práce rozmrazeny, zvortexovány a stočeny na minicentrifuze. Před přepisem do cDNA byla změřena koncentrace RNA.
2. Do 0,2ml zkumavek byla postupně napipetována DEPC Treated Water, RNA a 0,6 μ l random primerů. Na reverzní transkripci byly použity 3 μ g vyizolované celkové RNA v reakčním objemu 30 μ l.
3. Následovala 5 min inkubace v termocykléru s vyhříváním víčkem při 70°C a poté byla mikrozkuhavka na 1 min zchlazena v chladicím stojanu.
4. Mezitím byl připraven master mix. Do 0,2 ml mikrozkuhavky bylo napipetováno 6 μ l 5x koncentrovaného RT pufru, 3 μ l 10mM dNTP a 0,75 μ l RNAsinu. Vše bylo krátce zvortexováno a stočeno.
5. Ke zchlazenému vzorku bylo přidáno 9,75 μ l master mixu, vše bylo promícháno a inkubováno 5 min při laboratorní teplotě.
6. Ke vzorku bylo přidáno 0,75 μ l RTázy, vše krátce zvortexováno a stočeno. Vzorek byl inkubován 10 min při pokojové teplotě.
7. Mikrozkuhavka byla umístěna do termocykléru a 60 min inkubována s vyhříváním víčkem při 42°C a 10 min při 70°C, poté následoval program chlazení při 4°C.
8. Po změření koncentrace cDNA byl vzorek uchován v chladu.

3.2.4 Reverzně transkriptázová (RT) real-time PCR genů

1. Pro analýzu vzniku fúze genů EML4-ALK byly použity primery navržené v článku Wallander *et al.* (2012): ALK ex20R reverse, EML4 ex6F forward, EML4 ex13F forward. Sekvence primerů pro gen GAPDH byly použity z článku Soda *et al.* (2007). Primery EML4-ALK V1 a EML4-ALK V3 byly navrženy v programu Primer3. Sekvence všech primerů jsou uvedeny v tabulce č. II.

Tabulka č. II: Primery pro detekci fúzních genů EML4-ALK a genu pro GAPDH s délkami jejich produktů.

<i>EML4-ALK V3 forward</i>	5'-TGC AGA CAA GCA TAA AGA TGT CA-3'	150 bp
<i>EML4-ALK V3 reverse</i>	5'-CGG AGC TTG CTC AGC TTG TA-3'	
<i>EML4-ALK V1 forward</i>	5'-GAC TCA GGT GGA GTC ATG CTT-3'	150 bp
<i>EML4-ALK V1 reverse</i>	5'-CTC CAT CTG CAT GGC TTG-3'	
<i>ALK ex20R reverse</i>	5'-CGG AGC TTG CTC AGC TTG TA-3'	-
<i>EML4 V3ab forward</i>	5'-GCA TAA AGA TGT CAT CAT CAA CCA AG-3'	105 a 138 bp
<i>EML4 V1 forward</i>	5'-TAG AGC CCA CAC CTG GGA AA-3'	109 bp
<i>GAPDH forward</i>	5'-ACA ACA GCC TCA AGA TCA TCA G-3'	150 bp
<i>GAPDH reverse</i>	5'-TCT TCT GGG TGG CAG TGA TG-3'	150 bp

2. Základní složení Master Mixu je vypsáno v tabulce č. III. Teplotní profily reakcí pro amplifikaci jednotlivých genů jsou uvedeny v tabulce č. IV, V a VI.

Tabulka č. III: Základní složení Master Mixu pro RT real-time PCR.

	<i>výsledná koncentrace</i>	<i>množství na 1 reakci</i>
<i>10x PCR pufr</i>	1x	2,5 µl
<i>25 mM MgCl₂</i>	5 mM	5 µl
<i>10 mM dNTP</i>	200 µM	0,5 µl
<i>5µM FW primer</i>	0,2 µM	2 µl
<i>5µM RV primer</i>	0,2 µM	2 µl
<i>SybrGreen</i>	-	1 µl
<i>DEPC Treated Water</i>	-	13,45 µl
<i>ThermoStar polymerase (5U/1µl)</i>	1U	0,2 µl
<i>DNA</i>	-	1 µl
<i>celkový objem</i>	25 µl	25 µl

Tabulka č. IV: Teplotní profily pro detekci fúzního genu primery EML4-ALK V1 a V3.

<i>hold</i>	95°C	15 min
<i>35x: denaturace</i>	95°C	15 s
	66°C	15 s
<i>annealing</i>	66°C	15 s
<i>elongace</i>	72°C	15 s

Tabulka č. V: Teplotní profily pro detekci fúzního genu primery ALK ex20R, EML4 ex6F a EML4 ex13F.

<i>hold</i>	95°C	10 min
<i>35x: denaturace</i>	94°C	30 s
<i>annealing</i>	58°C	30 s
<i>elongace</i>	72°C	30 s

Tabulka č. VI: Teplotní profily pro detekci genu GAPDH.

<i>hold</i>	95°C	10 min
<i>35x: denaturace</i>	94°C	15 s
<i>annealing</i>	59°C	15 s
<i>elongace</i>	72°C	15 s

3. Výsledky byly zpracovány pomocí programu Rotor Gene 6.

3.2.5 Ověření amplifikovatelného produktu na DNA čípech Agilent

Po provedení RT real-time PCR byly vzorky analyzovány čipovou elektroforézou pro zjištění velikosti amplifikovaného produktu.

1. Marker, velikostní standard a fluorescenční barva byly 30 min temperovány při pokojové teplotě s gelem.
2. Byla sestavena Priming Station, píst vytažen na 1 ml a vložen čip.
3. Do čipu bylo na pozici G napipetováno 9 µl gelu s fluorescenční barvou, chip byl vložen do Priming Station, která byla poté uzavřena. Píst byl po dobu 60 s zatlačen na záklopku, pak byl uvolněn a po 5 s vytažen na pozici 1 ml.
4. Do čipu bylo na 2 pozice nad G napipetováno po 9 µl gelu.
5. Na pozici pro žebřík a jamek 1-12 bylo napipetováno 5 µl markeru. Do pozic 1-12 bylo napipetováno po 1 µl vzorků a poté 1 µl velikostního standardu do pozice označené žebříkem. Do volných jamek bez vzorků bylo napipetováno 6 µl markeru.
6. Čip byl vortexován 60 s na 2000 rpm, poté vložen do BioAnalyzeru 2100 a spuštěna analýza.

3.2.6 Ověření kvality izolované RNA čípech Agilent

1. Marker, velikostní standard a fluorescenční barva byly 30 min temperovány při pokojové teplotě s gelem.

2. Do priming station byl vložen píst na RNA analýzu, záklopka byla vysunuta na nejvyšší pozici.
3. Byla sestavena Priming Station, píst vytažen na 1 ml a vložen čip.
4. Do čipu bylo na pozici G napipetováno 9 μ l gelu s fluorescenční barvou, chip byl vložen do Priming Station, která byla poté uzavřena. Píst byl po dobu 30 s zatlačen na záklopku, pak byl uvolněn a po 5 s vytažen na pozici 1 ml.
5. Do čipu bylo na 2 pozice nad G napipetováno po 9 μ l gelu.
6. Na pozici pro marker a jamek 1-12 bylo napipetováno 5 μ l markeru. Do pozic 1-12 bylo napipetováno po 1 μ l vzorků a poté 1 μ l velikostního standardu do pozice označené markerem. Do volných jamek bez vzorků bylo napipetováno 6 μ l markeru.
7. Čip byl vortexován 60 s na 2000 rpm, poté vložen do BioAnalyzeru 2100 a spuštěna analýza.

4 Výsledky

4.1 Analýza aberací FISH metodou

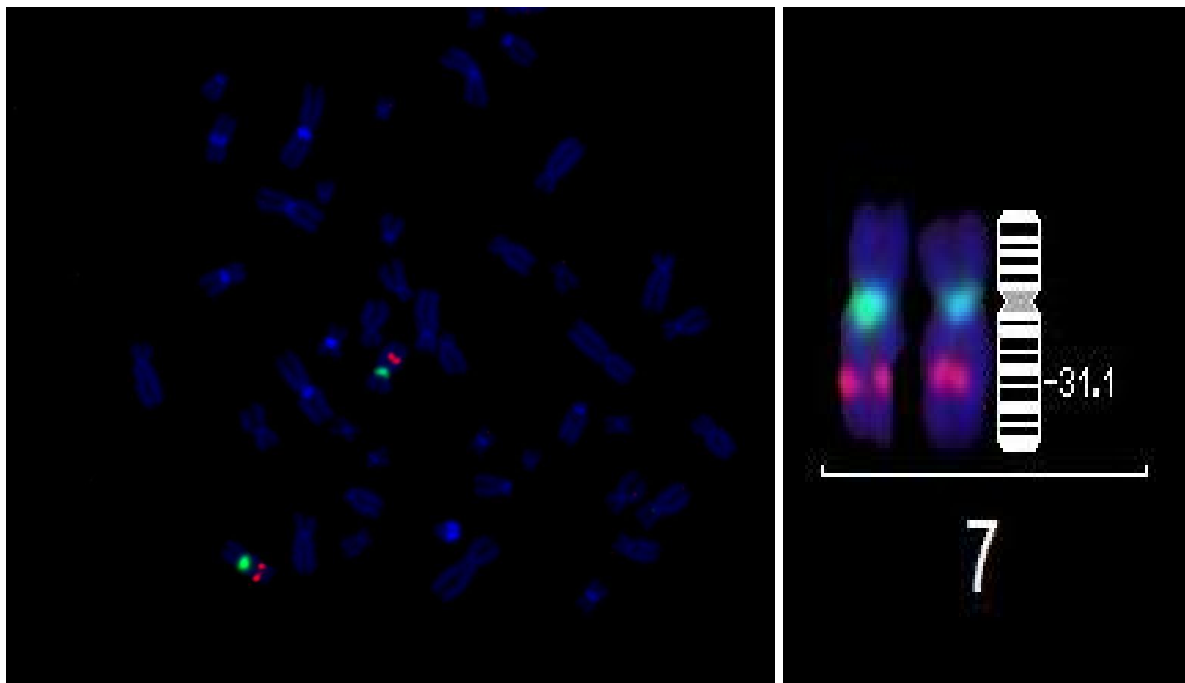
Bakteriální klony obsahují plazmid s inzertem pro přípravu dané DNA sondy byly inokulovány do média se selekčním antibiotikem a kultivovány na temperované třepačce viz tab. č. VII.

Tabulka č. VII.: Příprava sondy z bakteriálního klonu, selekce bakteriálního klonu a vyizolovaná koncentrace plazmidové DNA.

příprava sondy	bakteriální klon	selekční antibiotikum	získané koncentrace plazmidové DNA
FGFR1	bA333B24	chloramfenikol	450 ng/μl
CEP 8	p28.4	ampicilin	4946 ng/μl
C-MET	153D24	chlroramfenikol	190 ng/μl
CEP 7	PZ75	ampicilin	408 ng/μl

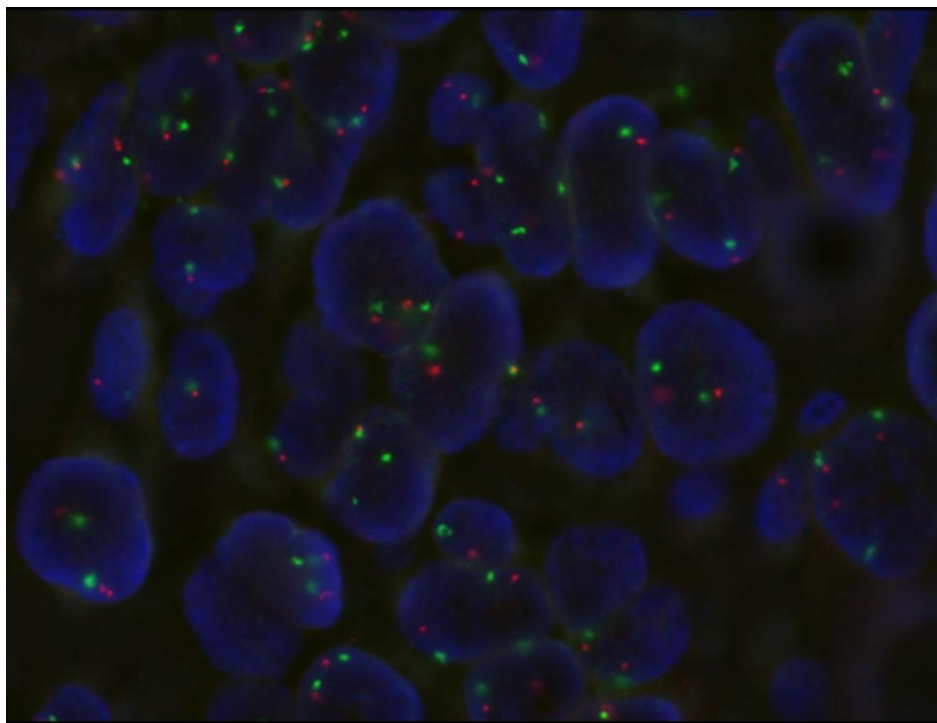
Plazmidová DNA byla z bakterií vyizolována pomocí QIAfilter Plasmid Mega Kitu. Koncentrace vyizolovaných plazmidů byla změřena nanodropem a je uvedena v tab. č. VII. Pomocí kitu BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System byla získaná DNA naznačena prostřednictvím fluorescenčně značených dUTP. Po přečištění byly vytvořeny duální sondy. Byla vytvořena duální sonda pro sledování amplifikace genu FGFR1 a centromerické DNA chromozomu 8, na kterém je gen FGFR1 lokalizován. Druhá duální sonda byla použita ke sledování genu pro C-MET a centromerické DNA na chromozomu 7, na kterém leží gen pro C-MET.

Sondy byly testovány na chromozomálních preparátech (specifita pro vazebnou oblast, viz obr. č. 15), na parafínových řezech (kvalita hybridizace) a sonda FGFR1/CEP8 byla navíc otestována na preparátech buněčné linie NCI-H520 s amplifikací genu FGFR1. Deklarovaná amplifikace uvedená v článku od Dutt *et al.* (2011) však nebyla u buněčné linie nalezena ani za použití komerční sondy.

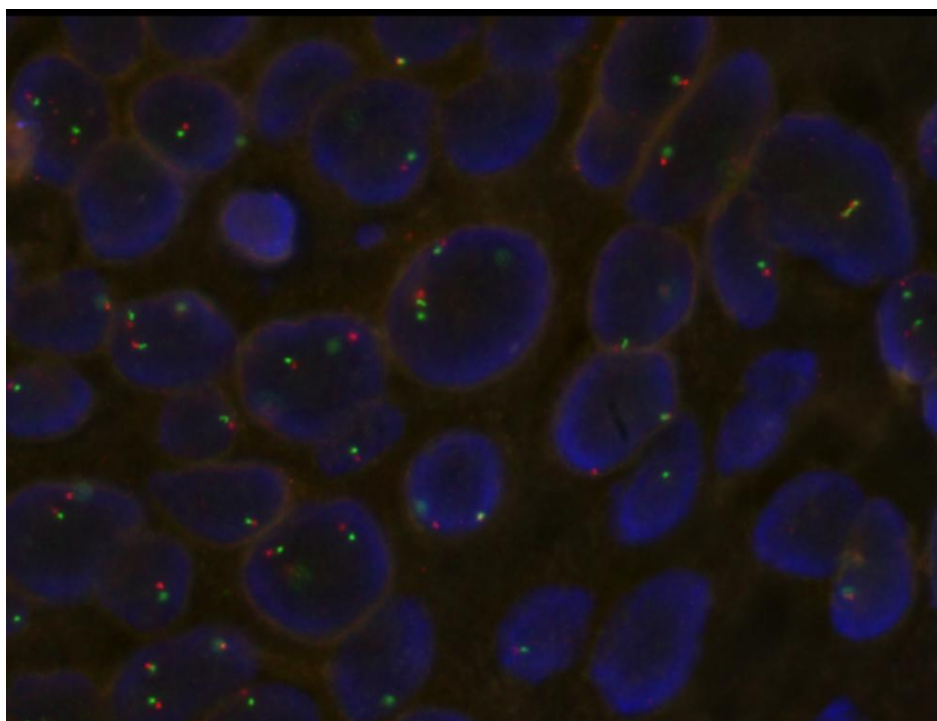


Obr. č. 15: FISH provedená na chromozomálním preparátu, s připravenou sondou LSI C-MET (Spectrum Orange) / CEP7 (Spectrum Green). Zkřížená hybridizace (crosshybridizace) na jiné chromozomy nebyla pozorována (A). Vazebná oblast odpovídá místu lokalizace genu FGFR1 a centromeře chromozomu 7 (B).

Pomocí specifických filtrů, CCD kamery a programu ISIS (MetSystem) byly pořízeny následující reprezentativní snímky FISH sond. Obr. č. 16 znázorňuje duální sondu pro C-MET a CEP7 u pacienta č. 6357. Na obr. č. 17 je zobrazena duální sonda pro FGFR1 a CEP8 u tkáně karcinomu plic stejného pacienta.



Obr. č. 16: Sonda pro C-MET (Spectrum Orange) a CEP7 (Spectrum Green) u pacienta č. 6357.



Obr. č. 17: Sonda pro FGFR1(Spectrum Orange) a CEP8 (Spectrum Green) u pacienta č. 6357.

Pro vyšetřování genu FGFR1 a C-MET bylo náhodně vybráno 80 pacientů s karcinomem plic. Signály pro FGFR1/CEP8 a C-MET/CEP7 byly odečteny standardně u 100 nádorových jader. V případě, že byl preparát cytologicky chudý, bylo odečteno

minimálně 50 jader. Případy, kde nebylo možno odečíst 50 či více jader byly označeny za nehodnotitelné. Byly vypočítány průměrné hodnoty jednotlivých genů a centromerických oblastí a zároveň hodnoceno procentuální zastoupení aberace ve vzorku. V tabulce č. VIII je uveden příklad získání jednotlivých hodnot u konkrétního pacienta č. 5152.

Tab. č. VIII: Tabulka vyhodnocení statusu genů EGFR, ALK, C-MET a FGFR1 u pacienta č. 5152. Příklad výpočtu - hodnota četnost, CEP7 byla vypočtena součinem CEP7 a četnosti; hodnota četnost EGFR byla získána součinem EGFR a četnosti. Výpočet byl analogicky aplikován na další geny a centromerické oblasti. Poměr genu ku chromozomu je podíl průměrného počtu četnosti genu a průměrného počtu četnosti CEP. Poměr ALK nebyl vztažen k počtu kopií chromozomu, avšak byla hodnocena přítomnost rozštěpeného signálu (aberrace).

5152						
EGFR						
CEP7	EGFR	četnost		četnost CEP7	četnost EGFR	četnost v %
1	1	12		12	12	12
2	1	4		8	4	4
2	2	78		156	156	78
2	3	6		12	18	6
celkem bb		0		188	190	
			prům. počet	1,88	1,9	
EML4- ALK						
ALK1	ALK2	četnost		četnost ALK1	četnost ALK2	četnost v %
2	2	20		40	40	20
3	3	6		18	18	6
4	4	12		48	48	12
5	5	32		160	160	32
6	6	11		66	66	11
7	7	4		28	28	4
8	8	12		96	96	12
9	9	3		27	27	3
celkem bb		100		483	483	
			prům. počet	4,83	4,83	

C-MET							
CEP7	C-MET	četnost		četnost CEP7	četnost C-MET	četnost v %	
1	1	9		9	9	9	gen/chrom: 1,04
1	2	2		2	4	2	
2	1	3		6	3	3	
2	2	73		146	146	73	
2	3	3		6	9	3	
2	4	3		6	12	3	
3	3	4		12	12	4	
4	4	3		12	12	3	
celkem bb		100		199	207		
			prům. počet	1,99	2,07		
FGFR1							
CEP8	FGFR1	četnost		četnost CEP8	četnost FGFR1	četnost v %	
2	2	92		184	184	92	gen/chrom: 1,02
2	3	4		8	12	4	
3	3	1		3	3	1	
4	4	3		12	12	3	
celkem bb		100		207	211		
			prům. počet	2,07	2,11		

Tabulka č. VIII.: Příklad výpočtu hodnot u pacienta č. 5152.

Procentuální hodnocení aberace bylo sledováno následujícím postupem: Obsahovalo-li >30 % buněk pouze 1 signál pro gen/centromer, byla do sloupce výsledek vepsána hodnota -1. Obsahovalo-li >30 % buněk více než 3 signály pro gen/centromerickou oblast, byla do sloupce výsledek napsána hodnota 1. U ostatních případů byla ve sloupci uvedena hodnota 0. Cílem tohoto hodnocení bylo postihnout i menší nefyziologické změny, které nelze detekovat z průměrného počtu signálů v jádře. Status genu EGFR byl zároveň hodnocen tzv. Colorado University systémem, který je v současné době pro tento gen nejvíce doporučován (Linderman *et al.*, 2012). Dále byly doplněny o hodnoty u polyzomie a amplifikace. Hodnoty polyzomie byly nastaveny v rozmezí od 2,5 vč. - hraniční hodnota H a od hodnoty 3 se jednalo o polyzomii P. Hraniční hodnota amplifikace byla stanovena na 1,5 vč. do 1,8 vč. a označena H, od hodnoty 1,81 vč. se jednalo o amplifikaci A. V ostatních případech bylo vepsáno N. Souhrnná tabulka č. IX uvádí získané výsledky u vyšetřovaných pacientů na sledované geny. Uvedené hodnoty byly dále statisticky zpracovány a získané korelace vyhodnoceny.

pořadí	CTG	pohlaví	rok narození	kuřáci	morfologie	CEP7	polyzomie	CEP7_výsledek	EGFR	coloradský systém	amplifikace	EGFR_výsledek	EGFR/CEP7	coloradský systém	amplifikace?	ALK_green	ALK_green_výsledek	ALK_orange	ALK_orange_výsledek	polyzomie	ALK_translokace
1	6103	M	1982	neuveдено	M80703	3,78	P	1	6,00	vysoká polyzomie 100%	A	1	1,59	N	H	2,30	0	2,31	0	N	ne
2	6116	M	1941	neuveдено	M81403	2,07	N	0	2,21	dizomie 85%	N	0	1,07	N	N	3,31	1	3,31	1	P	ne
3	5298	F	1945	neuveдено	M81403	1,92	N	0	2,54	nízká polyzomie 20%	H	1	1,32	N	N	2,80	1	2,8	1	H	ne
4	5374	M	1948	neuveдено	M81403	1,95	N	0	2,19	nízká trizomie 10 %	N	0	1,12	N	N	3,63	1	3,63	1	P	ne
5	5150	M	1942	neuveдено	M80703	2,6	H	1	3,94	vysoká polyzomie 69 %	A	1	1,50	N	H	2,26	0	2,26	0	N	ne
6	5068	F	1977	neuveдено	M81406	1,84	N	0	1,92	dizomie 76 %	N	0	1,04	N	N	1,79	0	1,79	0	N	ne
7	5080	M	1939	neuveдено	M80703	2,00	N	0	2,50	nízká polyzomie 14 %	H	1	1,25	N	N	2,97	1	2,97	1	H	ne
8	5125	M	1944	neuveдено	M80703	1,79	N	0	1,81	dizomie 73 %	N	0	1,01	N	N	3,01	1	3,02	1	P	ne
9	5146	M	1938	neuveдено	M80103	2,00	N	0	2,10	dizomie 70 %	N	1	1,05	N	N	2,30	0	2,3	0	N	ne
10	5154	M	1958	neuveдено	M81403	1,88	N	0	1,96	dizomie 82 %	N	0	1,04	N	N	2,24	0	2,24	0	N	ne
11	5151	M	1950	neuveдено	M80703	2,06	N	0	1,84	dizomie 76 %	N	0	0,89	N	N	2,14	0	2,12	0	N	ne
12	5152	M	1937	neuveдено	M83126	1,88	N	0	1,90	dizomie 78 %	N	0	1,01	N	N	4,83	1	4,83	0	P	ne
13	5135	M	1950	neuveдено	M82303	2,06	N	0	2,54	nízká polyzomie 24%	H	1	1,23	N	N	1,92	-1	1,92	-1	N	ne
14	5083	M	1954	neuveдено	M802013	1,96	N	0	2,06	nízká trizomie 10 %	N	0	1,07	N	N	2,20	0	2,20	0	N	ne
15	5116	M	1942	neuveдено	M80703	2,00	N	0	2,18	nízká trizomie 10 %	N	0	1,09	N	N	2,97	1	2,97	1	H	ne
16	5132	F	1977	neuveдено	M80103	2,00	N	0	2,24	nízká trizomie 16 %	N	0	1,12	N	N	2,17	0	2,17	0	N	ne
17	5147	M	1958	neuveдено	M82503	1,86	N	-1	1,80	nízká trizomie 18%	N	-1	0,97	N	N	2,33	0	2,33	0	N	ne
18	5081	M	1932	neuveдено	M80703	4,04	P	1	4,70	vysoká polyzomie 79%	A	1	1,16	N	N	2,85	1	2,85	1	N	ne
19	5077	M	1933	neuveдено	M80703	2,00	N	0	2,14	nízká trizomie 10 %	N	0	1,07	N	N	2,59	1	2,57	1	N	ne
20	4361	F	1937	neuveдено	M80703	2,14	N	0	3,28	vysoká polyzomie 37 %	A	1	1,53	N	H	1,74	-1	1,74	-1	N	ne
21	4745	M	1946	býv. kuřák	M81403	2,07	N	0	2,21	nízká trizomie 10%	N	0	1,07	N	N	2,14	0	2,14	0	N	ne
22	4508	M	1936	neuveдено	M81403	2,81	P	1	3,39	vysoká polyzomie 44 %	A	1	1,21	N	N	2,08	0	2,08	0	N	ne
23	5123	M	1944	neuveдено	M80703	2,00	N	0	2,34	nízká trizomie 10 %	N	0	1,17	N	N	1,83	-1	1,83	-1	N	ne
24	4861	M	1947	býv. kuřák	M80103	1,74	N	1	1,76	dizomie 68 %	N	1	1,01	N	N	2,04	0	2,04	0	N	ne
25	5030	M	1941	neuveдено	M80103	2,10	N	0	2,34	nízká polyzomie 13 %	N	0	1,11	N	N	2,04	0	2,06	0	N	ne

pořadí	CTG	pohlaví	rok narození	kuřáci	morfologie	CEP7	polyzomie	CEP7_výsledek	EGFR	coloradský systém	amplifikace	EGFR_výsledek	EGFR/CEP7	coloradský systém	amplifikace?	ALK_green	ALK_green_výsledek	ALK_orange	ALK_orange_výsledek	polyzomie	ALK_translokace
26	5061	M	1941	neuveдено	M80703	2,08	N	0	3,00	vysoká polyzomie 72 %	A	1	1,44	N	N	2,59	1	2,59	1	H	ne
27	7324	M	1946	kuřák	M80103	2,06	N	0	2,11	dizomie 58 %	N	0	1,02	N	N	2,10	0	2,10	0	N	ne
28	7192	F	1941	neuveдено	M81403	3,37	P	1	3,58	vysoká polyzomie 43 %	A	1	1,06	N	N	2,62	0	2,62	0	H	ne
29	7146	M	1943	neuveдено	M81406	2,05	N	0	2,13	dizomie 90 %	N	0	1,04	N	N	2,12	0	2,14	0	N	ne
30	7388	F	1950	býv kuřák	M81403	2,31	N	0	2,86	nízká polyzomie 20 %	H	1	1,24	N	N	2,70	1	2,69	1	H	ne
31	7355	F	1956	neuveдено	M814033	2,05	N	0	2,15	dizomie 90 %	N	0	1,05	N	N	2,40	0	2,38	0	N	ne
32	7389	F	1939	neuveдено	M852503	2,69	H	1	3,78	vysoká polyzomie 40 %	A	1	1,41	N	N	2,11	0	2,11	0	N	ne
33	7262	M	1945	neuveдено	M81403	2,14	N	0	2,20	nízká trizomie 16 %	N	1	0,97	N	N	2,13	0	2,10	0	N	ne
34	7421	M	1968	neuveдено		2,86	H	1	3,60	vysoká polyzomie 51 %	A	1	1,26	N	N	2,84	1	2,83	1	H	ne
35	7171	F	1947	neuveдено	M81403	2,19	N	0	2,31	nízká polyzomie 11 %	N	0	1,05	N	N	2,24	0	2,20	0	N	ne
36	7185	M	1947	neuveдено	M81403	2,71	H	1	2,65	vysoká polyzomie 21 %	H	1	1,03	N	N	2,55	1	3,55	1	P	ne
37	7094	F	1933	neuveдено	M81403	9,13	P	1	9,13	vysoká polyzomie 83 %	A	1	1,00	N	N	3,48	1	3,48	1	P	ne
38	7124	M	1938	neuveдено	M80703	2,47	N	1	2,45	nízká trizomie 34%	N	1	0,99	N	N	2,57	1	2,57	1	H	ne
39	7141	M	1937	neuveдено	M81403	2,16	N	0	2,56	vysoká trizomie 40 %	H	1	1,19	N	N	3,59	1	3,71	1	P	ano
40	7120	M	1946	neuveдено	M81403	2,03	N	0	2,08	dizomie 87 %	N	0	1,02	N	N	2,15	0	2,14	0	N	ne
41	7062	F	1961	neuveдено	M09030	2,14	N	0	2,26	dizomie 81 %	N	0	1,06	N	N	2,14	0	2,14	0	N	ne
42	6943	M	1938	neuveдено	M81403	4,09	P	1	4,22	vysoká polyzomie 55 %	A	1	1,03	N	N	3,09	1	3,09	1	P	ano
43	6584	M	1935	neuveдено		2,01	N	0	2,11	dizomie 92 %	N	0	1,05	N	N	2,16	0	2,16	0	N	ne
44	6660	M	1940	býv. kuřák	M81403	2,12	N	0	2,24	dizomie 84 %	N	0	1,06	N	N	2,16	0	2,16	0	N	ne
45	6829	M	1946	neuveдено	M81403	2,63	H	0	2,76	nízká polyzomie 20 %	A	1	1,05	N	N	2,08	0	2,08	0	N	ne
46	6971	F	1939	neuveдено	M802013	2,00	N	0	2,04	dizomie 89 %	N	0	1,02	N	N	2,06	0	2,06	0	N	ne
47	6659	M	1950	neuveдено	M802013	2,10	N	0	2,22	dizomie 87 %	N	0	1,06	N	N	2,02	0	2,02	0	N	ne
48	6583	F	1948	neuveдено	M81403	2,05	N	0	2,35	dizomie 81 %	N	0	1,15	N	N	2,45	1	2,45	1	N	ano
49	6663	M	1929	neuveдено	M80703	2,06	N	0	2,18	dizomie 86 %	N	0	1,06	N	N	2,06	0	2,06	0	N	ne
50	6308	M	1933	neuveдено	M80703	2,05	N	0	2,09	dizomie 93 %	N	0	1,02	N	N	2,06	0	2,06	0	N	ne

pořadí	CTG	pohlaví	rok narození	kuřáci	morfologie	CEP7	polyzomie	CEP7_výsledek	EGFR	coloradský systém	amplifikace	EGFR_výsledek	EGFR/CEP7	coloradský systém	amplifikace?	ALK_green	ALK_green_výsledek	ALK_orange	ALK_orange_výsledek	polyzomie	ALK_translokace
51	7023	M	1949	neuveдено	M81406	2,56	H	1	2,82	nízká polyzomie 20 %	H	1	1,10	N	N	2,72	1	2,72	1	H	ne
52	6308	M	1933	neuveдено	M80703	2,05	N	0	2,09	dizomie 93 %	N	0	1,02	N	N	2,06	0	2,06	0	N	ne
53	6981	F	1953	neuveдено	M81403	2,01	N	0	2,11	dizomie 83 %	N	0	1,05	N	N	2,72	1	2,72	1	H	ne
54	6990	F	1942	neuveдено	M81403	2,09	N	0	2,19	dizomie 87 %	N	0	1,05	N	N	2,13	0	2,14	0	N	ne
55	6534	M	1956	neuveдено	M80703	2,17	N	0	2,34	nízká trizomie 14 %	N	0	1,08	N	N	2,10	0	2,10	0	N	ne
56	6864	M	1956	neuveдено	M81403	2,07	N	0	2,11	dizomie 92 %	N	0	1,02	N	N	2,22	0	2,22	0	N	ne
57	6691	M	1938	neuveдено	M81403	2,00	N	0	2,32	nízká trizomie 20 %	N	0	1,16	N	N	2,36	1	2,36	1	N	ne
58	6483	M	1939	neuveдено	M81403	2,10	N	0	2,2	dizomie 86 %	N	0	1,05	N	N	2,15	0	2,15	0	N	ne
59	6708	F	1934	neuveдено	M81403	2,12	N	0	2,21	dizomie 86 %	N	0	1,04	N	N	3,80	1	3,80	1	P	ne
60	6357	M	1934	neuveдено		3,84	P	1	3,84	vysoká polyzomie 66%	A	1	1,00	N	N	3,24	1	3,24	1	P	ne
61	6467	M	1938	neuveдено	M80703	2,29	N	0	2,59	nízká polyzomie 23 %	H	1	1,13	N	N	2,09	0	2,09	0	N	ne
62	7235	F	1944	neuveдено	M81403	2,44	N	0	2,76	nízká polyzomie 26 %	H	1	1,13	N	N	2,02	0	2,39	0	N	ano
63	7355	F	1956	neuveдено	M81403	2,05	N	0	2,15	dizomie 90 %	N	0	1,05	N	N	2,4	0	2,38	0	N	ne
64	7354	M	1949	neuveдено	M81403	2,09	N	0	2,23	dizomie 86 %	N	0	1,07	N	N	2,79	1	2,77	1	H	ne
65	7303	M	1936	neuveдено	M81403	2,09	N	0	2,21	dizomie 87 %	N	0	1,06	N	N	2,26	0	2,29	0	N	ne
66	7261	M	1946	neuveдено	M80103	2,07	N	0	2,21	dizomie 86 %	N	0	1,07	N	N	2,16	0	2,16	0	N	ne
67	7387	M	1940	býv. kuřák	M81403	1,88	N	0	1,93	dizomie 72 %	N	0	1,03	N	N	2,09	0	2,09	0	N	ne
68	7023	M	1949	neuveдено	M81406	2,56	H	1	2,82	nízká polyzomie 20 %	H	1	1,10	N	N	2,72	1	2,72	1	H	ne
69	7101	M	1949	neuveдено	M802013	2,04	N	0	2,02	dizomie 87 %	N	0	0,99	N	N	1,93	0	1,93	0	N	ne
70	6973	F	1941	neuveдено	M81403	2,23	N	0	2,35	nízká polyzomie 13 %	N	0	1,05	N	N	2,43	0	2,45	0	N	ne
71	7079	F	1955	kuřák	M81403	2,47	N	1	2,66	nízká polyzomie 22 %	H	1	1,06	N	N	2,23	0	2,23	0	N	ne
72	6983	M	1955	neuveдено	M80703	2,52	H	1	2,5	nízká trizomie 12%	H	1	0,99	N	N	2,5	1	2,5	1	H	ne
73	7881	M	1936	neuveдено	M80103	2,10	N	0	2,2	dizomie 86 %	N	0	1,05	N	N	2,12	0	2,12	0	N	ne
74	7883	M	1951	neuveдено	M81406	2,20	N	0	2,25	nízká trizomie 17%	N	0	1,02	N	N	2,39	0	2,39	0	N	ne
75	7820	F	1932	neuveдено		7,96	P	1	15	vysoká polyzomie 100%	A	1	1,88	A	A	2,73	1	2,73	1	H	ne

pořadí	CTG	pohlaví	rok narození	kuřáctví	morfologie	CEP7	polyzomie	CEP7_výsledek	EGFR	coloradský systém	amplifikace	EGFR_výsledek	EGFR/CEP7	coloradský systém	amplifikace?	ALK_green	ALK_green_výsledek	ALK_orange	ALK_orange_výsledek	polyzomie	ALK_translokace
76	7094	F	1933	neuveдено	M81403	9,13	P	1	9,13	vysoká polyzomie 83 %	A	1	1,00	N	N	3,48	1	3,48	1	P	ne
77	7859	F	1951	neuveдено	M81406	3,55	P	1	4	vysoká polyzomie 53%	A	1	1,13	N	N	2,89	1	2,89	1	H	ne
78	7825	M	1940	neuveдено	M81403	3,03	P	1	3,21	nížká polyzomie 37 %	A	1	1,06	N	N	2,06	0	2,06	0	N	ne
79	7824	M	1945	neuveдено	M81403	2,09	N	0	2,12	dizomie 91 %	N	0	1,01	N	N	2,06	0	2,06	0	N	ne
80	7846	M	1946	neuveдено	M81403	2,11	N	0	2,22	dizomie 86 %	N	0	1,05	N	N	2,43	0	2,43	0	N	ne

pořadí	CTG	CEP7	polyzomie	CEP7_výsledek	C-MET	amplifikace	C-MET_výsledek	C-MET/CEP7	amplifikace?	CEP8	polyzomie	CEP8_výsledek	FGFR1	amplifikace	FGFR1_výsledek	FGFR1/CEP8	amplifikace
1	6103	1,80	N	0	1,79	N	1	0,99	N	0,95	N	0	0,91	N	0	0,96	N
2	6116	0,88	N	0	0,91	N	0	1,03	N	2,01	N	0	1,57	N	-1	0,78	N
3	5298	1,10	N	0	1,10	N	0	1,00	N	2,08	N	0	2,08	N	0	1,00	N
4	5374	2,18	N	0	2,18	N	0	1,00	N	2,23	N	0	2,22	N	0	1,00	N
5	5150	2,22	N	0	2,38	N	0	1,07	N	2,08	N	0	2,12	N	0	1,02	N
6	5068	2,07	N	0	2,19	N	0	1,06	N	2,12	N	0	2,2	N	0	1,04	N
7	5080	1,98	N	0	2,07	N	0	1,05	N	2,13	N	0	2,28	N	0	1,07	N
8	5125	2,23	N	0	2,07	N	0	0,93	N	2,08	N	0	2,06	N	0	1,00	N
9	5146	2,08	N	0	2,18	N	0	1,05	N	2,04	N	0	2,13	N	0	1,04	N
10	5154	2,10	N	0	2,24	N	0	1,07	N	2,14	N	0	2,3	N	0	1,07	N

pořadí	CTG	CEP7	polyzomie	CEP7_výsledek	C-MET	amplifikace	C-MET_výsledek	C-MET/CEP7	amplifikace?	CEP8	polyzomie	CEP8_výsledek	FGFR1	amplifikace	FGFR1_výsledek	FGFR1/CEP8	amplifikace
11	5151	2,02	N	0	2,10	N	0	1,04	N	1,98	N	0	2,03	N	0	1,03	N
12	5152	1,99	N	0	2,07	N	0	1,04	N	2,07	N	0	2,11	N	0	1,02	N
13	5135	2,26	N	0	2,38	N	0	1,05	N	2,10	N	0	2,27	N	0	1,08	N
14	5083	2,15	N	0	3,00	A	1	1,4	N	2,01	N	0	2,02	N	0	1,00	N
15	5116	3,00	P	1	4,23	A	1	1,41	N	2,03	N	0	2,03	N	0	1,00	N
16	5132	1,26	N	0	2,22	N	0	1,76	H	2,07	N	0	2,07	N	0	1,00	N
17	5147	2,08	N	0	2,16	N	0	1,04	N	2,08	N	0	2,08	N	0	1,00	N
18	5081	2,05	N	0	2,11	N	0	1,03	N	2,22	N	0	2,22	N	0	1,00	N
19	5077	2,13	N	0	2,28	N	0	1,07	N	1,92	N	0	1,87	N	0	0,97	N
20	4361	2,11	N	0	2,11	N	0	1,00	N	2,10	N	0	2,18	N	0	1,04	N
21	4745	2,05	N	0	2,13	N	0	1,04	N	2,01	N	0	2,18	N	0	1,08	N
22	4508	1,67	N	-1	1,90	N	-1	1,10	N	2,11	N	0	2,04	N	0	0,97	N
23	5123	1,90	N	-1	2,00	N	0	1,05	N	2,04	N	0	2,15	N	0	1,05	N
24	4861	2,07	N	0	1,99	N	0	0,96	N	1,77	N	-1	1,91	N	0	1,08	N
25	5030	1,97	N	0	2,07	N	0	1,05	N	2,04	N	0	2,01	N	0	0,98	N
26	5061	2,00	N	0	2,12	N	0	1,06	N	2,02	N	0	2,08	N	0	1,03	N
27	7324	2,27	N	0	2,09	N	0	0,92	N	2,04	N	0	2,00	N	0	0,98	N
28	7192	2,74	H	1	3,01	N	1	1,10	N	2,56	H	0	2,05	N	0	1,02	N
29	7146	2,10	N	0	2,02	N	0	0,96	N	2,15	N	0	2,05	N	0	0,95	N
30	7388	2,22	N	0	2,16	N	0	0,97	N	2,09	N	0	2,14	N	0	1,02	N
31	7355	2,31	N	0	2,26	N	0	0,98	N	2,67	H	0	2,62	H	0	0,98	N
32	7389	2,59	H	1	2,62	H	1	1,01	N	2,23	N	0	2,30	N	0	1,03	N
33	7262	2,39	N	0	2,30	N	0	0,96	N	2,39	N	0	2,37	N	0	0,99	N
34	7421	2,08	N	0	15,00	A	1	7,20	A	2,20	N	0	2,21	N	0	1,00	N
35	7171	2,49	N	0	2,34	N	1	0,94	N	1,97	N	0	2,05	N	0	1,04	N

pořadí	CTG	CEP7	polyzomie	CEP7_výsledek	MET	amplifikace	C-MET_výsledek	C-MET/CEP7	amplifikace?	CEP8	polyzomie	CEP8_výsledek	FGFR1	amplifikace	FGFR1_výsledek	FGFR1/CEP8	amplifikace
36	7185	2,36	N	0	2,46	N	1	1,04	N	2,66	N	0	3,29	A	1	1,24	N
37	7094	4,92	P	1	2,37	N	1	0,48	N	2,19	N	0	2,00	N	0	0,91	N
38	7124	3,27	P	1	2,78	H	1	0,85	N	2,28	N	0	3,61	A	1	1,58	N
39	7141	2,08	N	0	2,05	N	0	0,99	N	2,06	N	0	2,04	N	0	0,99	N
40	7120	2,16	N	0	2,10	N	0	0,97	N	2,08	N	0	2,03	N	0	0,98	N
41	7062	1,99	N	0	2,33	N	1	1,17	N	2,56	H	0	1,96	N	0	0,77	N
42	6943	1,88	N	0	1,90	N	0	1,01	N	1,67	N	-1	1,60	N	-1	0,96	N
43	6584	1,84	N	-1	1,82	N	0	0,99	N	2,04	N	0	2,06	N	0	1,10	N
44	6660	1,84	N	-1	1,94	N	0	1,05	N	1,88	N	0	1,69	N	-1	0,90	N
45	6829	3,06	P	1	2,92	H	1	0,95	N	4,16	P	1	1,78	N	-1	0,43	N
46	6971	2,06	N	0	2,06	N	0	1,00	N	1,58	N	-1	1,72	N	-1	1,09	N
47	6659	2,08	N	0	2,18	N	0	1,05	N	1,94	N	0	1,94	N	0	1,00	N
48	6583	2,16	N	0	2,16	N	0	1,00	N	1,94	N	0	1,90	N	0	0,98	N
49	6663	1,88	N	0	1,88	N	0	1,00	N	1,52	N	-1	1,56	N	-1	1,03	N
50	6308	1,92	N	0	1,92	N	0	1,00	N	1,76	N	-1	1,82	N	-1	1,03	N
51	7023	1,66	N	-1	1,62	N	-1	0,98	N	1,54	N	-1	1,90	N	-1	1,23	N
52	6308	1,74	N	-1	1,90	N	-1	1,09	N	1,76	N	-1	1,66	N	-1	0,94	N
53	6981	2,34	N	1	2,34	N	1	1,00	N	2,18	N	1	2,12	N	0	0,97	N
54	6990	1,73	N	0	1,73	N	0	1,00	N	2,16	N	0	2,18	N	0	1,01	N
55	6534	1,80	N	0	1,80	N	0	1,00	N	2,47	N	1	2,52	H	1	1,02	N
56	6864	1,32	N	-1	1,34	N	-1	1,02	N	1,72	N	-1	1,72	N	-1	1,00	N
57	6691	1,78	N	-1	1,48	N	-1	0,83	N	1,71	N	-1	1,71	N	-1	1,00	N
58	6483	2,76	H	1	2,38	N	1	0,86	N	1,92	N	0	1,76	N	-1	0,92	N
59	6708	2,00	N	0	2,00	N	0	1,00	N	1,75	N	-1	1,75	N	-1	1,00	N
60	6357	2,00	N	1	2,01	N	1	1,01	N	2,03	N	0	2,10	N	0	1,04	N

pořadí	CTG	CEP7	polyzomie	CEP7_výsledek	C-MET	amplifikace	C-MET_výsledek	C-MET/CEP7	amplifikace?	CEP8	polyzomie	CEP8_výsledek	FGFR1	amplifikace	FGFR1_výsledek	FGFR1/CEP8	amplifikace
61	6467	2,68	H	1	2,15	N	0	0,80	N	1,70	N	0	1,83	N	0	1,08	N
62	7235	2,62	H	1	2,62	H	1	1,00	N	1,64	N	-1	1,68	N	-1	0,98	N
63	7355	1,84	N	-1	2,42	N	1	1,32	N	1,86	N	-1	1,84	N	-1	0,99	N
64	7354	2,34	N	1	2,32	N	1	0,99	N	1,98	N	-1	1,94	N	0	0,98	N
65	7303	2,2	N	0	2,1	N	0	0,99	N	1,76	N	-1	1,88	N	0	1,07	N
66	7261	1,9	N	-1	2,05	N	0	1,08	N	1,98	N	0	2,16	N	0	1,09	N
67	7387	1,9	N	-1	2	N	0	1,05	N	1,68	N	-1	1,58	N	-1	0,94	N
68	7023	1,9	N	-1	1,86	N	-1	0,98	N	1,74	N	-1	1,96	N	-1	1,13	N
69	7101	1,92	N	-1	1,86	N	-1	0,97	N	1,58	N	-1	1,62	N	-1	1,03	N
70	6973	1,98	N	0	1,98	N	0	1	N	1,9	N	0	1,85	N	0	0,98	N
71	7079	2,21	N	1	2,13	N	0	0,96	N	1,68	N	-1	1,82	N	-1	1,08	N
72	6983	2,63	H	1	2,68	H	1	1,02	N	2,06	N	1	2,2	N	1	1,07	N
73	7881	1,73	N	0	1,73	N	0	1	N	1,68	N	-1	1,73	N	-1	1,03	N
74	7883	2,66	H	1	2,03	N	0	0,87	N	1,97	N	0	2,03	N	0	1,03	N
75	7820	3,05	P	1	2,02	N	0	0,66	N	3,47	P	1	1,73	N	-1	0,5	N
76	7094	3,84	P	1	2,62	H	1	0,68	N	2,02	N	0	2	N	0	0,99	N
77	7859	2,4	N	1	2,44	N	1	1,02	N	1,9	N	-1	1,88	N	-1	0,99	N
78	7825	2,6	H	1	3,32	A	0	0,9	N	2,42	N	1	2,48	N	1	1,02	N
79	7824	1,82	N	0	1,48	N	-1	0,81	N	1,92	N	0	2,04	N	0	1,06	N
80	7846	1,8	N	-1	1,7	N	-1	0,94	N	2,22	N	1	2,16	N	1	0,97	N

Tabulka č. IX: Souhrnné tabulky vyšetření pacientů pro geny EML4-ALK, EGFR, C-MET a FGFR1 (M80703 invazivní spinocelulární karcinom; M809030 bazaliom; M80103 jiná primární epitelální malignita; M802013 nedefinovatelný karcinom; M81403 adenokarcinom NOS (Not Otherwise Specified); M81406 metastatický NOS adenokarcinom; M82303 „solid“ karcinom; M82503 bronchoalveolární karcinom; M83126 metastáza hypernephromu; M852503 adenokarcinom nízkého gradu).

4.2 RT real-time PCR fúzního genu EML4-ALK

Pomocí RNeasy® FFPE Kitu byla vyizolována RNA ze 23 vzorků tkání karcinomů plic zalitých v parafínu. Dále byla tímto kitem vyizolována RNA z buněčné linie NCI-H2228. Tato linie byla předtím kultivována a zalita do parafínového bločku. Vyizolovaná RNA byla přepsána do cDNA. Koncentrace RNA a cDNA byla změřena nanodropem. Koncentrace vyizolované RNA, cDNA a jejich čistota jsou uvedeny v tabulce č. X. Optimální hodnoty čistoty RNA a DNA se pohybují mezi 1,8-2. Všeobecně je čistota RNA a DNA získaná z FFPE vzorků horší, ale pro analýzu je dostačující.

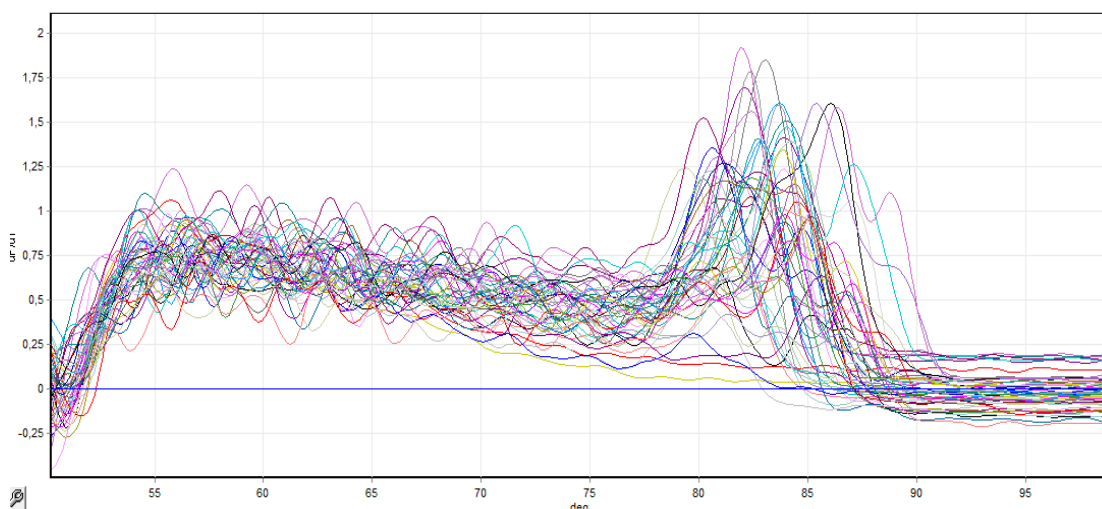
Tabulka č. X: Koncentrace RNA, cDNA a jejich čistota.

vzorek	koncentrace RNA [ng/μl]	čistota 260/280	koncentrace cDNA [ng/μl]	čistota 260/280
1515	29,29	1,52	2857,60	1,65
2625	46,02	1,41	3027,07	1,65
1311	117,24	1,89	2665,97	1,67
2432	13,72	1,42	2894,33	1,66
1934	144,16	1,84	3102,10	1,67
2555	239,32	1,90	3033,16	1,66
2211	105,0	1,54	2756,15	1,67
1935	51,21	1,78	2791,99	1,67
1429	109,67	1,42	2695,86	1,67
1841	12,52	1,69	2026,21	1,66
1668	31,23	1,75	2098,55	1,65
2419	9,66	1,79	2136,83	1,65
1612	41,23	1,57	1933,95	1,66
1695	13,43	1,67	2368,03	1,66
1580	14,72	1,72	1935,76	1,66
1768	235,97	1,98	2217,85	1,66
1316	97,93	1,90	2021,44	1,67
2623	57,62	1,86	2278,67	1,65
2013	24,88	1,49	2035,70	1,67
2039	22,83	1,57	2055,62	1,67
1601	68,45	1,93	2061,65	1,68

vzorek	koncentrace RNA [ng/μl]	čistota 260/280	koncentrace cDNA [ng/μl]	čistota 260/280
1744	42,41	1,45	2002,29	1,67
1483	34,27	1,45	1993,47	1,67
H2228	775,26	1,96	1929,87	1,80

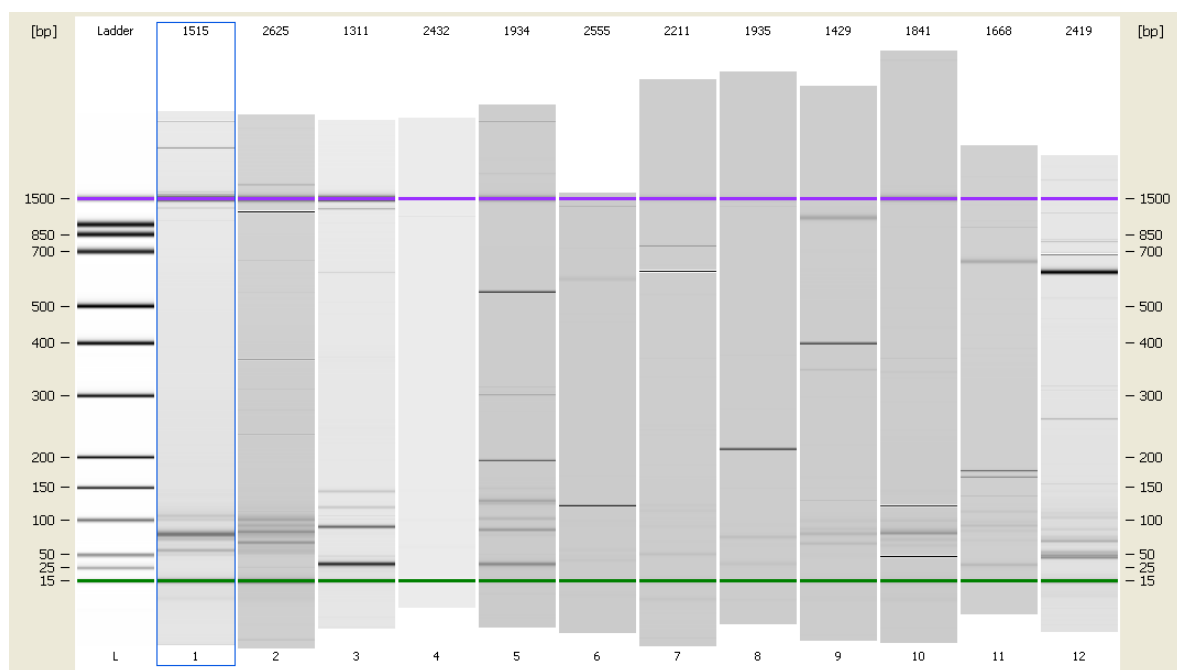
Byla provedena RT real-time PCR analýza s primery pro různé varianty fúzního genu EML4-ALK. Pro variantu 1 a 3 byly převzaty primery z článku Wallander *et al.* (2012). Experiment byl rovněž proveden se sadou vlastních primerů pro varianty 1 a 3 navržených v programu Primer3.

Na základě analýzy meltingové křivky bylo zjištěno, že dochází ke vzniku mnoha nespecifických produktů. Na obr. č. 18 je uveden příklad křivky meltingové analýzy s primery pro variantu 1 dle Wallander *et al.* Nespecifické produkty byly sledovány u všech meltingových křivek pro různé varianty i pro GAPDH.

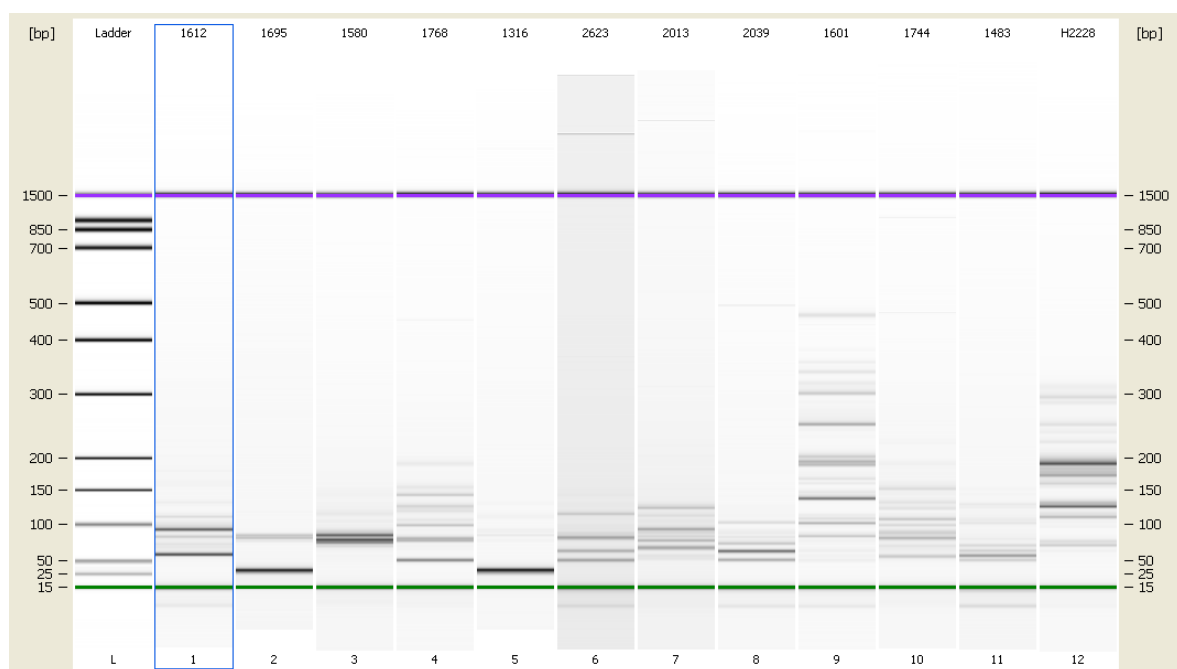


Obr. č. 18: Křivka meltingové analýzy PCR produktů pro variantu 1.

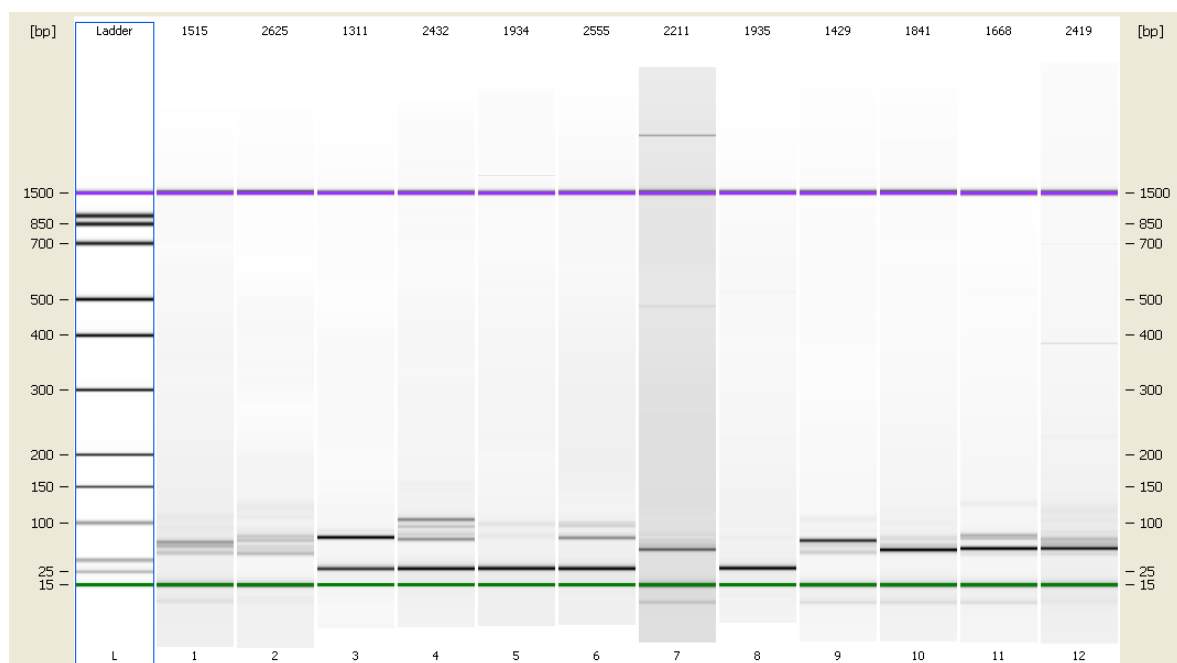
PCR produkt vytvořený podle primeru na variantu 1 od Wallander *et al.* má deklarovanou délku 109 bp varianta V3a má 105 bp a V3b 138 bp. Mnou navržené primery pro varianty 1 a 3 amplifikují produkt o délce 150 bp. Délka PCR produktů byla ověřena na DNA čípech. Výsledky detekce genu pro EML4-ALK variant 1 a 3 dle Wallander *et al.* jsou zobrazeny na obr. č. 19, 20, 21, 22.



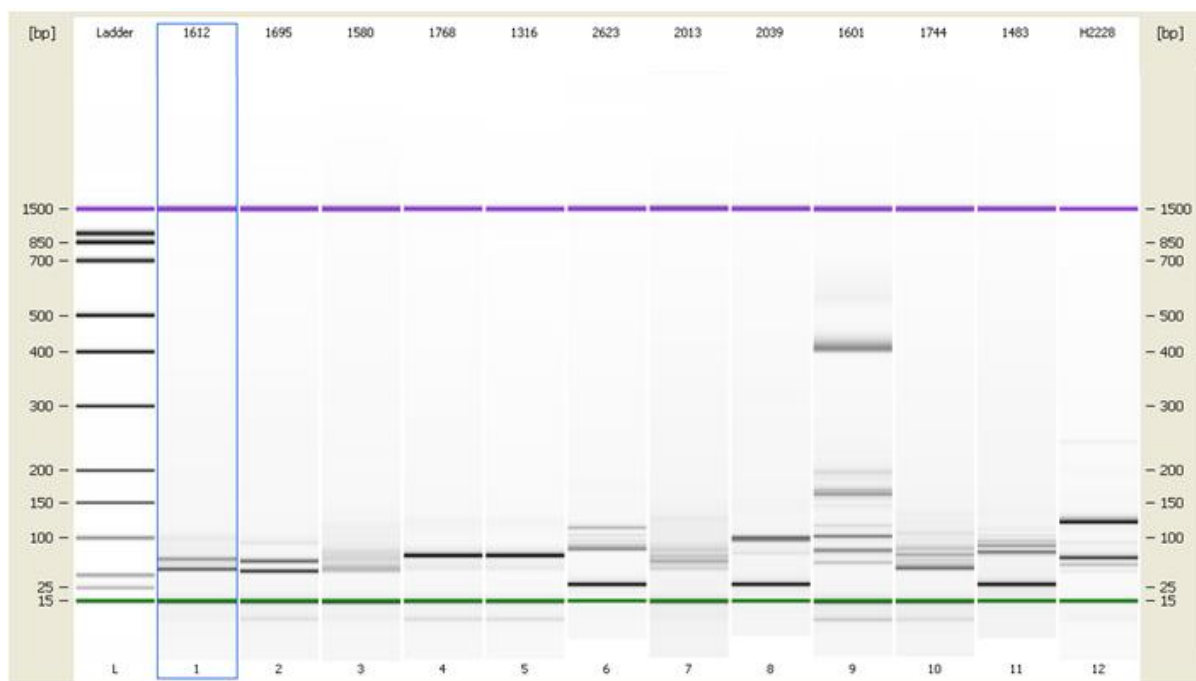
Obr. č. 19: Elektroforetogram ampliconů pro sadu vzorků s primery od Wallander *et al.* pro fúzní gen EML4-ALK varianty 1, očekávaná délka ampliconu je 109 bp.



Obr. č. 20: Elektroforetogram ampliconů pro sadu vzorků s primery od Wallander *et al.* pro fúzní gen EML4-ALK varianty 1, očekávaná délka ampliconu je 109 bp.

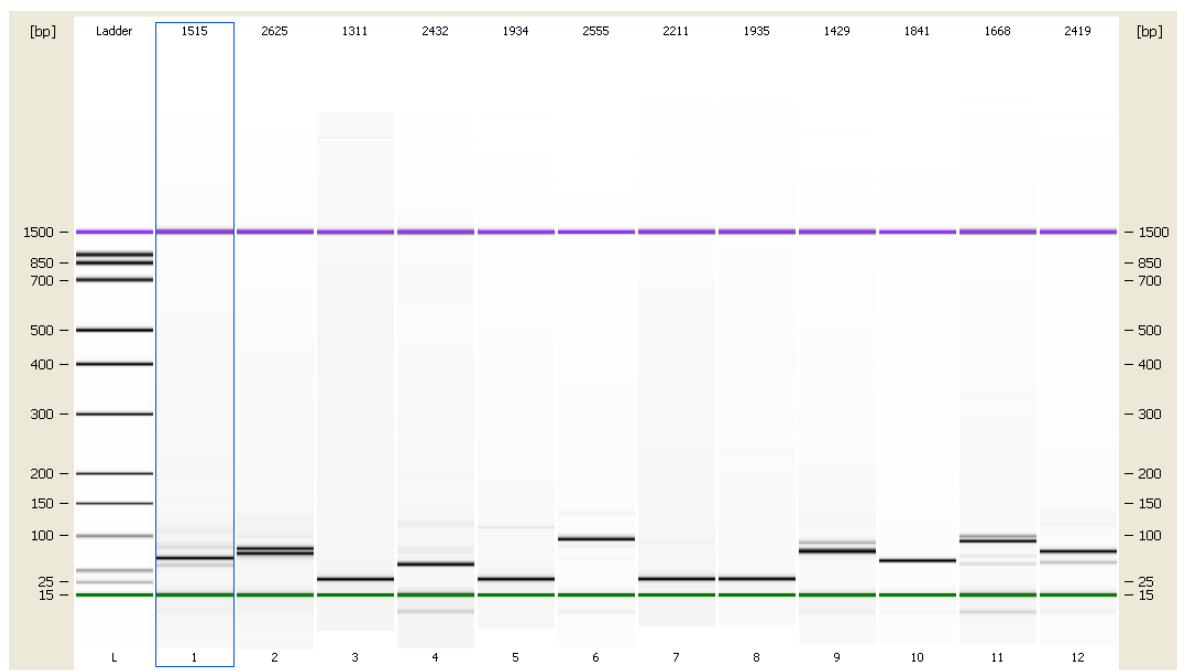


Obr. č. 21: Elektroforetogram ampliconů pro sadu vzorků s primery od Wallander *et al.* pro fúzní gen EML4-ALK varianty 3, očekávaná délka ampliconu je 105 a 138 bp.

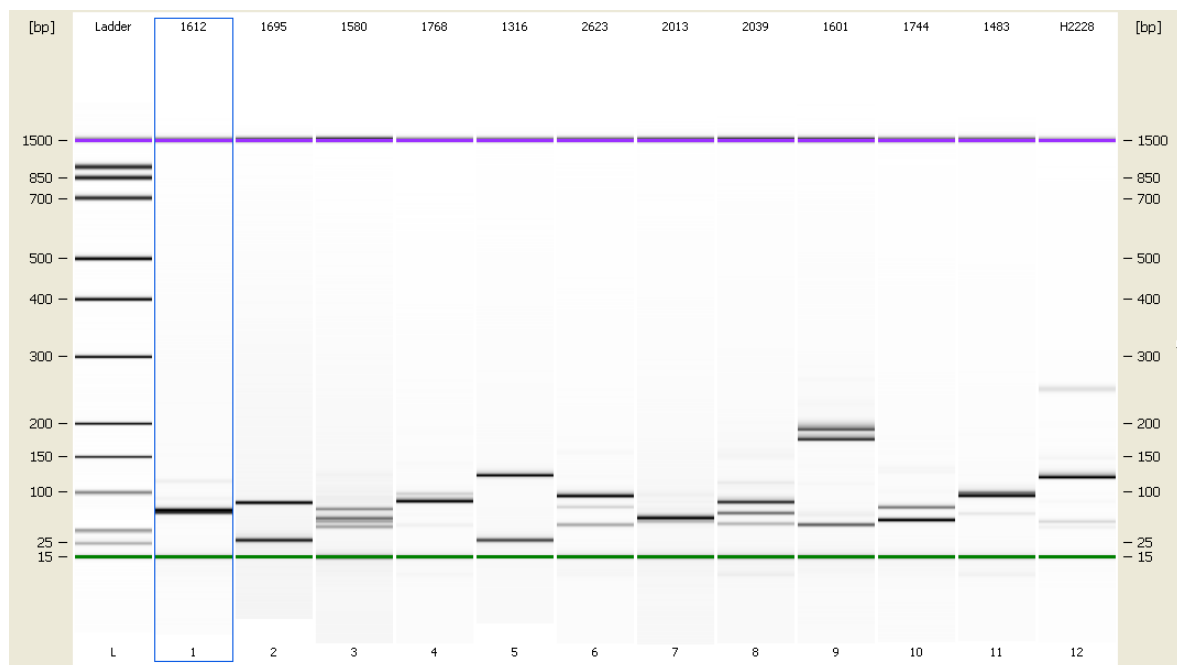


Obr. č. 22: Elektroforetogram ampliconů pro sadu vzorků s primery od Wallander *et al.* pro fúzní gen EML4-ALK varianty 3, očekávaná délka ampliconu je 105 a 138 bp.

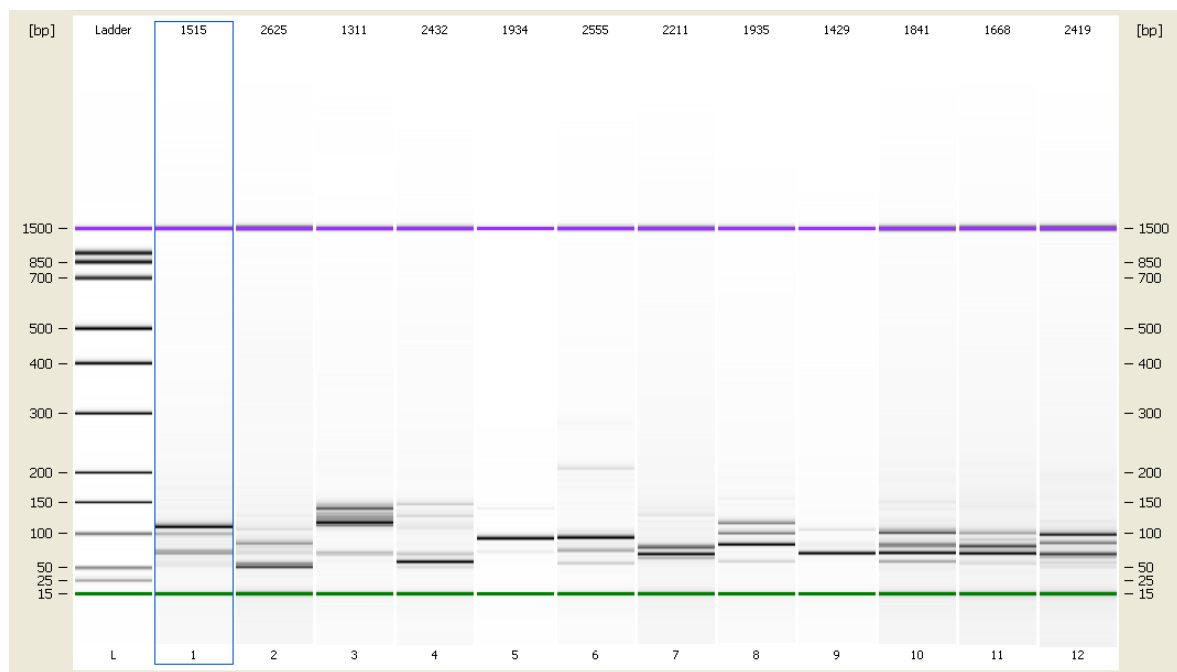
Výsledky detekce fúzního genu EML4-ALK o variantách 3 a 6 jsou zobrazeny na obr. č. 23, 24, 25, 26.



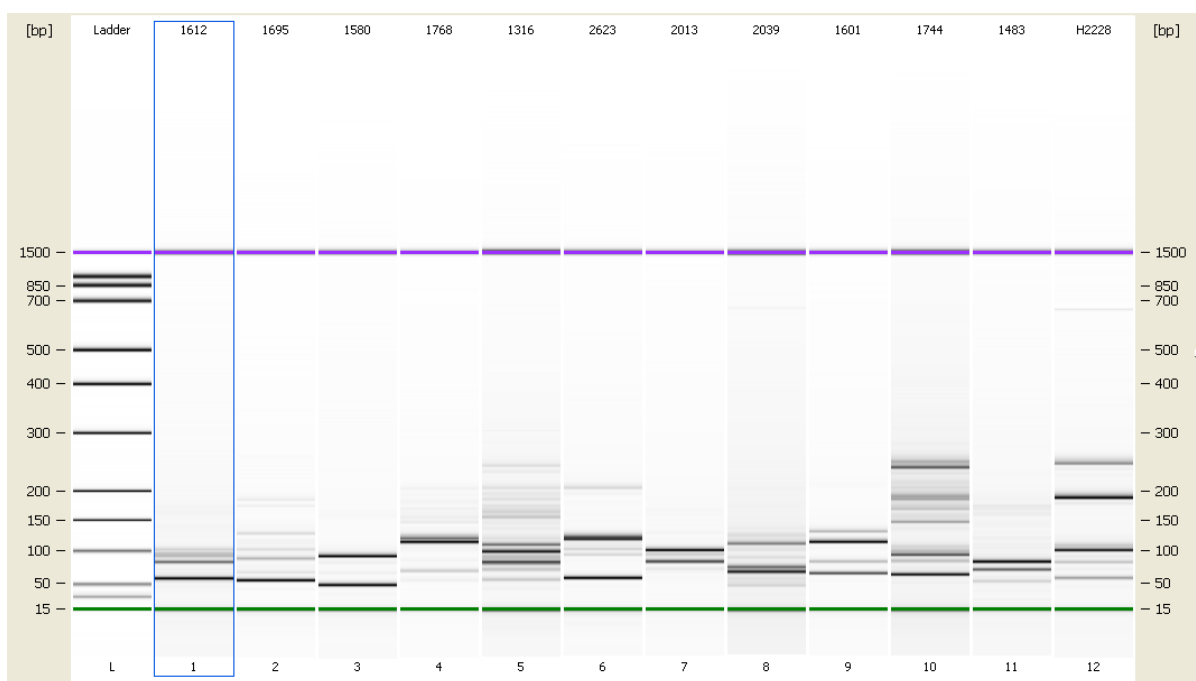
Obr. č. 23: Elektroforetogram ampliconů pro sadu vzorků s navrženými primery pro fúzní gen EML4-ALK varianty 3, očekávaná délka ampliconu je 150 bp.



Obr. č. 24: Elektroforetogram ampliconů pro sadu vzorků s navrženými primery pro fúzní gen EML4-ALK varianty 3, očekávaná délka ampliconu je 150 bp.

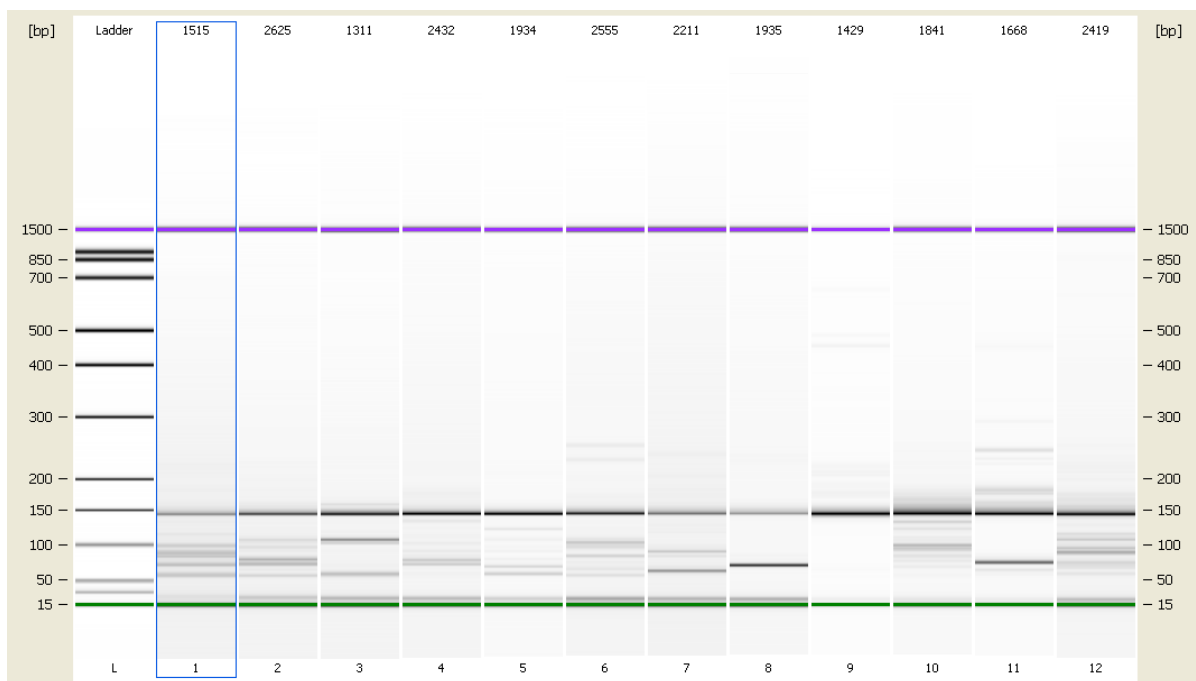


Obr. č. 25: Elektroforetogram ampliconů pro sadu vzorků s navrženými primery pro fúzní gen EML4-ALK varianty 1, očekávaná délka ampliconu je 150 bp.

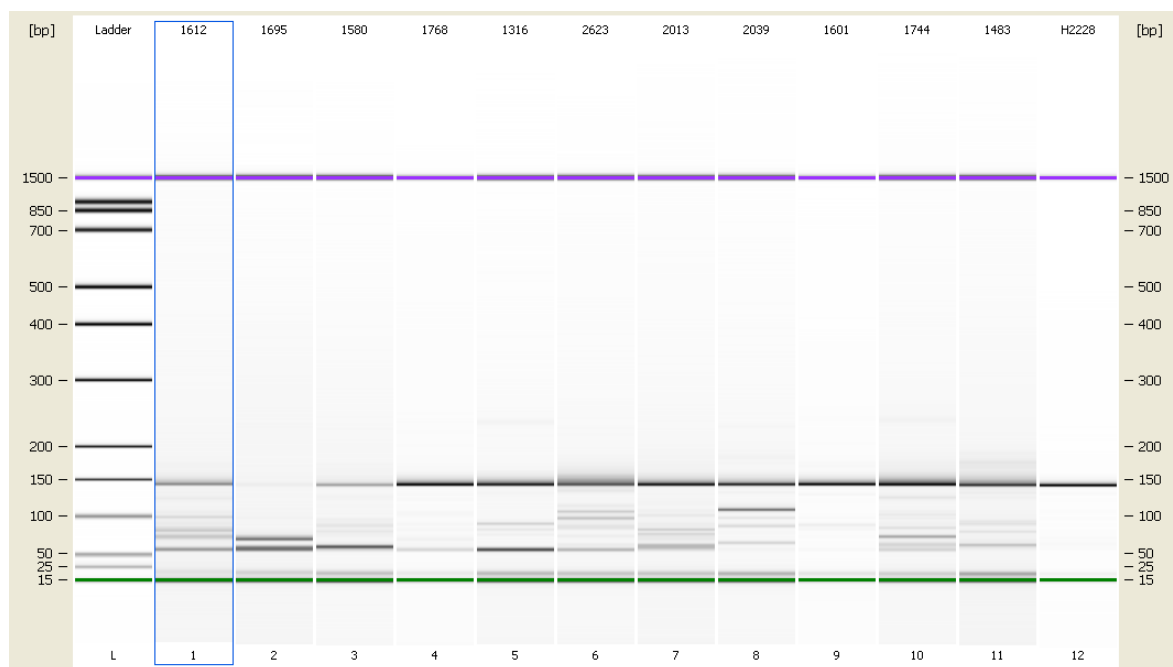


Obr. č. 26: Elektroforetogram ampliconů pro sadu vzorků s navrženými primery pro fúzní gen EML4-ALK varianty 1, očekávaná délka ampliconu je 150 bp.

Správnost izolace RNA a její přepis do cDNA byla potvrzena pomocí primerů pro housekeepingový gen GAPDH, délka ampliconu je 150 bp. Dosažené výsledky detekce genu GAPDH jsou zobrazeny na obr. č. 27 a 28.

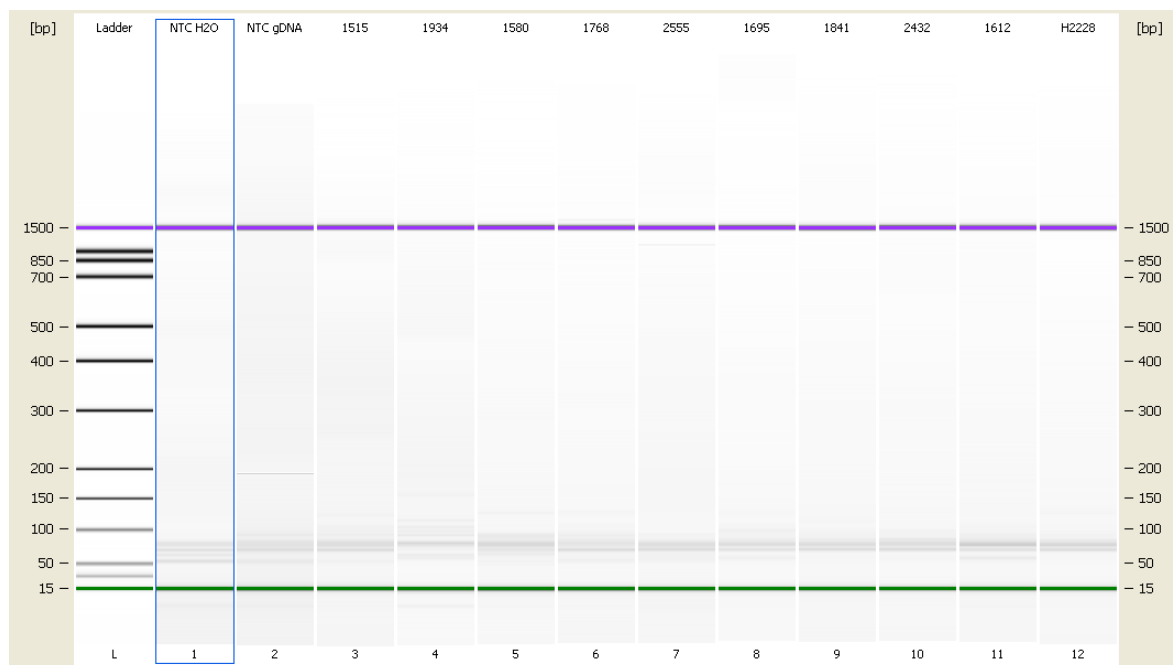


Obr. č. 27: Výstup z DNA čipu pro sadu vzorků s primery pro GAPDH.



Obr. č. 28: Výstup z DNA čipu pro sadu vzorků s primery pro GAPDH.

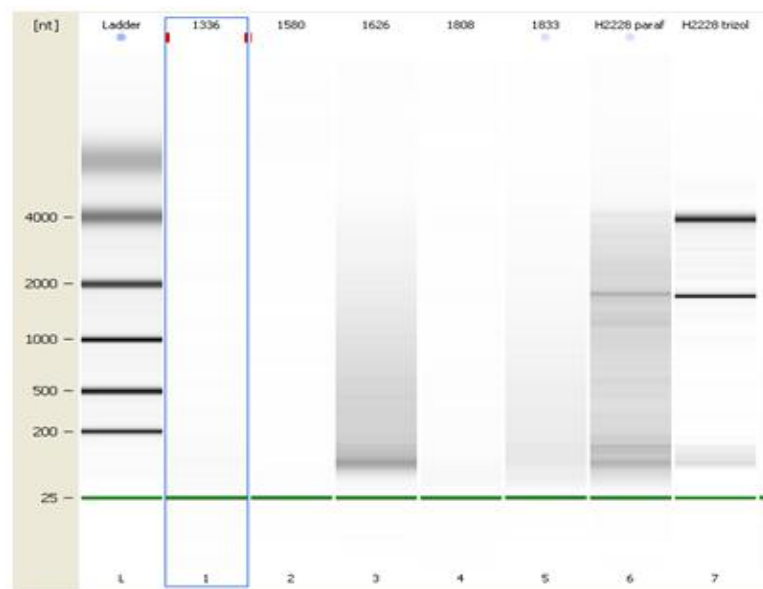
Z důvodu vysokého množství PCR produktů detekovaných na DNA čípech mimo očekávaný band (150 bp), byla vyzkoušena metoda přidání genomické DNA. PCR mix byl modifikován přidáním 1 μ l gDNA o koncentraci 100 ng/ μ l vyizolované z buněčné linie CEM. Vliv modifikovaného PCR mixu na detekci varianty 1 dle Wallander *et al.* je uveden na obr. č. 29. Došlo ke snížení koncentrace PCR produktů, ale nedošlo k inhibici vzniku nesespecifických produktů.



Obr. č. 29: Detekce varianty 1 pomocí primerů od Wallander *et al.*, upravený PCR mix s gDNA buněčné linie CEM.

Dále byly vyzkoušeny různé koncentrace $MgCl_2$ (3mM, 4mM a 5 mM) pro optimalizaci RT real-time PCR. Protože nebylo dosaženo signifikantních změn, nejsou výsledky z DNA čipů uvedeny.

Na základě výsledků byla dodatečně vyizolována RNA z plicní tkáně pacientů, buněčné linie NCI-H2228 zalité v parafínu a v trizolu. Získané výsledky analýzy na RNA čipu jsou zobrazeny na obr. č. 30. Vzorek uchovaný v trizolu vykazuje minimální fragmentaci RNA oproti vzorkům uchovaným v parafínu.



Obr. č. 30: Výsledek analýzy RNA vyizolované z patientských vzorků uchovávaných v parafínu s RNA buněčné linie uchovávané jak v trizolu tak parafínu.

5 Diskuze

Cílem práce bylo zjistit prognosticko-prediktivní hodnotu genů C-MET, FGFR1, EGFR a ALK pro pacienty s karcinomem plic a napomoci návržení vhodného algoritmu vyšetřování pacientů pomocí FISH metody, použitelného pro rutinní praxi.

Byly připraveny duální (Spectrum Orange a Spectrum Green) DNA sondy (FGFR1/CEP8 a C-MET/CEP7) pro FISH, izolací bakteriálních plasmidů s inzertem a následným fluorescenčním značením. Byla ověřena kvalita hybridizace a specifita vazby. Obě připravené sondy vykazovaly na chromozomálních preparátech vysokou specifitu ke své předpokládané vazebné oblasti a zkřížená hybridizace nebyla nalezena. Získané signály byly dostatečně kvalitní a intenzivní v porovnání k nespecifickému pozadí vzorku. V současné době probíhají stabilitní studie a je zpracovávána dokumentace pro použití těchto sond jako *in vitro* diagnostika (CE IVD certifikace). Zajímavostí je, že při testování sondy FGFR1/CEP8 jsme použili buněčnou linii NCI-H520, u které je v literatuře popsána amplifikace genu FGFR1 (Dutt *et al.*, 2011). Amplifikaci se nám nepodařilo prokázat pomocí připravené ani komerční sondy, a to ani na nově dodané linii (ATCC), tj. linie bez možných genetických změn vzniklých kultivací. V literatuře ani materiálech dodejce linie však nebyly o amplifikaci FGFR1 nalezeny další záznamy, předpokládáme tedy, že se může jednat o chybu autorů.

Byl vyšetřen soubor 80 pacientů s karcinomem plic, diagnostikovaných v letech 2010-2013, histologicky určených převážně jako adenokarcinom 52,5 % (42/80). Medián věku pacientů byl 69 let (věkový průměr 67,8 let), 71,25 % (57/80) představovali muži. Pacientské vzorky byly vyšetřeny metodou FISH s použitím připravených DNA sond FGFR1/CEP8 a C-MET/CEP7 a komerčně získaných EGFR/CEP7 a break apart ALK sond.

Statistická analýza dat byla provedena pomocí softwaru Statistica8. Jako statisticky významná byla považována hladina testu $p < 0,05$ (trend), resp. $p < 0,01$ (korelace). Při testování byl použit Mann-Whitney test z důvodu porušení normality dat a χ^2 test nezávislosti v kontingenčních tabulkách.

Ze statistické analýzy vyplývá, že se zvyšujícím se věkem dochází častěji k polyzomii chromozomu 7 ($p=0,012$) resp. $p=0,022$ (Colorado hodnocení) a tím i ke zvýšení počtu kopií genu EGFR ($p=0,041$). Pro gen C-MET, který je rovněž na chromozomu 7 lokalizován, nevychází hodnota statisticky významně ($p=0,153$). Tato skutečnost může být důsledkem malého množství pacientů v souboru ($N=80$). Všeobecně, polyzomie chromozomů zvyšující se s věkem pacientů byla již u některých diagnóz v literatuře popsána (Bourouba *et al.*, 2011), avšak polyzomie chromozomu 7 u karcinomů plic není s věkem pacienta dosud v dostupné literatuře spojována. Jak se ukazuje, zvýšený počet chromozomů 7 by mohl mít

vliv na celkové přežití pacientů léčených gefitinibem (Buckingham *et al.*, 2007) a to i nepřímý, neboť v důsledku této polyzomie dochází ke zvýšení počtu kopií dalších onkogenů, u kterých již byl vliv na karcinom plic (EGFR, C-MET) (Park *et al.*, 2012) prokázán u jiných diagnóz či je jeho onkogenní účinek diskutován, např. B-RAF (Pao *et al.*, 2011), DMP1 (Frazier *et al.*, 2012), ST7 (Charong *et al.*, 2011) apod.). Souvislost mezi polyzomií chromozomu 7 a počty kopií genů EGFR resp. C-MET byla u našeho souboru dle očekávání prokázána ($p < 0,0001$ resp. $p = 0,02$), avšak prokázán byl i statisticky významný vliv na počet kopií genu ALK (chromozom 2; $p = 0,043$), viz dále. Vyšší počet kopií genu EGFR byl u našeho souboru nalezen u 41,25 % (33/80), resp. u 56,25 % (45/80), dle hodnocení Colorado. Nejčastěji bylo zvýšení nalezeno u pacientů se spinocelulárním karcinomem (50 %; 9/18) a adenokarcinomem (40,5 %; 17/42), což odpovídá publikovaným datům (Kim *et al.*, 2012). Vyšetření EGFR bude v další práci doplněno mutačními analýzami. I když se v poslední době zdá, že vyšetřování EGFR metodou FISH nebude doporučováno pro indikaci léčby tyrozinkinázovými inhibitory (Vincent *et al.*, 2012), data nejsou příliš konzistentní a navíc určení počtu kopií tohoto genu by mohlo mít vliv na prognózu onemocnění či jiné typy terapie (Murray *et al.* 2012; Pallis *et al.*, 2011). Rovněž např. Schneider *et al.* (2008) potvrdili, že pozitivita EGFR určená pomocí FISH koreluje s celkovým přežitím a obdobím bez známek progresu, oproti tomu vyšetření pomocí imunohistochemie koreluje jen slabě a považují vyšetřování EGFR metodou FISH za vhodné pro predikci účinnosti léčby tyrozinkinázovými inhibitory. Problémem při určování prediktivní a prognostické hodnoty počtu kopií EGFR je také fakt, že se změny kopií EGFR často vyskytují společně s aktivačními mutacemi EGFR, což může do značné míry analýzy ovlivnit.

Na vyšetřeném souboru vzorků se nepodařilo potvrdit vztah mezi počtem kopií EGFR a pohlavím, avšak polyzomie chromozomu 7 a zvýšení počtu kopií C-MET bylo častěji nalézáno u žen než u mužů ($p = 0,04$ resp. $p = 0,02$). Vzhledem k pracem, které prokázaly častější aberace EGFR u žen (Wang *et al.*, 2013) předpokládáme, že se jedná o chybu vzniklou dosud malým souborem zkoumaných pacientů. Současně zvýšený počet kopií C-MET i EGFR byl nalezen u 13 pacientů (16,25 %; 13/80; $p = 0,0252$), což odpovídá již publikovaným datům (Cappuzzo *et al.*, 2009). 3 pacienti (3,75 %; 3/80) vykazovali současně zvýšený počet kopií genů FGFR1 a C-MET, $p = 0,0252$. Tato korelace nebyla prozatím potvrzena žádnou publikací, může však být způsobena již zmíněnými polyzomiemi vícero chromozomů v jádře (fakt, že nádory jsou všeobecně charakterizovány polyzomiemi/polyploidii a dalšími aberacemi byl popsán již v roce 1992 - Testa *et al.*, 1992).

U jednoho pacienta byla nalezena vysoká amplifikace C-MET a u jednoho hraniční hodnota (celkově 2,5 %; 2/80). Jen asi 4-7 % pacientů s rakovinou plic vykazuje pravou

amplifikaci C-MET *de novo* (Sierra *et al.*, 2011), typickou pro pokročilejší stádium onemocnění a předpovídající kratší dobu přežití pacientů (Zhao *et al.*, 2005). Sledování této amplifikace je důležité také z důvodu, že je jedním z mechanismů rezistence k EGFR tyrozinkinázovým inhibitorům jako je erlotinib.

Vysoká hladina amplifikace FGFR1 se vyskytuje asi ve 20 % případů spinocelulárních karcinomů u kuřáků (Weiss *et al.*, 2010), u adenokarcinomu se vyskytuje ve 3 % případů (Dutt *et al.*, 2011). Amplifikace FGFR1 u NSCLC se častěji vyskytuje u mužů (39,4 % vs. ženy 13,8 %), u kuřáků (40,8 % vs. nekuřáci 4,2 %), ale už nelze určit přesnou korelaci s věkem (Sasaki *et al.*, 2012). Na základě statistických výsledků nebyla u našeho souboru nalezena žádná z uvedených korelací. To je zřejmě dáno malým počtem reprezentativních vzorků, tedy jen 18 pacientů se spinocelulárním karcinomem.

Zvýšený počet kopií genu ALK byl nalezen statisticky významně vyšší pouze u adenokarcinomu (39 %; 13/33; $p=0,0066$). Auroti Salido *et al.* (2011) popsali zvýšení počtu kopií ALK u adenokarcinomu ve 4,5 % případů, avšak cut-off pro zvýšení byl nastaven ≥ 6 kopií v ≥ 10 % analyzovaných buněk. Naše hranice pro zvýšení byla stanovena ≥ 3 signálů ve ≥ 30 % buněk vzorku. Dle dostupné literatury nemá ale toto zvýšení pro pacienty praktický význam a hodnocena je především aberace ALK. Aberace ALK byla nalezena u 4 pacientů (5 %; 4/80) pacientů. Podle Sasaki *et al.* (2010) se frekvence fúzního genu EML4-ALK různí od 2,9-9,4 %. Výskyt aberace ALK genu tedy koreluje s výsledky dostupných studií.

U vyšetřovaného souboru 80 pacientů byly nalezeny statisticky významné vztahy, práce bude dále pokračovat na prospektivních a retrospektivních patientských vzorcích. Následně budou vyšetřeny mutace EGFR a všechna získaná data korelována. Cílem je přispět k objasnění významu vybraných markerů pacientů pro odhad biologického chování nemoci a účinnost adjuvantní chemoterapie a rovněž zpřesnění vhodného algoritmu vyšetřování jednotlivých markerů použitelného v rutinní praxi

Další práce v praktické části se týkala detekce fúzního genu EML4-ALK. Fúzní gen EML4-ALK je standardně sledován pomocí metody FISH. Problémem detekce EML4-ALK pomocí RT real-time PCR je však výskyt několika variant fúzního genu (Soda *et al.*, 2007; Penzel *et al.*, 2012). Pro celistvost vyšetřování by měly být vytvořeny primery pro všechny varianty. U části vyšetřovaných vzorků opakovaně selhává hybridizace sondy či nespecifické pozadí preparátu je natolik vysoké, že výsledek nelze vyhodnotit. Proto jsme se pokusili zavést RT real-time PCR vyšetřovací metodu pro varianty 3ab a 6. Detekce fúzního genu EML4-ALK byla provedena pro 2 nejčastější fúzní varianty - 1 a 3ab dle Wallander *et al.* a byla doplněna o nově navržené primery pro varianty 1 a 3ab. Záměrem praktické části bylo stanovit variantu fúzního genu EML4-ALK u vybraných pacientů a buněčné linie NCI-H2228 jako srovnávacího vzorku.

Z 23 FFPE tkání pacientů a buněčné linie NCI-H2228 zalité v parafínu byla vyizolována RNA o různých koncentracích, čistota měřená při 260/280 vykazovala hodnoty od 1,41 do 1,98. Nízké hodnoty čistoty znamenají různě vysokou kontaminaci aromatickými látkami nebo proteiny. Problémem izolace RNA z FFPE tkání je zřejmě samotné uchování v parafínu. Po přepisu RNA do cDNA byly měřeny hodnoty koncentrace cca od 2000 do 3000 ng/μl, čistota měřená při 260/280 se pohybovala od 1,65 do 1,68; u buněčné linie byla hodnota 1,8. Je patrné, že u buněčné linie NCI-H2228 je koncentrace a čistota (1,8) vyizolované RNA a cDNA ze všech vzorků neoptimálnější. To je zřejmě dáno tím, že vzorek neobsahuje vazivovou tkáň a není kontaminován dalšími složkami preparátu.

Z křivek meltingových analýz PCR produktů bylo zjištěno, že dochází ke vzniku mnoha produktů. Podle Wallander *et al.* byly PCR produkty přeneseny na DNA čip a analyzovány. Na DNA čipu byl potvrzen vznik mnoha bandů a tudíž mnoha amplikonů. Nespecifické produkty byly pozorovány i u sledování housekeepingového genu pro GAPDH. U GAPDH však bylo možné rozpoznat detekovaný GAPDH (silný band) od nespecifických produktů. Tímto byla potvrzena správnost izolace RNA a její přepis do cDNA.

Primery pro detekci různých variant byly vybrány podle délky PCR produktů do 150 bp. Fixace parafínem je metoda, která dobře zachovává morfologické znaky tkání, které jsou později použity pro různé analýzy. Nevýhodou fixační metody je vysoká fragmentace RNA a DNA. Pro dlouhodobé uchování je navíc důležitá teplota, uchování vcelku nebo v řezech a délka skladování (Ahlfen *et al.*, 2007). Pro potvrzení hypotézy, že za vznik nespecifických produktů může vysoká fragmentace RNA, byla dodatečně vyizolována RNA z FFPE tkání pacientů, buněčné linie NCI-H2228 uchované v parafínu a v trizolu. Z elektroforetogramu bylo zjištěno, že pro izolaci RNA je potřeba mnoho řezů pro vyšší výnos RNA. Byla porovnána RNA z buněčné linie zalité v parafínu a uložené v trizolu. Mnohonásobně nižší míra fragmentace byla pozorována u buněk uchovaných v trizolu.

Použití reverzně transkriptázové RT real-time PCR po izolaci RNA z FFPE je velmi problematické kvůli velmi špatné kvalitě a fragmentaci RNA. Integrita RNA z FFPE je nesrovnatelně horší než DNA, kde se real-time PCR běžně používá pro diagnostické účely. Řešením je pouze uchování primárního vzorku ve stabilizačním médiu (např. RNA later), popř. zamražení vzorku v kapalném dusíku, což ale v současné době v rutinní diagnostice není možné.

6 Závěr

Současným trendem klinické praxe je koncept personalizované medicíny, kde jsou pacienti vybíráni na základě klinických charakteristik, histologických podtypů a molekulárně-genetického profilu. Cílem této práce bylo vyšetřit genetické markery u skupiny pacientů s karcinomem plic, kteří jsou součástí většího projektu ÚMTM s Plicní klinikou FN Olomouc, a pomoci při zpřesňování léčby pacientů s operabilním NSCLC nalezením prediktivních markerů a navržením vhodné strategie vyšetřování jednotlivých markerů. Častý způsob vyšetření genetických změn u NSCLC vzorků je pomocí metody FISH. Touto metodou bylo vyšetřeno 80 pacientů na geny pro C-MET, EGFR, FGFR1 a fúzní gen EML4-ALK. Již u souboru 80 pacientů, vyšetřených v rámci této práce, byly nalezeny statisticky významné vztahy, z nichž pouze některé byly dosud popsány v literatuře. Vyšetřením celého souboru a následnou korelací s klinicko-patologickými daty bychom rádi popsali impakt těchto aberací pro prognózu či cílenou léčbu pacienta a potvrdili či vyvrátili dosud nalezené korelace.

Metodou RT real-time PCR byly experimentálně stanovovány fúzní varianty EML4-ALK z FFPE vzorků NSCLC. Podle literatury byly vybrány primerové sekvence a ty doplněny nově navrženými. Problémem je však samotné uchování vzorků v parafínu, neboť i přes optimalizaci metody nelze EML4-ALK aberace spolehlivě detekovat. Pro zavedení detekce EML4-ALK do rutinní praxe pomocí RT real-time PCR navrhuji zchlazení bioptované tkáně v tekutém dusíku a poté uchování při -80°C nebo v RNA lateru.

7 Literatura

- [1] Azzoli C. G., Baker S., Temin S., Pao W., Aliff T., Brahmer J., Johnson D. H., Laskin J. L., Masters G., Milton D., Nordquist L., Pfister D. G., Piantadosi S., Schiller J. H., Smith T. J., Stran J. R., Trent D., Giaccone G. (2009): American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*: Vol. 27 No. 36: 6251-6266.
- [2] Balkovetz D. F., Sambandam V. (1999): Dynamics of E-cadherin and γ -catenin Complexes During Dedifferentiation of Polarized MDCK Cells. *Kidney International* 56:910-921.
- [3] Baselga J. (2002): Why the Epidermal Growth Factor Receptor? The Rationale for Cancer Therapy. *The Oncologist* Vol. 7:2-8.
- [4] Bazley L. A., Gullick W. J. (2005): The Epidermal Growth Factor Receptor Family. *Endocrine Related Cancer* 12:17-27.
- [5] Beadsmoore C. J., Screaton N. J. (2002): Classification, Staging and Prognosis of Lung Cancer. *European Journal of Radiology* 45: 8-17.
- [6] Beau-Faller M., Ruppert A.-M., Voegeli A.-C., Neuville A., Meyer N., Guerin E., Legrain M., Mennecier B., Wilhm J.-M., Massard G., Quoix E., Oudet P., Gaub M. P. (2008): MET Gene Copy Number in Non-Small Cell Lung Cancer: Molecular Analysis in a Targeted Tyrosine Kinase Inhibitor Naïve Cohort. *Journal of Thoracic Oncology* Vol. 3 No. 4: 331-339.
- [7] Beenken A., Mohammadi M.(2009): The FGF Family: Biology, Pathophysiology and Therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 8:235-253.
- [8] Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E., Vande Woude G. F. (2003): Met, Metastasis, Motility and More. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:915-925.
- [9] Boccaccio C., Gaudino G., Gambarotta G., Galimi F., Comoglio P. M. (1994): Hepatocyte Growth Factor (HGF) Receptor Expression is Inducible and Is Part of the Delayed-Early Response to HGF. *Journal of Biological Chemistry* 269:12846-12851.
- [10] Boccaccio C., Medico E. (2006): Cancer and Blood Coagulation. *Cell and Molecular Life Sciences* 63:1024-1027.
- [11] Bourouba M., Benyelles-Boufennara A., Terki N., Baraka-Kerboua E., Bouzid K., Touil-Boukoffa Ch. (2011): Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Abundance Correlates with p53 and Bcl-2 Accumulation and Patient Age in a Small Cohort of North African Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *European Cytokine Network* 22:38-44.
- [12] Brambilla E., Travis W. D., Colby T. V., Corrinz B., Shimosato Y. (2001): The New World Health Organization Classification of Lung Tumours. *European Respiratory Journal* 18: 1059–1068.
- [13] Brand T. M., Iida M., Li Ch., Wheeler D. L. (2011): The Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network and Its Role in Cancer. *Discovery Medicine* 66:419-432.

- [14] Brandao G. D., Brega E. F., Spatz A. (2012): The Role of Molecular Pathology in Non-Small-Cell Lung Carcinoma - Now and in the Future. *Current Oncology* 19: 24-32.
- [15] Buckingham L. E., Coon J. S., Morrison L. E., Jacobson K. K. B., Jewell S. S., Kaiser K. A., Mauer A. M., Muzzafar T., Polowy C., Basu S., Gale M., Villaflor V., Bonomi P. (2007): The Prognostic Value of Chromosome 7 Polysomy in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Gefitinib. *Journal of Thoracic Oncology* Vol. 2 Issue 5:414-422.
- [16] Bussolino F., Di Renzo M. F., Ziche M., Bocchietto E., Olivero M., Naldini L., Gaudino G., Tamagnone L., Coffe A., Comoglio P. M. (1992): Hepatocyte Growth Factor Is a Potent Angiogenic Factor Which Stimulates Endothelial Cell Motility and Growth. *The Journal of Cell Biology* Vol. 119 No. 3: 629-641.
- [17] Cappuzzo F., Marchetti A., Skokan M., Rossi E., Gajapathy S., Felicioni L., del Grammastro M., Sciarotta M. G., Buttitta F., Incarbone M., Toschi L., Finocchiaro G., Destro A., Terracciano L., Roncalli M., Alloisio M., Santoro A., Varella-Garcia M. (2009): Increased MET Gene Copy Number Negatively Affects Survival of Surgically Resected Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology* Vol. 27 No. 10: 1667-1674.
- [18] Corso S., Comoglio P. M., Giordano S. (2005): Cancer Therapy: Can the Challenge Be MET? *Trend in Molecular Medicine* Vol. 11 No. 6: 284-292.
- [19] Castro A. S., Parente B., Goncalves I., Antunes A., Barroso A., Conde S., Neves S., Machado J. C. (2013): Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Study of 5 years, in a Population of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Portuguese Journal of Pulmonology* 19:7-12.
- [20] Dailey L., Ambrosetti D., Mansukhani A., Basilico C. (2005): Mechanism Underlying Differential Responses to FGF Signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16:233-247.
- [21] Danilkovich-Miagkova A., Zbar B. (2002): Dysregulation of MET Receptor Tyrosin Kinase Activity in Invasive Tumors. *Journal of Clinical Investigation* 109:863-867.
- [22] Davies H., Hunter C., Smith R., Stephens P., Greenman C., Bignell G., Teague J., Butler A., Edkins S., Stevens C., Parker A., O'Meara S., Avis T., Barthorpe S., Brackenbury L., Buck G., Clemens J., Cole J., Dicks E., Edwards K., Forbes S., Gorton M., Gray K., Halliday K., Harrison R., Hills K., Hintou J., Jones D., Kosmidou V., Laman R., Lugg R., Menzies A., Perry J., Perry R., Raine K., Shepherd R., Small A., Solomon H., Steophens Y., Tofts C., Varian J., Webb A., West S., Widaa S., Yates A., Bresseur F., Cooper C. S., Flanagan A. M., Green A., Knowles M., Leung S. Y., Looijenga L. H. J., Malkowicz B., Pierotti M. A., Teh B. T., Yuen S. T., Lakhani S. R., Easton D. F., Weber B. L., Goldstraw P., Nicholson A. G., Wooster R., Stratton M. R., Futreal P. A. (2005): Somatic Mutations of the Protein Kinase Gene Family in Human Lung Cancer. *Cancer Research* 65:7591-7595.
- [23] Davies G., Jiang W. D., Mason M. D. (2001): Matrilysin Mediates Extracellular Cleavage of E-cadherin from Prostate Cancer Cells: a Key Mechanism in Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-Induced Cell-Cell Dissociation and *in Vitro* Invasion. *Clinical Cancer Research* 7:3289-3297.
- [24] Drilon A., Rekhatman N., Landanyi M., Paik P. (2012): Squamous-Cell Carcinomas of

the Lung: Emerging Biology, Controversies, and the Promise of Targeted Therapy. *The Lancet Oncology* Vol.13 Issue 10:418-426.

- [25] Dutt A., Ramos A. H., Hammerman P. S., Marmel C., Cho J., Sharfinia T., Chande A., Tanaka K. E., Stransky N., Greulich H., Gray N. S., Meyerson N. (2011): Inhibitor-Sensitive FGFR1 Amplification in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* Vol. 6 Issue 6: e20351.
- [26] Eswarakumar V. P., Lax I., Schlessinger J. (2005): Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factor Receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16:139-149.
- [27] Ethier S. P. (2002): Signal Transduction Pathways: The Molecular Basis for Targeted Therapies. *Seminars in Oncology* 12:3-10.
- [28] Franklin W. A., Veve R., Hirsch F. R. (2002): Epidermal Growth Factor Receptor Family in Lung Cancer and Premalignancy. *Seminars in Oncology* 29:3-14.
- [29] Frazier D. P., Kendig R. D., Kai F., Maglic D., Sugiyama T., Morgan R. L., Fry E. A., Lagedrost S. J., Sui G., Inoue K. (2012): Dmp1 Physically Interacts with p53 and Positively Regulates p53's Stability, Nuclear Localization, and Function. *Cancer Research* 72:1740-1750.
- [30] Fujino S., Enokibori T., Tezuka N., Asada Y., Inoue S., Kato H., Mori A. (1996): A Comparison of Epidermal Growth Factor Receptor Levels and Other Prognostic Parameters in Non-Small Cell Lung Cancer. *European Journal of Cancer* 32:2070-2074.
- [31] Furge K. A., Zhang Y. W., Vande Woude G. F. (2000): Met Receptor Tyrosin Kinase: Enhanced Signaling Through Adapter Proteins. *Oncogene* 19: 5582-5589.
- [32] Gentile A., Trusolino L., Comoglio P. M. (2008): The Met Tyrosine Kinase Receptor in Development and Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* Vol. 27 No. 1: 85-94.
- [33] Gospodarowicz D. (1974): Localisation of Fibroblast Growth Factor and Its Effect Alone and With Hydrocortisone on 3T3 Cell Growth. *Nature* 249:123-127.
- [34] Grose R., Dickson C. (2005): Fibroblast Growth Factor Signaling in Tumorigenesis. *Cytokine and Growth Factor Review* 16:179-186.
- [35] Hacker U., Nybakken K., Perrimon N. (2005): Heparan Sulphate Proteoglycans: the Sweet Side of Development. *Journal of Biological Chemistry* 6:530-541.
- [36] Harel A., Forbes D. J. (2004): Importin Beta: Concluding a Much Larger Cellular Symphony. *Molecular Cell* Vol. 16:319-330.
- [37] Heidebrecht H. J., Buck F., Pollmann M., Siebert R., Parwaresch R. (2000): Cloning and Localisation of C2orf2^{topp120} a Previously Unknown WD Repeat Protein. *Genomics*: Vol. 68 Issue 3: 348-350.
- [38] Herbst R. S. (2004): Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology. *International Journal of Radiation Oncology Physics* Vol. 59 No.2:21-26.
- [39] Herbst R. S., Langer C. J. (2002): Epidermal Growth Factor Receptors as a Target for Cancer Treatment: the Emerging Role of IMC-C225 in the Treatment of Lung and Head and Neck Cancer. *Seminars in Oncology* 29:27-36.

- [40] Hirsch F. R., Varella-Garcia M., Bunn P. A. Jr, Di Maria M. V., Veve R., Bremnes R. M., Barón A. E., Zeng Ch., Franklin W. A. (2003): Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation Between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. *Journal of Clinical Oncology* 21: 3798-807.
- [41] Hirsch F.R., Herbst R.S., Olsen C., Chansky K., Crowley J., Kelly K., Franklin W. A., Bunn P. A., Varella-Garcia M., Gandara D. (2008): Increased EGFR Gene Copy Number Detected by Fluorescent In Situ Hybridization Predicts Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated with Cetuximab and Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26:3351-3357.
- [42] Hsu S. C., Hung M. C. (2007): Characterization of a Novel Tripartite Nuclear Localization Sequence in the EGFR family. *Journal of Biological Chemistry* 282:10432-10440.
- [43] Charong N., Patmasiriwat P., Zenklusen J. C. (2011): Localization and Characterization of ST7 in Cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* Vol. 137 Issue 1:89-97.
- [44] Chen H.-J., Mok T. S., Chen Z.-H., Guo A.-L., Zhang X.-Ch., Su J., Wu Y.-L. (2009): Clinicopathologic and Molecular Features of Epidermal Growth Factor Receptor T790M Mutation and C-MET Amplification in Tyrosine Kinase Inhibitor-resistant Chinese Non-small Cell Lung Cancer. *Pathology & Oncology Research* Vol. 15, Issue 4: 651-658.
- [45] Ikononov O. C., Sbrissa D., Foti M., Carpentier J. L., Shisheva A. (2003): PIKfyve Controls Fluid Phase Endocytosis but Not Recycling/Degradation of Endocytosed Receptors or Sorting of Procathepsin D by Regulating Multivesicular Body Morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 14:4581-4591.
- [46] Inamura K., Takeuchi K., Togashi Y., Nomura K., Ninomiya H., Okui M., Satoh Y., Okumura S., Nakagawa K., Soda M., Lim Choi Y., Niki T., Mano H., Ishikawa Y. (2008): EML4-ALK Fusion Is Linked to Histological Characteristics in a Subset of Lung Cancers. *Journal of Thoracic Oncology*: Vol. 3, Issue 1: 13-17.
- [47] Jänne P. A., Johnson B. E. (2006): Effect of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Domain Mutations on the Outcome of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *Clinical Cancer Research* 12:4416-4420.
- [48] Kijima Y., Hokita S., Yoshinaka H., Itoh T., Koriyama C., Eizuru Y., Akiba S., Aikou T. (2002): Amplification and Overexpression of C-Met Gene in Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinomas. *Oncology* 62:60-65.
- [49] Kim S. H., Kim J. M., Shin M. H., Kim C. W., Huang S. M., Kang D. W., Suh K. S., Yi E. S., Kim K. H. (2012): Correlation of Epithelial-Mesenchymal Transition Markers with Clinicopathologic Parameters in Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Histology and Histopathology* 5:581-591.
- [50] Kim M. J., Shin H. Ch., Shin K. Ch., Ro J. Y. (2013): Best Immunohistochemical Panel in Distinguish Adenocarcinoma from Squamous Cell Carcinoma of Lung: Tissue Microarray Assay in Resected Lung Cancer Specimens. *Annals of Diagnostic Pathology* Vol. 17 Issue 1:85-90.

- [51] Kobayashi M., Sonobe M., Takahashi T., Yoshizawa A., Kikuchi A., Date H.(2012): Detection of ALK Fusion in Lung Cancer Using Fluorescence *in Situ* Hybridization. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals* 20: 426-431.
- [52] Kobayashi S., Boggon T. J., Dayaram T., Jähne P. A., Kocher O., Meyerson M., Johnson B. E., Eck M. J., Tenen D. G., Halmos B. (2005): EGFR Mutation and Resistance in Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine* Vol. 352 No. 8:786-792.
- [53] Kohler L. H., Mireskandari M., Knösel T., Altendorf-Hofmann A., Kunze A., Schmidt A., Presselt N., Chen Y., Petersen I.(2012): FGFR1 Expression and Gene Copy Numbers in Human Lung Cancer. *Virchows Archiv* Vol. 461:49-57.
- [54] Koivunen J. P., Netmel C., Zejnullahu K., Murphy C., Lifshits E., Holme A. J., Choi H. G., Kim J., Chiang D., Thomas R., Lee J., Richards W. G., Sugarbaker D. J., Ducko Ch., Lindeman N., Marcoux J. P., Engelman J. A., Gray N. S., Lee Ch., Mayerson M., Jähne P. A. (2008): EML4-ALK Fusion Gene and Efficacy of an ALK Kinase Inhibitor in Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 14: 4275-4283.
- [55] Kono S. A., Heasle L. E., Doebele R. C., Camidge D. R. (2012): *Current Cancer Drug Targets* 12: 107-123.
- [56] Koudeláková V., Trojanec R., Knebllová M., Drábek J., Kolář Z., Kolek V., Mlčochová S., Hajdúch M. (2012): ALK Rearrangement and EGFR Copy Number Gains/Mutations in Czech Non-small Cell Lung Cancer Patients. In *EJC 2012, EACR 22 Proceedings book*, vol. 48, Suppl. 5, p. S139.
- [57] Koudeláková V., Knebllová M., Trojanec R., Drábek J., Hajdúch M. (2013): *Non-Small Cell Lung Cancer - Genetic Predictors*.
- [58] Koulet L. H., Mireskandari M., Knösel T., Altendorf-Hofmann, Kunze A., Schmidt A., Presselt N., Chen Y., Petersen I. (2012): FGFR1 Expression and Gene Copy Numbers in Human Lung Cancer. *Virchows Archiv* Vol. 461, No. 1: 49-57.
- [59] Kumar A., Petri E. T., Halmos B., Boggon T. J. (2008): Structure and Clinical Relevance of the Epidermal Growth Factor Receptor in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26:1742-1751.
- [60] Lax I. Wong A., (2002): The Docking Protein FRS2alpha Controls a MAP Kinase-Mediated Negative Feedback Mechanism for Signaling by FGF Receptor. *Molecular Cell* 10:709-719.
- [61] Liang Z., Zhang J., Zeng X., Gao J., Wu S., Liu T. (2010): Relationship Between EGFR Expression, Copy Number and Mutation in Lung Adenocarcinomas. *BMC Cancer* 10: 376.
- [62] Lindeman N. I., Cagle P. T., Beasley M. B., Chitale D. A., Dacic S., Giaccone G., Jenkins R. B., Kwiatkowski D. J., Saldivar J.-S., Squire J., Thunnissen E., Ladanyi M. (2013): Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors. *Journal of Thoracic Oncology*. Doi: 10.1097/JTO.0b013e318290868f.
- [63] Lutterbach B., Zeng Q., Davis L., Hatch H., Hang G., Kohl N. E., Gibbs J. B., Pan B. S. (2007): Lung Cancer Cell Lines Harboring MET Gene Amplification Are Dependent on Met for Growth and Survival. *Cancer Research* 67:2081-2088.

- [64] Ma Ch., Wei S., Song Y. (2012): T790M and Acquired Resistance of EGFR TKI: a Literature Review of Clinical Reports. *Journal of Thoracic Disease* 3:10-18.
- [65] Marek L., Ware K. E., Fritzsche A., Hercule P., Helton W. R., Smith J. E., McDermott L. A., Coldren Ch. D., Nemenoff R. A., Merrick D. T., Helfrich B. A., Bunn P. A., Heasley L. E. (2009): Fibroblast Growth Factor (FGF) and FGF Receptor-Mediated Autocrine Signaling in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Molecular Pharmacology* Vol.75 No.1:196-207.
- [66] Mason I. (2007): Initiation to End Point: the Multiple Roles of Fibroblast Growth Factors in Neural Development. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 583-596.
- [67] Miller V. A., Kris M. G., Shah N., Patel J., Azzoli C., Gomez J. (2004): Bronchialveolar Pathologic Subtype and Smoking History Predict Sensitivity to Gefitinib in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 22:1103-1109.
- [68] Miura H., Nishimura K., Tsujimura A., Matsumiya K., Matsumoto K., Nakamura T., Okuyama A. (2001): Effects of Hepatocyte Growth Factor on E-cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion in DU14b Prostate Cancer Cells. *Urology* 58:1064-1069.
- [69] Morfia S. W., Kirstein M. N., Valentine M. B., Dittmer K. G., Shapiro D. N., Altman D. L., Look A. T. (1994): Fusion of Kinase Gene, ALK, To a Nucleolar Protein Gene, NPM, in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Science* 263: 1281-1284.
- [70] Mossé Y. P., Wood A., Marris J. M. (2009): Inhibition of ALK Signaling for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* 15: 5609-5614.
- [71] Murakami M., Effenbein A., Simons M. (2008): Non-Canonical Fibroblast Growth Factor Signalling in Angiogenesis. *Cardiovascular Research* 78:223-231.
- [72] Murphy T., Hori S., Sewell J., Gnanapragasam V. J.(2010): Expression and Functional Role of Negative Signaling Regulators in Tumour Development and Progression. *International Journal of Cancer* 127:2491-2499.
- [73] Murray S., Karavasilis V., Bobos M., Razis E., Papadopoulos S., Christodoulou Ch., Kosmidis P., Fountzilas G. (2012): Molecular Predictors of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 77: 10.1186/1756-9966-31-77.
- [74] Nagafuchi (2001): Molecular Architecture of Adherens Junctions. *Current Opinion in Cell Biology* 13:600-603.
- [75] Nakazawa K., Dobashi Y., Suzuki S., Fujii H., Takeda Y., Ooi A. (2005): Amplification and Overexpression of C-erbB-2, Epidermal Growth Factor Receptor, and C-Met in Biliary Tract Cancers. *Journal of Pathology* 206:356-365.
- [76] Nebe B., Sanftleben H., Pommerenke H., Rychly J. (1998): Hepatocyte Growth Factor Enables Enhanced Integrin-Cytoskeletal Linkage by Affecting Integrin Expression in Subconfluent Epithelial Cells. *Experimenta Cell research* Vol. 243: 263-273.
- [77] Nyati M. K., Morgan M. A., Feng F. Y., Lawrence T. S. (2006): Integration of EGFR Inhibitors With Radiotherapy. *Nature Reviews Cancer* 6:876-885.
- [78] Ong S. H., Guy G. R., Hadari Y. R., Laks S., Gotoh N., Schlessinger J., Lax I. (2000): FRS2 Protein Recruit Intracellular Signaling Pathways By Binding To Diverse Targets

On Fibroblast Growth Factor and Nerve Growth Factor Receptors. *Molecular and Cell Biology* 20:921-929.

- [79] Orr-Urtreger A., Bedford M. T., Burakova T., Arman E., Zimmer Y., Yayon A., Givol D., Lonai P. (1993): Developmental Localization Of the Splicing Alternatives of Fibroblast Growth Factor Receptor-2 (FGFR2). *Developmental Biology* 158:475-486.
- [80] Oxnard G. R., Arcila M. E., Chmielecki J., Ladanyi M., Miller V. A., Pao W. (2011): New Strategies in Overcoming Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *Clinical cancer Research* Vol.17 No.17:5530-5537.
- [81] Paez J. G., Jänne P. A., Lee J. C., Tracy S., Greulich H., Gabriel S., Herman P., Kaye F. J., Lindeman N., Boggon T. J., Naoki K., Sasaki H., Fujii Y., Eck M. J., Sellers W. R., Johnson B. E., Meyerson M. (2004): EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* Vol. 304 No. 5676: 1497-1500.
- [82] Pal S. K., Figlin R. A., Reckamp K. (2010): Targeted Therapies for Non-Small Cell Lung Cancer: An Evolving Landscape. *Molecular Cancer Therapeutics* 9:1931-1944.
- [83] Pallis A. G., Fennell D. A., Szutowicz E., Leigh N. B., Greillier L., Dziadziuszko R. (2011): Biomarkers of Clinical Benefit for Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Agents in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. *British Journal of Cancer* 105:1-8.
- [84] Pao W., Girard N. (2011): New Driver Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *The Lancet Oncology* Vol. 12 Issue 2:175-180.
- [85] Park S., Choi Y. L., Sung C. O., An J., Seo J., Ahn M. J., Park K., Erkin O. C., Song K., Kim J., Shim Y. M., Han J. (2012): High MET Copy Number and MET Overexpression: Poor Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Histology and Histopathology* 27:197-207.
- [86] Pelengaris S., Khan M. (2006): *The Molecular Biology of Cancer*. Blackwell Publishing.
- [87] Penzel R., Schirmacher P., Warth A. (2012): A novel EML4-ALK variant: exon 6 of EML4 Fused to Exon 19 of ALK. *Journal of Thoracic Oncology* 7: 1198-9.
- [88] Perner S., Wagner P. L., Demichelis F., Mehra R., LaFargue Ch. J., Moss B. J., Arbogast S., Soltermann A., Weder W., Giordano T. J., Beer D. G., Rickman D. S., Chinnaiyan A. M., Moch H., Rubin M. A. (2008): EML4-ALK Fusion Lung Cancer: A Rare Acquired Event. *Neoplasia*: Vol. 10, No. 3: 298–302.
- [89] Peruzzi B., Bottaro P. D. (2006): Targeting the C-Met Signaling Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research* 12: 3657-3660.
- [90] Plow E. F., Haas T. A., Zhang L., Loftusi J., Smith J. W. (2000): Ligand Binding to Integrins. *Journal of Biological Chemistry* Vol. 275 No. 29:21785-21788.
- [91] Pollmann M., Pawaresch R., Adam-Klages S., Kruse M.-L., Buck F., Heidebrecht H.-J. (2006): Human EML4, a Novel Member of EMAP Family, Is Essential for Microtubule Formation. *Experimental Cell Research* 312: 3241-3251.
- [92] Qiao H., Hung W., Tremblay E., Wojcik J., Gui J., Ho J., Klassen J., Cmapling B., Elliott B. (2002): Constitutive Activation of MET Kinase in Non-Small-Cell Lung Carcinomas Correlates With Anchorage-Independent Cell Survival. *Journal of Cellular Biochemistry* 86: 665-677.

- [93] Rickles F. R., Levine M. N. (2001): Epidemiology of Thrombosis in Cancer. *Acta Haematologica* 106:6-12.
- [94] Rosário M., Birchmeier W. (2003): How To Make Tubes: Signaling By the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Trends in Cell Biology* Vol. 13 No. 6: 328-335.
- [95] Radtke J., Rezaie S. G., Kugler Ch., Zabel P., Schulz H., Vollmer E., Goldmann T., Lang D. S. (2010): Expression Analysis of EML4 in Normal Lung Tissue and Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) in the Absence and Presence of Chemoterapeutics. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*: Vol. 51 No.4: 647-653.
- [96] Reungwetwattana T., Weroha S. J., Molina J. R. (2012): Oncogenic Pathways, Molecularly Targeted Therapies, and Highlighted Clinical Trials in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Clinical Lung Cancer* Vol. 13 No. 4:252-266.
- [97] Rodig S. J., Mino-Kenudson M., Dacic S., Trap B. Y., Shaw A., Barletta J. A., Stubbs H., Law K., Mark E., Janne P. A., Lusch T., Johnson B. E., Iafrate A. J., Chirieac L. R. (2009): Unique Clinicopathologic Features Characterize ALK-rearranged Lung Adenocarcinoma in the Western Population. *Clinical Cancer Research* 15: 5216-5223.
- [98] Rosenthal E. L., Johnson T. M., Allen E. D., Apel I. J., Punturieri A., Weiss S. J. (1998): Role of the Plasminogen Activator and Matrix Metalloproteinase Systems in Epidermal Growth Factor-Stimulated Invasion of Carcinoma Cells. *Cancer Research* 58:5221-5230.
- [99] Sakurai H., Asamura H., Watanabe S., Suzuki K., Tsuchiya R. (2004): Clinicopathologic Features of Peripheral Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *The Annals of Thoracic Surgery* 78:222–227.
- [100] Salido M., Pijuan L., Martínez-Avilés L., Galván A. B., Rovira A., Zanui M., Martínez A., Longarón R., Sole F., Serrano S., Bellosillo B., Wynes M. W., Albanell J., Hirsch F. R., Arriola E. (2011): Increased ALK Gene Copy Number and Amplification are Frequent in Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 1:21-27.
- [101] Salomon D. S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. (1995): Epidermal Growth Factor-related Peptides and Their Receptors in Human Malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Haematology* 19:183-232.
- [102] Sasaki T., Rodig S. J., Chirieac L. R., Jähne P. A. (2010): The Biology and Treatment of EML4-ALK Non-Small Cell Lung Cancer. *European Journal of Cancer*: Vol. 46, Issue 10:1773-1780.
- [103] Sasaki T., Shitara M., Yokota K., Hikosaka Y., Moriyama S., Yano M., Fuji Y. (2012): Increased Copy Number in Lung Squamous Cell Carcinomas. *Molecular Medicine Reports* 3:725-728.
- [104] Semrad T. J., Mack P. (2012): Fibroblast Growth Factor Signaling in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* Vol. 13 Issue 2: 90-95.
- [105] Sequist L. V., von Pawel J., Garmey E. G., Arkeley W. L., Brugger W., Ferrari D., Chen Y., Costa D. B., Gerber D. E., Orlov S., Ramlau R., Arthur S., Gorbachevsky I., Schwartz B., Schiller J. H. (2011): Randomized Phase II Study of Erlotinib Plus Tivantinib Versus Erlotinib Plus Placebo in Previously Treated Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* Vol. 29 No. 24:3307-3315.

- [106] Sharma S. V., Bell D. W., Settleman J., Haber D. A. (2007): Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *Nature Reviews Cancer* 7:169-181.
- [107] Shaw A. T., Yeap B. Y., Mino-Kenudson M., Digumarthy S. R., Costa D. B., Heist R. S., Salomon B., Stubbs H., Admane S., McDermott U., Settleman J., Kobayashi S., Mark E. J., Rodig S. J., Chirieac L. R., Klak E. L., Lusch T. J., Iafrate A. J. (2009): Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology*: Vol. 27 No. 26: 4247-4253.
- [108] Shaw A. T., Solomon B. (2011): Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase in Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 17: 2081-2086.
- [109] Shaw A. T., Solomon B., Riely G. J., Gainor J., Engelman J. A., Shapiro G. I., Costa D. B., Ou S. H., Butaney M., Salgia R, Maki R.G., Varella-Garcia M., Doebele R.C., Bang Y.J., Kulig K., Selaru P., Tang Y., Wilner K.D., Kwak E.L., Clark J.W., Iafrate A.J., Camidge D.R. (2011): Effect of Crizotinib on Overall Survival in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harbouring ALK Gene Rearrangement: a Retrospective Analysis. *Lancet Oncology* 12:1004-12.
- [110] Shibamoto S., Hayakawa M., Takeuchi K., Hori T., Oku N., Miyazawa K., Kitanfura N., Takeichi M., Ito F. (1994): Tyrosine Phosphorylation of β -catenin and Plakoglobin Enhanced by Hepatocyte Growth Factor and Epidermal Growth Factor in Human Carcinoma Cells. *Cell Communication and Adhesion* Vol.1, No.4:295-305.
- [111] Shigematsu H., Gazdar A. F. (2006): Somatic Mutations of Epidermal Growth Factor-Signaling Pathway in Lung Cancers. *International Journal of Cancer*: 118:257-262.
- [112] Schiller J. H., Harrington D., Belani Ch. P., Langer C., Sandler A., Krook J., Zhu J., Johnson D. H. (2002): Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine* Vol. 346 No. 2: 92-98.
- [113] Schlessinger J. (2000): Cell Signaling By Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 103:211-225.
- [114] Schlessinger J., Plotnikov A. N., Ibrahimi O. A., Elisenkova A. V., Yeh B. K., Yayon A., Linhardt R. J., Mohammadi M. (2000): Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role For Heparin in FGFR Binding and Dimerization. *Molecular Cell* 6:743-750.
- [115] Schneider C.-P., Heigener D., Schott-von-Römmel K., Gütz S., Laack E., Digel W., Guschall W.-R., Franke A., Bodenstein H., Schmidtgen C., Reck M. (2008): Epidermal Growth Factor Receptor-Related Tumor Markers and Clinical Outcomes with Erlotinib in Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* Vol. 3 No 12:1446-1453.
- [116] Sierra J. R., Tsao M.-S. (2011): C-MET As a Potential Therapeutic Target and Biomarker in Cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 3: 21-35.
- [117] Singh A. B., Harris R. C. (2005): Autocrine, Paracrine and Juxtacrine Signaling by EGFR Ligands. *Cellular Signaling* 17:1183-1193.
- [118] Soda M., Choi Y.L., Enomoto M., Takada S., Yamashita Y., Ishikawa S., Fujiwara S., Watanabe H., Kurashina K., Hatanaka H., Bando M., Ohno S., Ishikawa Y., Aburatani H., Niki T., Sohara Y., Sugiyama Y., Mano H. (2007): Identification of the Transforming EML4-ALK Fusion Gene in Non-Small Cell Lung Cancer. *Nature* 448: 561-66.

- [119] Songyang Z., Shoelson S. E., Chadhuri M., Gish G., Pawson T., Haser W. G., King F., Roberts T., Ratnofsky S., Lechleider R. J., Neel B. G., Birge R. B., Fajardo J. E., Chou M. M., Hanafusa H., Schaffhausen B., Catley L. C. (1993): SH2 Domains Recognize Specific Phosphopeptide Sequences. *Cell* 72: 767-778.
- [120] Subramanian J., Govindan R. (2007): Lung Cancer in Never Smokers: a Review. *Journal of Clinical Oncology* Vol. 25 No. 5: 561-570.
- [121] Suda K., Murakami I., Katayama T., Tomizawa K., Osada H., Sekido Y., Maehara Y., Yatabe Y., Mitsudomi T. (2010): Reciprocal and Complementary Role of MET Amplification and EGFR T790M Mutation in Acquired Resistance to Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 16:5489-5498.
- [122] Sun H., Chen Z., Poppleton H., Scholich K., Mullexin J., Weipz G. J., Fulgham D. L., Berties P. J., Patel T. B. (1997): The Juxtamembrane, Cytosolic Region of the Epidermal Growth Factor Receptor Is Involved in Association with α -subunit of Gs. *Journal of Biological Chemistry*. 272:5413-5420.
- [123] Testa J. R., Siegfried J. M. (1992): Chromosome abnormalities in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research* 52:2702-2706.
- [124] Takeuchi K., Choi Y., L., Soda M., Togashi Y., Hatano S., Enomoto M., Takada S., Yamashita Y., Satoh Y., Okumura S., Nakagawa K., Ishikawa Y., Mano H. (2008): Multiplex Reverse Transcription-PCR Screening for EML4-ALK Fusion Transcripts. *Clinical Cancer Research* 14: 6618-6624.
- [125] Togashi Y., Soda M., Sakata S., Sugawara E., hatano S., Asaka R., Nakajima T., Mano H., Takeuchi K. (2012): KLC1-ALK: A Novel Fusion in Lung Cancer Identified Using a Formalin-Fixed Paraffin Embedded Tissue Only. *PLoS One* 2: e31323.
- [126] Travis W. D. (2002): Pathology of Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* 23:65-81.
- [127] Travis W. D., Brambilla E., Müller-Hermelink H. K., Harris C. C. (2004): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARS Press.
- [128] Trusolino L., Cavassa S., Angelini P., Andó M., Comoglio P. M., Boccaccio C. (2000): HGF/Scatter Factor Selectively Promotes Cell Invasion by Increasing Integrin Avidity. *The FASEB Journal* Vol. 14 No. 11:1629-1640.
- [129] Trusolino L., Comoglio P. M. (2002): Scatter Factor and Sematophorin Receptors: Cell Signalling for Invasive Growth. *Nature Reviews* Vol. 2: 289-300.
- [130] Turner N., Grose R. (2010): Fibroblast Growth Factor Signaling: From Development to Cancer. *Nature Review Cancer* 10:116-129.
- [131] Vincent M. D., Kuruvilla M. S., Leighl N. B., Kamel-Reid S. (2012): Biomarkers that Currently Affect Clinical Practice: EGFR, ALK, MET, KRAS. *Medicinal Oncology* Vol. 19:33-44.
- [132] Volante M., Saviozzi S., Rapa I., Ceppi P., Cappia S., Calogero R., Novello S., Borasio P., Papotti M., Scagliotti G. V. (2007): Epidermal Growth Factor Ligand/Receptor Loop and Downstream Signaling Activation Pattern in Completely Resected Nonsmall Cell Lung Cancer. *Cancer* Vol. 110 No. 6:1321-1328.

- [133] Wallander M. L., Geiersbach K. B., Tripp S. R., Layfield L. J. (2012): Comparison of Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, Immunohistochemistry, and Fluorescence In Situ Hybridization Methodologies for Detection of Echinoderm Microtubule-Associated Proteinlike 4–Anaplastic Lymphoma Kinase Fusion–Positive Non–Small Cell Lung Carcinoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* Vol. 136 Issue 7: 796-803.
- [134] Wang Y. N., Wang H., Yamaguchi H., Lee H. J., Lee H. H., Hung M. C. (2010): COP1-Mediated Retrograde Trafficking from the Golgi to the ER Regulateg EGFR Nuclear Transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol.399 Issue 3:498-504.
- [135] Wang F., Fu S., Shao Q., Zhou Y.-B., Zhang X., Zhang X., Xue C., Lin J.-G., Huang L.-X., Zhang L., Zhang W.-M., Shao J.-Y. (2013): High EGFR Number Predicts Benefits From Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Wild-Type EGFR. *Journal of Translational Medicine* Vol. 11:90.
- [136] Weiss J., Sos M. L., Seidel D., Peifer M., Zander T., Heuckmann J.M., Ullrich R.T., Menon R., Maier S., Soltermann A., Moch H., Wagener P., Fischer F., Heynck S., Koker M., Schöttle J., Leenders F., Gabler F., Dabow I., Querings S., Heukamp L.C., Balke-Want H., Ansén S., Rauh D., Baessmann I., Altmüller J., Wainer Z., Conron M., Wright G., Russell P., Solomon B., Brambilla E., Brambilla C., Lorimier P., Sollberg S., Brustugun O.T., Engel-Riedel W., Ludwig C., Petersen I., Sängler J., Clement J., Groen H., Timens W., Sietsma H., Thunnissen E., Smit E., Heideman D., Cappuzzo F., Ligorio C., Damiani S., Hallek M., Beroukhim R., Pao W., Klebl B., Baumann M., Buettner R., Ernestus K., Stoelben E., Wolf J., Nürnberg P., Perner S., Thomas R.K. (2010): Frequent and Focal FGFR1 Amplification Associates with Therapeutically Tractable FGFR1 Dependency in Squamous Cell Lung Cancer. *Science Translational Medicine* 2:62-93.
- [137] Xu L., Nilsson M. B., Saintigny P., Cascone T., Henryk M. H., Du Z., Nikolinakos P. G., Yang Y., Prudkin L., Liu D., Lee J. J., Johnson F. M., Wong K.-K., Girard L., Gazdar A. F., Minna J. D., Kurie J. M., Wistuba I. I., Heymach J. V. (2010): Epidermal Growth Factor Receptor Regulates MET Levels and Invasiveness through Hypoxia-inducible Factor-1 α in Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Oncogene* 29: 2616-2627.
- [138] Yarden Y., Sliwkowski M. X. (2001): Untangling the ErbB Signalling Network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:127-137.
- [139] Yatabe Y., Takahashi T., Mitsudomi T. (2008): Epidermal Growth Factor receptor Gene Amplification is Acquired in Association with Tumor Progression of EGFR-Mutated Lung Cancer. *Cancer Research* 68:2106-2111.
- [140] Yayon A., Zimmer Y., Shen G. H., Avivi A., Yarden Y., Givol D. (1992): A Confined Variable Region Confers Ligand Specificity on Fibroblast Growth Factor Receptors: Implications For the Origin of the Immunoglobulin Fold. *The EMBO Journal* 11:1885-1890.
- [141] Yoshida A., Tsuta K., Watanabe S., Sekine I., Fukayama M., Tsuda H., Furuta K., Shibata T. (2011): Frequent ALK Rearrangement and TTF-1/p63 Co-expression in Lung Adenocarcinoma with Signet-ring Cell Component. *Lung Cancer* Vol. 72 Issue 3:309-315.
- [142] Zeng Z. S., Weiser M. R., Kuntz E., Chen C. T., Khan S. A., Forslund A., Nash G.M.,

Gimbel M., Yamaguchi Y., Culliford A. T., D'Allesio M., Barany F., Baty P. B. (2008): C-Met Gene Amplification Is Associated with Advanced Stage Colorectal Cancer and Liver Metastases. *Cancer Letters* Vol.265 Issue 2:258-269.

[143] Zhang J., Iwanaga K., Choi K. C., Wislez M., Raso M. G., Wei W., Wistuba I. I., Kurie J. M. (2008): Intratumoral Epiregulin Is a Marker of Advanced Disease in Non-Small Cell Lung Cancer Patients and Confers Invasive Properties on EGFR-Mutant Cells. *Cancer Prevention Research* 3:201-207.

[144] Zhao X., Weir B. A., LaFramboise T., Lin M., Beroukhim R., Garraway L., Beheshti J., Lee J. C., Naoki K., Richards W. G., Sugarbaker D., Rubin M. A., Jähnne P. A., Girard L., Minna J., Christiani D., Li C., Sellers W. R., Meyerson M. (2005): Homozygous Deletions and Chromosome Amplifications in Human Lung Carcinomas Revealed by Single Nucleotide Polymorphism Array Analysis. *Cancer research* 65:5561-5570.

[145] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

[146] <http://www.linkos.cz>

[147] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>

[148] <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/lung.asp>

ZKRATKY

AKT	RAC-beta serine/threonine-protein kinase
AKT/PKB	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase - RAC-alfa serin/treonin proteinkináza
ATP	adenosintrifosfát
BAD	BCL2 antagonist of cell death - Bcl2 antagonist buněčné smrti
B-Myb	Myb-related protein B
C-Myc	avian myelocytomatosis viral oncogene homolog - ptačí myelomatózní virální onkogenní homolog
DAG	1,2-diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DNA	deoxyribonucleotide acid - deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiaminetetraoctová kyselina
ELK1 ETS	domain-containing protein Elk-1 - ETS doména obsahující protein Elk-1
ErK	mitogen-activated protein kinase - mitogenně aktivovaná proteinkináza
FGF	fibroblast growth factor - fibroblastový růstový faktor
FKHR	forkhead box protein O1
FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2 - substrát fibroblastového růstového receptoru 2
Gab1	GRB2-associated-binding protein 1
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3 beta
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2 - vazebný protein receptoru pro růstový faktor 2
GAP	GTPase activating protein - GTPázu aktivující protein
GTP	guanosintrifosfát
HER	human epidermal growth factor receptor - lidský epidermální růstový faktor
IP3	inositol 1,4,5-trifosfát
JAK	tyrosine-protein kinase JAK - tyrozinproteinová kináza JAK
JNK	mitogen-activated protein kinase - mitogenně aktivovaná proteinkináza
KIF5B	kinesin family member 5B - člen kinezinové rodiny 5B
KLC1	kinesin light chain 1 - lehký řetězec kinezinu 1

KRAS	kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	mitogen-activated proteinkinase - mitogenně aktivovaná proteinkináza
MEK	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase
MKP1	MAPK phosphatase 1 - fosfatáza MAPK 1
MMP	matrix metalloproteinase - matrixová metaloproteináza
mRNA	messenger RNA - mediátorová DNA
mTOR	mammalian target of rapamycin - savčí cíl rapamycinu
NK4	interleukin 32
PDK	pyruvate dehydrogenase kinase - pyruvát dehydrogenázová kináza
PIP2	fosfatidilinositol 4,5-bisfosfát
PLCy	phospholipase C gamma - fosfolipáza C gama
PKC	protein kinase C - proteinkináza C
PTEN	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase
P38	activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Ras	Rat sarcoma - krysí sarkom
Rho	rhodopsin - rodopsin
Shc	SHC-transforming protein - SHC-transformující protein
Shp1	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 - fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfát 5-fosfatáza 1
Shp2	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
SOS	son of sevenless homolog
Src	proto-oncogene tyrosine-protein kinase - protoonkogen tyrozinproteinové kinázy
STAT	signal transducer and activator of transcription - signální transduktor a aktivátor transkripce
S6K	ribosomal protein S6 kinase
TGF	transforming growth factor - transformující růstový faktor
TRIS	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
TTF1	transcription termination factor 1 - transkripční terminační faktor 1
VEGF	vascular endothelial growth factor - vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor - receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru