

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Kristýna Kolaříková

Univerzita Palackého v Olomouci

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv imunohistochemické exprese proteinů ERCC1,
FLNA a mutačního statusu K - RAS k výskytu
vzdálených metastáz u NSCLC**

Bakalářská práce

Kristýna Kolaříková

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

Olomouc 2014 Vedoucí práce: MUDr. et MVDr. Jozef Škarda, Ph.D., Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. *et* MVDr. Jozefa Škardy, Ph.D., Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Dobrochově dne 7. 5. 2014

Na tomto místě bych ráda poděkovala MUDr. *et* MVDr. Jozefu Škardovi, Ph.D., Ph.D za trpělivost, vstřícnost a cenné rady. Rovněž děkuji Giorgi Mgebrishvilimu za statistickou analýzu dat. Děkuji také své rodině za podporu během studia.

Souhrn

Rakovina plic se stala jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích. Na jejím vzniku se podílí faktory vnější i dědičné. Léčba může být chirurgická, dále může zahrnovat radioterapii a chemoterapii. V současné době se v onkologii uplatňuje také cílená léčba, která umožňuje individuální přístup pro pacienta na základě jeho genetické výbavy a detekce molekulární biomarkerů.

V rámci této bakalářské práce byla sledována exprese proteinů ERCC1, K - RAS a FLNA ve vzorcích NSCLC 35 pacientů, kterým byla aplikována neoadjuvantní chemoterapie. Pomocí dvojstupňové imunohistochemické metody s použitím diaminobenzidinu jako chromogenního substrátu byla detekována nukleární exprese proteinů K - RAS a ERCC1 a cytoplazmatická exprese FLNA. Statistická analýza dat byla provedena softwarem STATISTICA verze 2 pomocí Mann - Whitney neparametrického testu. Nebyly zjištěny žádné signifikantní korelace exprese s jednotlivými subtypy NSCLC, stupněm diferenciací, velikostí tumoru, výskytem metastáz v regionálních uzlinách a vzdálených metastáz.

Summary

Lung cancer has become one of the most common causes of death in the developed countries. Cancerogenesis is dependent on many external factors and hereditary. The treatment may be surgery, radiotherapy and chemotherapy. In oncology is also used target therapy, because it allows individual treatment for patient. It's based on finding the patient's genotype and detection of molecular biomarkers.

Goal of the thesis was deal with expression of ERCC1, K - RAS and FLNA in samples of NSCLC of thirty-five patients under the treatment of neoadjuvant chemotherapy by using two-step immunohistochemical method by using the diaminobenzidine as a chromogenic substrate. Statistical analysis of data was performed by software STATISTICA verze 2 using the Mann - Whitney test. There were no significant correlations in the expression of proteins with histological subtypes of NSCLC, differentiation, tumor size, lymph node metastasis and distant metastasis.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Současný stav řešené problematiky	8
2.1 Nermalobuněčný karcinom	8
2.2 Léková rezistence	9
2.2.1 Klasická mnohočetná léková rezistence	9
2.2.2 Atypická mnohočetná léková rezistence	10
2.3 Reparační mechanizmy opravy DNA	12
2.3.1 Mismatch repair	13
2.3.2 Nukleotidová excizní oprava	13
2.3.3 Bázová excizní oprava.....	14
2.3.4 Homologní rekombinace	14
2.4 ERCC1	15
2.5 K - RAS	16
2.6 FLNA.....	17
2.7 Vzdálené metastázy	17
3. Cíle práce	21
4. Materiál a metodika.....	22
4.1 Biologický materiál.....	22
4.2 Chemikálie a použité roztoky	22
4.3 Přístroje a vybavení laboratoře	22
4.4 Tvorba TMA bloků.....	23
4.5 Imunohistochemická metoda	23
5. Výsledky	25
6. Diskuze.....	36
7. Závěr	37
8. Literatura	38
9. Seznam použitých zkratk.....	46

1. Úvod

Nádory plic jsou nejčtenější nádory postihující dýchací soustavu. Maligní skupina těchto nádorů, tzv. karcinomy, má u mužů v České republice prvenství v onkologických onemocněních a u žen jejich výskyt v posledních letech stále stoupá. Plicní karcinomy jsou velmi často diagnostikovány u lidí ve věku 50 - 65 let. (<http://www.svod.cz/?sec=aktuality>).

Stejně jako u všech typů rakoviny, tak i u karcinomu plic je velmi důležitý nález tumoru v co nejranějším stádiu, dle něhož se pak odvíjí prognóza. Většina případů tohoto onemocnění je však kvůli nespecifickým příznakům diagnostikována až v pokročilejších stádiích, což se i přes výrazný medicínský pokrok odráží na výši mortality, která je velmi vysoká (dle zveřejněných informací v roce 2008 více než 5600 úmrtí ročně v České republice).

Karcinom plic je obvykle odvozen z epitelových buněk bronchů. Ke vzniku nádorového bujení dochází při nahromadění genetických poruch v buňkách, které v důsledku toho ztrácí kontrolu nad regulací buněčného dělení a dochází k jejich nekontrolované proliferaci. Vznikající dceřiné buňky se postupně hromadí a vytváří nádorovou masu.

Vysoká úmrtnost pacientů je spojena s metastatickým šířením tumorových buněk z primárního nádoru do vzdálených míst lymfatickou nebo hematogenní cestou, kde zakládají další, sekundární nádory.

Pro diagnostiku, stanovení prognózy a predikci léčby mají v onkologii velký význam biomarkery, díky nimž je možná personalizace léčby.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Nemalobuněčný karcinom

Z histologického hlediska lze rozdělit karcinom plic na dva hlavní podtypy: malobuněčný (SCLC) a nemalobuněčný (NSCLC) karcinom (Klein, 2006). Více než 80 % všech případů rakoviny plic tvoří nemalobuněčný karcinom, který je rozlišován na tři typy: adenokarcinom, spinocelulární a velkobuněčný karcinom (Wilmar *et al.*, 2011, cit. Farhat *et Houhou*, 2013).

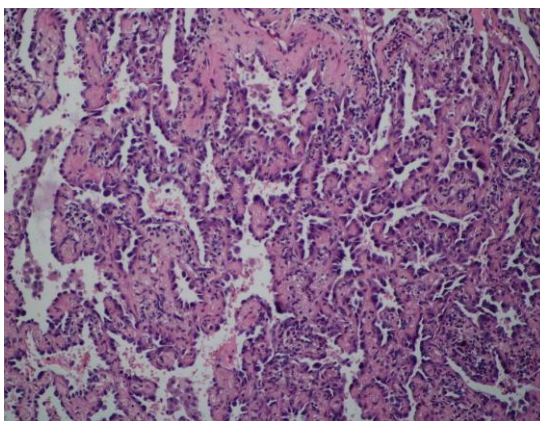
Adenokarcinom roste pomalu, nevytváří nádorovou masu větších rozměrů, ale na druhou stranu brzy metastázuje. Jeho vznik nesouvisí s kouřením pacienta.

Spinocelulární karcinom vzniká z dlaždicového metaplastického epitelu, který se vytvoří po prodělaném zánětu. Dále je také spojen s kouřením a avitaminózou A.

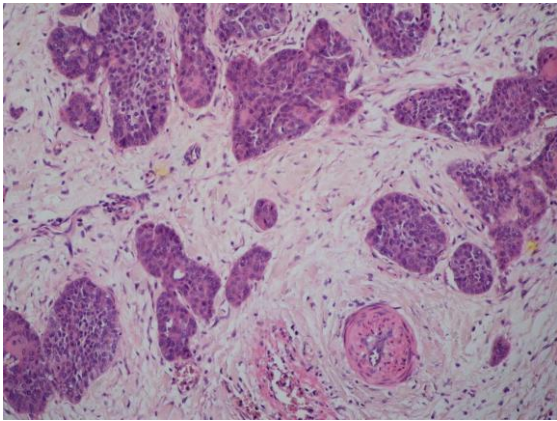
Velkobuněčný karcinom je tvořen nediferencovanými buňkami. Má špatnou prognózu a rychle metastázuje (Mačák *et Mačáková*, 2004).

Léčba karcinomu plic závisí na stádiu onemocnění. U radikálně operovaných pacientů je poměrně vysoká šance na pětileté přežití. Ovšem vzhledem k jeho agresivní povaze zahrnuje obvykle kombinaci chirurgických postupů, radioterapie a chemoterapie. Tyto postupy však nelze aplikovat současně. Pokud je radioterapie nebo chemoterapie aplikována před operací, je označovaná jako indukční léčba, jestliže však následuje až po operaci, jedná se o adjuvantní léčbu.

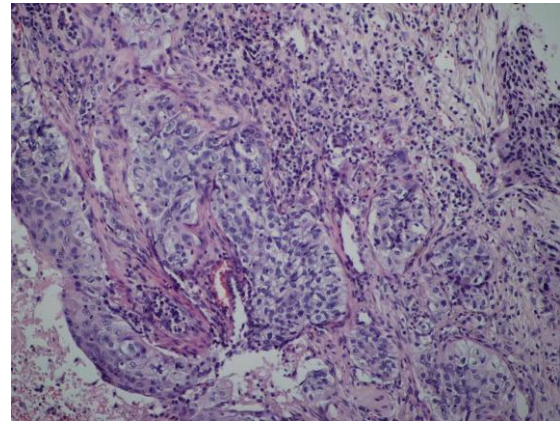
NSCLC má odlišnou citlivost na radioterapii a chemoterapii. Je poměrně chemorezistentní, proto se používají kombinované chemoterapeutické režimy. Mezi často používaná cytostatika patří cisplatin, karboplatin, taxany aj. (Klein, 2006).



Obrázek č. 1 Základní histologické barvení hematoxylin - eosinem. Lepidický adenokarcinom. Zvětšení 100x.



Obrázek č. 2 Základní histologické barvení hematoxylin - eosinem. Spinocelulární karcinom. Zvětšení 100x.



Obrázek č. 3 Základní histologické barvení hematoxylin - eosinem. Velkobuněčný karcinom. Zvětšení 100x.

2.2 Léková rezistence

Jednou z nejčastějších příčin neúspěšnosti léčby rakoviny je výskyt lékové rezistence. Jedná se o schopnost nádorových buněk odolávat účinku chemoterapeutik (Ambudkar, *et al.*, 1999, nalezeno v: Miri *et* Mehdipour, 2008). Ztráta citlivosti se nemusí týkat pouze jednoho léčiva, ale i dalších, obvykle strukturně podobných látek. Takovou rezistenci pak nazýváme zkříženou (Biedler, *et al.*, 1970, nalezeno v: Nosková *et al.*, 2000a).

Jestliže se však jedná o odolnost k látkám s odlišnou strukturou i mechanismem účinku, mluvíme o tzv. mnohočetné lékové rezistenci (multidrug resistance - MDR) (Liscovitch *et al.*, 2002, van Zuylen, *et al.*, 2000, nalezeno v: Miri, *et* Mehdipour, 2008), která se rozděluje na dva typy. Prvním typem je stav, kdy buňky jsou vůči léčivům necitlivé již při první léčbě a označuje se jako vnitřní rezistence. Druhým typem je pak získaná, kdy buňky ztrácí citlivost po relapsu (Bates, *et al.*, 1996, Liscovitch *et al.*, 2002, nalezeno v: Miri *et* Mehdipour, 2008).

Ačkoliv mechanismy MDR jsou komplexní, mohou být rozděleny do několika skupin. Jednou z nejběžnějších klasifikací je rozdělení MDR na klasickou a atypickou (Teodori, *et al.*, 2002, nalezeno v: Miri *et* Mehdipour, 2008).

2.2.1 Klasická mnohočetná léková rezistence

Klasická MDR je spojena s funkcí P - glykoproteinu (Pgp) (Zaman *et al.*, 1994). Tento monomerní transmembránový protein tvoří 1280 aminokyselin. Jeho N- a C- konec obsahuje dvanáct transmembránových α - helixů oddělených extracelulárními, hydrofilními

smyčkami. V cytosolu se nacházejí dvě domény vázající nukleotidy, kde probíhá hydrolýza ATP. Energie získaná touto reakcí je využívána pro transport látek přes membránu. ATP vazebné místo je charakteristické pro skupinu ABC (ATP Binding Cassette) transporterů, kam tedy patří i P - glykoprotein (Dean, *et al.*, 2001, nalezeno v: Pechandová *et al.*, 2006). Na rozdíl od ostatních přenašečů, Pgp váže strukturně i funkčně odlišné látky, což mu umožňuje interagovat s velkým množstvím substrátů, které jsou obvykle hydrofóbní nebo amfifilní povahy s planárním uspořádáním.

Vzhledem ke své transportní funkci má P - glykoprotein významnou roli v ochraně organismu, protože zabraňuje vstupu xenobiotik do buněk a zajišťuje jejich eliminaci. Tato funkce je však jedním ze základních mechanismů vzniku mnohočetné lékové rezistence (Sun, *et al.*, 2004, nalezeno v: Pechandová *et al.*, 2006).

2.2.2 Atypická mnohočetná léková rezistence

O atypické mnohočetné lékové rezistenci (at - MDR) mluvíme tehdy, když se základních mechanismů rezistence neúčastní Pgp a od typické se liší především tím, že nezahrnuje rezistenci na *Vinca* alkaloidy (Di Marco *et al.*, 1977, Owellen *et al.*, 1977, Skovsgaard, 1977, nalezeno v: Nosková *et al.*, 2000a).

Ukázalo se, že at - MDR souvisí s DNA topoizomerázami (Nosková *et al.*, 2000b). Jedná se o skupinu enzymů, které mění topologii molekuly DNA. Lze je rozdělit na dvě hlavní třídy - typ I a typ II (Wang, 1996, nalezeno v: Rasheed *et al.*, 2003). Topoizomerázy II mají důležitou funkci při replikaci DNA, kondenzaci a segregaci chromozomů (Liu, 1989, nalezeno v: Thakur, 2011). U savců se topoizomeráza II vyskytuje ve dvou izoformách: α a β (Wang, 1996, nalezeno v: Rasheed *et al.*, 2003).

Expresí genu *Topo2 α* je inhibována tumorovým supresorem p53. Ztráta *wt p53* způsobuje neregulovanou expresi *Topo2 α* . V důsledku toho dochází k chromozomovým přestavbám a zvýšení buněčné proliferace, což může vést ke vzniku nádorových buněk (Wang *et al.* 1997).

Cytotoxický účinek inhibitorů topoizomeráz závisí na množství molekul těchto enzymů (Nosková *et al.*, 2000b), proto je vznik rezistence na inhibitory založen na jejich snížené akumulaci v buňkách a dále jejich snížené aktivitě a expresi (Ohta *et al.*, 1993, nalezeno v: Škarda *et al.*, 2000).

Další typy at - MDR jsou spojené s expresí metabolických enzymů jako např. glutathion-S-transferázy a cytochrom P₄₅₀ dependentní oxidázy (Miri *et al.*, 2008).

Glutathion-S-transferázy (GSTs) jsou důležitou rodinou detoxikačních enzymů, které katalyzují konjugaci elektrofilních látek s nukleofilními molekulami glutathionu a nonselendependentní redukci organických hydroperoxidů (Hayes *et al.*, 1995, Tew, 1994, nalezeno v: Beaumont *et al.*, 1998). V lidském organismu existuje šest tříd GSTs: α , μ , π , θ , ω a ξ (Ketterer, 2001, Salinas *et al.*, 1999, Townsend *et al.*, 2003, nalezeno v: Depeille *et al.*, 2004).

Konjugací elektrofilních molekul se snižuje jejich reaktivita a vzniklé konjugáty jsou tedy pro buňky méně toxické. Zároveň je konjugace s glutathionem spojena s ochranou nádorových buněk před elektrofilními antineoplastickými činidly (Schisselbauer *et al.*, 1990, nalezeno v: Depeille *et al.*, 2004), které se používají díky svému cytotoxickému účinku při léčbě maligních nádorů (Kivistö *et al.*, 1995, nalezeno v: Riddick *et al.*, 2005).

Cytochrom P450 (CYP450) je nadrodina enzymů nezbytných pro detoxikaci různých chemických látek a metabolismus léčiv. Ačkoliv tato skupina zahrnuje více než padesát enzymů, pouze šest z nich metabolizuje až 90 % léčiv (Slaughter *et al.*, 1995, Wilkinson, 2005, nalezeno v: Lynch *et Price*, 2007). U člověka se vyskytují v játrech, méně pak v plicích, ledvinách a v placentě (Slaughter *et al.*, 1995, nalezeno v: Lynch *et Price*, 2007).

Při metabolismu léčiv dochází k chemické reakci molekuly léčiva s aktivovaným kyslíkem. Aktivace kyslíku je umožněna díky způsobu vazby mezi molekulou kyslíku a bílkovinnou složkou P450, čímž se cytochromy P450 liší např. od hemoglobinu, kde je kyslík vázán na železo (Zuber *et al.*, 2002, nalezeno v: Kousalová *et al.*, 2003).

Metabolismus léčiv prostřednictvím P450 vykazuje genetickou variabilitu (polymorfismus), která ovlivňuje reakci pacienta na konkrétní léčivo (Weinshilboum, 2003, nalezeno v: Lynch *et Price*, 2007). Odlišná odpověď byla pozorována i mezi pacienty různého etnického původu (Bradford, 2002, Phillips *et al.*, 2001, nalezeno v: Lynch *et Price*, 2007).

At - MDR je také spojena s proteiny multidrug resistance associated protein (MRP) a lung resistance related protein (LRP) (Di Marco *et al.*, 1977, Owellen *et al.*, 1977, Skovsgaard, 1977, nalezeno v: Nosková *et al.*, 2000b).

MRP protein patří do nadrodiny ABC transmembránových přenašečů stejně jako P - glykoprotein (Cole *et al.*, 1992, Higgins, 1992, nalezeno v: Gao *et al.*, 1998).

MRP je tvořen 1531 aminokyselinami a jeho molekulová hmotnost je 171 kDa (Cole *et al.*, 1992, 1993, nalezeno v: Cole *et Deeley*, 1998). Působí jako primární aktivní transportér široké řady konjugátů, z nichž některé jsou potenciální fyziologické látky (Loe *et al.*, 1996, nalezeno v: Gao *et al.*, 1998).

Tento protein je schopný snižovat akumulaci léčiv v buňkách poklesem permeability jejich cytoplazmatické membrány, a tudíž může být příčinou rezistence na řadu hydrofóbních léčiv (Zaman *et al.*, 1994).

Dosud bylo identifikováno šest MRP proteinů, ovšem pouze MRP 1 je spojen s lékovou rezistencí (Arceci, 1993, nalezeno v: Nosková *et al.*, 2000b).

MRP zvyšuje odolnost buněk vůči chemoterapeutickým látkám zahrnující epipodophyllotoxiny, Vinca alkaloidy a některé anthracykliny (Cole *et al.*, 1994, Grant *et al.*, 1994, Kruh *et al.*, 1994, Zaman *et al.*, 1994, nalezeno v: Gao *et al.*, 1998).

LRP byl objeven v buněčné linii NSCLC a byl identifikován jako lidský „major vault protein“ (MVP) (Scheper *et al.*, 1993, Scheffer *et al.*, 1995, nalezeno v: Rybarova *et al.*, 2003). „Vaults“ jsou ribonukleoproteinové částice obsahující nejméně dva proteiny, molekulu malé RNA a „major vault protein“ (Kedersha *et al.*, 1990, nalezeno v: Dalton *et al.*, Scheper, 1999).

Jejich molekulová hmotnost je 110 kDa (Scheffer *et al.*, 1995, Zurita *et al.*, 2003, nalezeno v: Krishnakumar *et al.*, 2004) a jsou tvořeny 893 aminokyselinami (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_005106.2).

„Vaults“ jsou přítomné v komplexech jaderných pórů a podílejí se na obousměrném transportu látek mezi cytoplazmou a jádrem (Scheffer *et al.*, 1995, nalezeno v: Tsuji *et al.*, 2012). LRP je fyziologicky exprimován v epitelu tlustého střeva, plicním epitelu, v proximálním tubulu ledvin, kůře nadledvin a v makrofázích (Izquierdo *et al.*, 1996, nalezeno v: Elsayy *et al.*, 2002).

Dle Kitazono *et al.* (Kitazono *et al.*, 1999, nalezeno v: Elsayy *et al.*, 2002) je exprese LRP v nádorových buňkách spojena s rezistencí k doxorubicinu, vincristinu, paclitaxelu a ke gramidicinu D (Izquierdo *et al.*, 1996, nalezeno v: Elsayy *et al.*, 2002).

2.3 Reparační mechanismy opravy DNA

Protože je DNA neustále vystavena působení škodlivých exogenních i endogenních faktorů, jsou mechanismy oprav DNA klíčové pro zachování stability genomu. Jestliže není vzniklá chyba v molekule DNA opravena, může vést ke vzniku mutací somatických nebo zárodečných buněk, které mění jejich buněčný fenotyp a jsou proto příčinou mnoha dysfunkcí a různých onemocnění.

2.3.1 Mismatch repair

Mechanismů zaměřených na opravu poškozené DNA je několik. Patří sem např. oprava chybného párování řízená methylocí (mismatch repair), která zajišťuje reparaci poškození vzniklého během replikace, čímž zamezí tomu, aby se mutace staly při dělení buněk trvalými (Kolodner *et al.*, 1999, Kunkel *et al.*, 2005, Modrich *et al.*, 1996, nalezeno v: Li, 2008).

Mismatch repair (MMR) iniciuje MutS protein vyskytující se ve dvou formách: hMutS α a hMutS β . Izoforma hMutS α rozpoznává chybné párování bází a krátké delece a inserce. hMutS β je schopná detekovat rozsáhlejší chyby na vlákně DNA. Jakmile se MutS naváže na poškozené místo DNA, připojí se k tomuto komplexu hMutL α , který má ATPasovou aktivitu a poruchy její funkce inaktivují mechanismus MMR (Zhang *et al.*, 2005, nalezeno v: Li, 2008). Dále bylo prokázáno, že má také endonukleázovou aktivitu, která je dependenní na přítomnosti PCNA/replikačním faktoru C (RFC). hMutL α vytvoří zářez ve směru od 5' konce k chybně zařazenému páru a exonukleáza I pak od tohoto zářezu vyštěpuje jednotlivé nukleotidy za odstranění chyby (Kadyrov *et al.*, 2006, nalezeno v: Li, 2008). Nové vlákno je syntetizováno prostřednictvím polymerázy δ (Longley *et al.*, 1997, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003).

U *Escherichia coli* rozpoznává opravný systém chybně vloženou bázi na základě předpokladu, že v matricovém řetězci DNA je správná báze a v replikovaném ne. Matricový řetězec je identifikován na základě přítomnosti methylovaného adeninu v sekvencích GATC. (Ban *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2005, nalezeno v: Li, 2008) Úloha hemi-methylované sekvence jako signálního místa není u člověka zachována. Mechanismus iniciace tedy není zcela objasněn, nicméně nedávná studie ukázala, že za vazbu hMutS α k chromatinu je zodpovědný trimethylovaný histidin H3K36 (Li, 2013).

2.3.2 Nukleotidová excizní oprava

Mechanismus nukleotidové excizní opravy (NER) odstraňuje poškození, která vznikla působením UV záření jako např. cyklobutanové pyrimidinové dimery (CPDs). Opravuje také rozsáhlejší léze indukované chemickými mutageny nebo chemoterapeutiky (Reardon *et al.*, 2005, Sancar, 1996, Wood, 1997, nalezeno v: Hu *et al.*, 2013).

Rozpoznání místa léze je zabezpečeno komplexy XPC - HR23B a RPA - XPA (Hey *et al.*, 2002, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003). Dalším faktorem důležitým pro rozpoznání poškození je protein DDB (damage DNA binding protein) (Tang *et al.*, 2002, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003), který má vysokou afinitu k lézím způsobených UV zářením (Hwang

et al., 1999, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003). Po rozpoznání poškozeného místa dojde k uvolnění transkripčního faktoru TFIIF (Yokoi *et al.*, 2000, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003), jehož podjednotky XPB a XPD mají helikázovou aktivitu a zajistí rozvolnění molekuly DNA (Schaeffer *et al.*, 1993, 1994, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003).

Otevřený komplex je stabilizován proteinem RPA, který se mimo to podílí i na umístění XPG a ERCC1 - XPF endonukleáz, jež jsou zodpovědné za vystřížení chybného úseku DNA (de Laat *et al.*, 1999). Posledním krokem této reparační reakce je opravná syntéza chybějícího úseku, což zajišťuje DNA polymeráza δ nebo ϵ . Celý proces je ukončen ligací DNA řetězce (de Boer *et al.*, 2000).

2.3.3 Bázová excizní oprava

Bázová excizní oprava (BER) zajišťuje odstranění poškozených bází, které jsou způsobeny např. methylačními, oxidačními činidly a také spontánním vznikem apurinových nebo apyrimidinových míst (AP míst) (Lindahl, 2000, Wilson *et al.*, 1997, nalezeno v: Sukhanova *et al.*, 2005).

Mechanismus BER je zahájen enzymem DNA glykosidázou, která štěpí N-glykosidické vazby mezi bází a deoxyribózou, čímž se vytvoří na molekule AP - místa (Klungland *et al.*, 1995, nalezeno v: Olsen *et al.*, 2001). Dále následuje hydrolytické štěpení fosfodiesterových vazeb prostřednictvím AP endonukleázy od 5' konce k AP místu (Wilson *et al.*, 2001, nalezeno v: Sukhanova *et al.*, 2005). Vzniklá mezera je ohraničena na 3' konci hydroxylovým zbytkem a na 5' konci deoxyribózafosfátovou skupinou (Beard *et al.*, 2006, nalezeno v: Liu *et al.*, 2012). DNA polymeráza β , která má také lyázovou aktivitu k deoxyribózafosfátové skupině (dRP), zajistí vložení chybějícího nukleotidu. Celou opravu zakončuje DNA ligáza spojením vlákna DNA. Tento mechanismus zajišťuje nahrazení jednoho nukleotidu a je známý jako *single patch*. Jestliže je 5' konec odolný vůči dRP lyázové aktivitě, polymeráza je schopná posunout syntézu a vytvořit „záložku“ (flap), kterou pak vystříhne endonukleáza FEN - 1 a mezery jsou opět zaceleny DNA ligázou. Tento způsob opravy se nazývá *long patch* (Liu *et al.*, 2010, nalezeno v: Karahalil *et al.*, 2010).

2.3.4 Homologní rekombinace

Homologní rekombinace (HR) je opravný proces různých potenciálně letálních lézí, jako jsou např. křížové vazby mezi řetězci DNA, mezery a dvouvláknové zlomy (Li *et al.*, 2008).

Klíčovým proteinem tohoto procesu je Rad51, který je důležitý pro všechny tři fáze HR: presynaptickou, synaptickou, a postsynaptickou (Sung *et al.*, 2003, nalezeno v: Krejci *et al.*, 2012). Rad51 se váže na ssDNA za vzniku Rad51 - ssDNA filamentu (presynaptický filament) (Ogawa *et al.*, 1993, nalezeno v: Krejci *et al.*, 2012). Navázaný protein na jednovláknové DNA usnadňuje během synaptické fáze její spojení s homologním duplexem za vzniku heteroduplexu DNA. Během postsynaptické fáze, kdy je DNA syntetizována, je jako primer využit 3' konec původně jednovláknové DNA. Po syntéze DNA a ligaci se vytváří dva Holidayovy spoje (dHJ) (Szostak, *et al.*, 1983, nalezeno v: Krejci *et al.*, 2012), které jsou pak rozvolněny za tvorby crossingover nebo noncrossingover produktů. (Nassif *et al.*, 1994, nalezeno v: Krejci *et al.*, 2012).

2.4 ERCC1

Gen kódující protein ERCC1 (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*) je lokalizován na dlouhém raménku 19. chromozomu v pozici 13. 32 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2067>).

Kóduje enzym důležitý pro nukleotidovou excizní opravu, která rozpoznává a opravuje adukty DNA způsobené cisplatinou (Mu *et al.*, 1996, Sancar, 1994, Zamble *et al.*, 1996, nalezeno v: Olaussen *et al.*, 2006).

Dále hraje významnou roli v opravě křížových vazeb mezi vlákny molekuly DNA a v rekombinačních procesech (Niedernhofer *et al.*, 2004, Sargent *et al.*, 2000, de Silva *et al.*, 2000, nalezeno v: Olaussen *et al.*, 2006).

Při studiu prognostické role ERCC1 u pacientů s NSCLC bylo zjištěno, že jeho nízká exprese je spojena s delším přežitím pacientů, kteří byli léčeni chemoterapií s obsahem cisplatinou (Wei *et al.*, 2000). Na druhou stranu jiné studie naznačují, že pacienti s ERCC1 pozitivními nádory žili déle než pacienti s ERCC1 negativními nádory (Zheng *et al.*, 2007).

Ke zvýšení citlivosti nádorových buněk na cisplatinu mohou přispět i další faktory (např. tolerance k poškození DNA). Klinický význam těchto faktorů může záviset na podávané dávce cisplatinu, její kombinaci s jinými léčivy, následné radioterapii a dalších aspektech léčby. V důsledku toho nelze vytvořit obecné prohlášení, které by se týkalo vlivu exprese ERCC1 na výsledek léčebných režimů NSCLC (Olaussen *et al.*, 2006).

2.5 K - RAS

Gen kódující protein K - RAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) je lokalizován na krátkém raménku 12. chromozomu v pozici 12. 1 a patří do nadrodiny RAS onkogenů (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845>).

RAS geny, stejně jako mnoho onkogenů, byly objeveny při studiích retrovirů u zvířat. Předmětem výzkumu se staly na začátku roku 1960, když bylo zjištěno, že virus způsobující leukémii u hlodavců vedl i ke vzniku sarkomů (Harvey, 1964, nalezeno v: Riely *et al.*, 2009). Později byl identifikován další virus s podobnými vlastnostmi (Kirsten *et al.*, 1967, nalezeno v: Riely *et al.*, 2009). Tyto dva retroviry (*rat sarcoma - ras*) byly pojmenovány podle jejich objevitelů H - RAS a K - RAS (Harvey and Kirsten). Později bylo zjištěno, že nesou sekvence odvozené od potkaního genomu (Ellis *et al.*, 1981, nalezeno v: Riely *et al.*, 2009). Homology těchto genů byly nalezeny i v lidské nádorové linii (Goldfarb *et al.*, 1982, Pulciani *et al.*, 1982, Shih *et al.*, 1981, nalezeno v: Riely *et al.*, 2009).

Dnes víme, že RAS geny kódují rodinu guanointrifosfát vazebných proteinů, které regulují růst, diferenciaci a apoptózu buněk (Downward, 1998, Shields *et al.*, 2000, Vojtek *et al.*, 1998, nalezeno v: Riely *et al.*, 2009).

RAS proteiny mohou získat transformační potenciál v důsledku bodové mutace v kodonu 12, 13 nebo 61 a následnou záměnou některé z aminokyselin (Bos, 1989, nalezeno v: Riely *et al.*, 2009). Tyto mutace narušují GTPázovou aktivitu RAS proteinů, což vede ke vzniku rezistence vůči jejich inhibitorům a dochází k nahromadění RAS proteinů v aktivním stavu, který udržuje RAS signalizaci (Trahey *et al.*, 1987, nalezeno v: Karachaliou *et al.*, 2013).

RAS mutace se vyskytují přibližně ve třetině lidských malignit (Bos, 1989, nalezeno v: Riely *et al.*, 2009), z toho K - RAS v plicním adenokarcinomu patří mezi nejčastější a až v 97 % se u NSCLC jedná o mutaci v kodonu 12 nebo 13 (Forbes *et al.*, 2006, nalezeno v: Riely *et al.*, 2009). Dále se ukázalo, že frekvence K - RAS mutací se liší v závislosti na etnické skupině, např. u Afroameričanů byl zaznamenán jejich častější výskyt než u bělochů (Hunt *et al.*, 2002).

Při studiích vztahu mutací K - RAS a kouření pacientů byla zjištěna u bývalých kuřáků i stále kouřících transverzní mutace G → T nebo G → C. U pacientů, kteří nikdy nekouřili pak G → A. Z těchto údajů vyplývá, že některé K - RAS mutace jsou spojeny s kouřením a jiné se vyskytují pouze u nekuřáků (Riely *et al.*, 2009).

2.6 FLNA

Gen, který kóduje filamin A (FLNA) se nachází na chromozomu X v pozici 28 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2316>). Protein vytváří homodimery a stejně jako ostatní filaminy váže mezi sebou aktinová filamenta do dynamické trojrozměrné struktury (van der Flier *et al.*, 2001, Gorlin *et al.*, 1990, Stossel *et al.*, 2001, nalezeno v: Jiang *et al.*, 2013).

U savců se vyskytují jeho tři izoformy: A, B a C (Hartwig *et al.*, 1975, Wang *et al.*, 1975, nalezeno v: Feng *et Walsh*, 2004).

Polypeptidový řetězec filaminu se skládá z N- koncové domény, na níž se váže aktin (ABD - actin binding domain), dále z domény tvořené 24 antiparalelními β listy a smyčkami, které slouží jako závěsné struktury (Gorlin *et al.*, 1990, Weihing, 1988, nalezeno v: Feng *et Walsh*, 2004).

Dimerizací molekuly přes C- koncovou doménu dojde k vytvoření struktury ve tvaru Y se dvěma N- koncovými doménami, které slouží k propojování aktinových filament (Zhou *et al.*, 2010, nalezeno v: Deng *et al.*, 2012).

Bylo prokázáno, že filaminy jsou nezbytné pro vývoj člověka. Mutace izoform A a B způsobují např. poruchy vývoje mozku, kostí a kardiovaskulárního systému (Ekşioğlu *et al.*, 1996, Huttenlocher *et al.*, 1994, nalezeno v: Feng *et Walsh*, 2004).

Dalším důležitým zjištěním je, že buňky s nižší expresí FLNA jsou citlivější na léčbu ionizujícím zářením, bleomycinem a cisplatinou, které se používají k léčbě nádorů, protože způsobují jednovláknové nebo dvouvláknové zlomy molekuly DNA (Yue *et al.*, 2012, nalezeno v: Jiang *et al.*, 2013).

2.7 Vzdálené metastázy

Zakládání metastáz je posledním stupněm progresu neoplastických útvarů a je vedle lékové rezistence hlavní příčinou úmrtí pacientů. Sklon primárního nádoru vytvářet sekundární léze se označuje jako metastatický potenciál (Sporn, 1996, nalezeno v: Winnard *et al.*, 2008).

K tomu, aby se nádorové buňky úspěšně začlenily do sekundárního místa je nutné, aby se oddělily z primárního nádoru, pronikly okolními tkáněmi a skrze bazální membrány cév vnikly do krevního oběhu, lymfatického systému nebo peritonea a zachytily se v cílovém orgánu (Al - Mehdi *et al.*, 2000, nalezeno v: Hunter *et al.*, 2008). V sekundárním místě musí nádorová buňka indukovat angiogenesi a nesmí být odhalena imunitním systémem (Liotta *et al.*, 1993, nalezeno v: Hunter *et al.*, 2008).

Úplné pochopení biologické a patologické podstaty metastázování chybí, a proto bylo zformulováno několik modelů k pochopení složité metastatické kaskády. Nejvíce uznávaným je Nowellův progresivní model (Nowell, 1976, nalezeno v: Hunter *et al.*, 2008), který předpokládá tvorbu mnoha mutací v subpopulaci primárního nádoru, což vede ke vzniku malých buněčných frakcí s metastatickým potenciálem (Fidler *et al.*, 1977b, nalezeno v: Hunter *et al.*, 2008).

Massague se svým týmem (Kang *et al.*, 2003, Minn *et al.*, 2005a, Minn *et al.*, 2005b, nalezeno v: Hunter *et al.*, 2008) prokázal existenci různých subpopulací buněk se specifickou expresí genů, která je predisponuje k metastázování do cílových orgánů, pravděpodobně vytvořením somatické změny (Kauffman *et al.*, 2003, Steeg, 2003, nalezeno v: Hunter *et al.*, 2008).

Rozdílné typy nádorů se liší svým metastatickým potenciálem. Některé nádory jsou velmi agresivní a četně zakládají metastázy, např. malobuněčný karcinom plic. Jiné naopak metastázuji vzácně (Al - Hajj *et al.*, 2003, Dexter *et al.*, 1978, Fidler, 1970, 1973, 1976, 1977a, 1977b, Glaves *et al.*, 1989, Poste *et al.*, 1982a, Poste *et al.*, 1982b, Raz *et al.*, 1980, nalezeno v: Winnard *et al.*, 2008).

U pacientů s diagnózou rakoviny plic je metastázemi nejčastěji zasažen mozek, játra, nadledviny a kosti (Hillers *et al.*, 1994, nalezeno v: Kim *et al.*, 2009). Míra metastázování do mozku se liší u jednotlivých histologických subtypů nádorů. Studie ukázaly, že až polovina pacientů, u nichž byl diagnostikován malobuněčný nebo nemalobuněčný karcinom plic, již metastáze v mozku má (Castrucci *et al.*, 2008, nalezeno v: Whitsett *et al.*, 2003).

K popisu nádorového šíření se mezinárodně používá TNM klasifikace (tumor - node - metastasis). T popisuje velikost a rozšíření primárního nádoru, N rozsah metastáz v okolních lymfatických uzlinách a M přítomnost nebo absenci intrathorakálních nebo vzdálených metastáz. Tento klasifikační systém je důležitý pro stanovení prognózy, naplánování léčby a také pro zhodnocení jejích výsledků (Watanabe, 2003, nalezeno v: UyBico *et al.*, 2010).

Bylo zjištěno, že filamin A chrání buňku před mechanickým namáháním, které se může podílet na zakládání metastáz (Glogauer *et al.*, 1998, nalezeno v: Jiang *et al.*, 2013). Dále také interaguje s řadou proteinů, které jsou spojeny se tvorbou metastáz, např. integriny a malé GTPázy (Byfield *et al.*, 2009, nalezeno v: Jiang *et al.*, 2013).

Předpokládá se, že vzhledem k buněčné funkci filaminu jsou nádorové buňky s jeho deficiencí více invazivní a mobilní. Nicméně je také možné, že i jeho určitá hladina exprese může podporovat nádorové buňky k metastázování. Tuto myšlenku potvrzuje výsledek proteomické studie, která zjistila, že vysoká exprese FLNA souvisí s metastatickým

potenciálem buněk hepatocelulárního karcinomu (Ai *et al.*, 2011, nalezeno v: Yue *et al.*, 2013). Také studie na bezsrstých myších ukázaly, že inhibice exprese filaminu A redukuje migraci a invazi nádorových buněk. Dále u rakoviny prsu je jeho nízká exprese spojena s méně častým výskytem vzdálených metastáz.

Tato zjištění naznačují, že filamin A je důležitým biomarkerem tvorby metastáz a může být použit i pro jejich inhibici (Jiang *et al.*, 2013).

Také bylo pozorováno, že *knockout FlnA* vedl k výrazné redukci onkogenních vlastností K - RAS, zahrnující např. vznik plicních nádorů (Nallapalli *et al.*, 2012, nalezeno v: Yue *et al.*, 2013).

K - RAS mutace jsou spojeny s pokročilým nádorovým progresem (Ahrendt *et al.*, 2001, Eberhard *et al.*, 2005, nalezeno v: Munfus - McCray *et al.*, 2011). Několik studií potvrdilo variabilitu K - RAS mutací mezi primárním tumorem a metastatickými lézemi NSCLC (Badalian *et al.*, 2007, Cortot *et al.*, 2010, Eichler *et al.*, 2010, Matsumoto *et al.*, 2006, Porta *et al.*, 2011, nalezeno v: Munfus - McCray *et al.*, 2011).

Při srovnání délky života pacientů, u nichž došlo v K - RAS genu k substituci aminokyselin, se ukázalo, že záměna hydrofilní asparagové kyseliny a argininu výrazně snižuje dobu přežívání, ve srovnání s těmi pacienty, jejichž K - RAS obsahuje *wild type* (nemutovanou formu) glycinu nebo substituci hydrofobní aminokyseliny (Hunt *et al.*, 2002).

Význam K - RAS jako nezávislého prognostického faktoru u NSCLC nepotvrdila zatím žádná z dosud provedených studií (Riely *et al.*, 2009).

Několik výzkumných skupin zjišťovalo vliv mutací na četnost recidiv a délku přežití pacientů. Bohužel vzhledem k různým stádiím nádorů a různým histologickým subtypům bylo obtížné interpretovat výsledky.

Další studie se týkaly mutace K - RAS jako biologického markeru odpovědi na léčbu cílenou proti EGFR (epidermal growth factor receptor). Prokázalo se, že plicní adenokarcinomy s mutací K - RAS jsou rezistentní vůči terapii erlotinibem (Eberhard *et al.*, 2005), což je reverzibilní tyrosinkinázový inhibitor EGFR (EGFR - TKI) (Arora *et al.*, 2005).

U pacientů s plicním adenokarcinomem byla zjištěna rozdílná exprese ERCC1 v primárním a sekundárním tumoru (Zhang, *et al.*, 2012).

Další studie také prokázala, že pacienti s nízkou expresí tohoto proteinu ve stádiích I- III NSCLC, kteří byli léčeni adjuvantní chemoterapií na bázi cisplatin, měli pozdější progresi než ti, jejichž ERCC1 exprese byla vysoká (Olaussen *et al.*, 2006, nalezeno v: Das *et al.*, 2012).

Gandara se svým týmem zjistil, že u pacientů s mutací EGFR dochází k nižší expresi ERCC1 (Besse *et al.*, 2013, Hubner *et al.*, 2011, nalezeno v: Yamashita *et al.*, 2013). V další studii byla u pacientů s NSCLC sledována délka období, kdy došlo k rozvoji metastáz. U ERCC1 negativních pacientů s delecí exonu 19 došlo k metastázování nádoru později než u ostatních pacientů. (Yamashita *et al.*, 2013). Některé studie také ukázaly, že tito pacienti jsou citlivější na léčbu EGFR - TKIs (Riely *et al.*, 2006, Jackman *et al.*, 2006, nalezeno v: Yamashita *et al.*, 2013).

Také byla zjištěna korelace mezi expresí cytokeratinu (CK), který je markerem pro identifikaci CTCs (cirkulující nádorové buňky), a ERCC1. CTCs s nízkou expresí CK jsou spojené s pozdější progresí. Nicméně tuto informaci je nutné ověřit při rozsáhlejší studii (Das *et al.*, 2012).

3. Cíle práce

1. Imunohistochemické stanovení exprese proteinů ERCC1, FLNA a mutačního statusu K - RAS ve vzorcích nemalobuněčného karcinomu plic.
2. Korelace exprese vybraných proteinů s výskytem vzdálených metastáz, histologickými subtypy plicních karcinomů, intervalem bezpříznakového období a celkovým přežitím.

4. Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

Donorové bloky se vzorky nemalobuněčného karcinomu.

4.2 Chemikálie a použité roztoky

Xylen, ethanol (70%, 80%, 96%), citrátový pufr, 5% roztok peroxidu vodíku, aceton, 0,5mol/l Tris pufr, Tris pufr + Tween (1 l Tris pufru smíchat s 500 μ l Tweenu), hematoxylin, 3,3' diaminobenzidin (DAB), destilovaná voda, bezvodé médium Entellan, amoniak, primární protilátka ERCC1 (ABCAM, 8A561), K - RAS (ABCAM, kat. č. 32185), FLNA (SANTA - CRUZ, kat. č. 32881), sekundární protilátka (Dako EnVision + Dual Link System - HRP) kat. č. K4061.

Příprava použitých roztoků:

Citrátový pufr - 9 ml roztoku 10mmol/l kyseliny citronové smíchat s 41 ml roztoku 10mmol/l dihydrátu citronanu sodného a do objemu 500 ml doplnit destilovanou vodou, zkontrolovat pH na 6,0 - 6,2.

Roztok 5% peroxidu vodíku - 15 ml 30% roztoku peroxidu vodíku smíchat s 75 ml destilované vody.

Zásobní roztok 10x Tris pufru - 61 g Tris rozpustit v 1 l destilované vody, případně upravit pH na hodnotu 7,6.

Roztok 0,5 mmol/l Tris pufru - 900 ml fyziologického roztoku smíchat se 100 ml 10x koncentrovaného Tris pufru.

Roztok 0,05 mol/l Tris pufru s 0,05% Tween - 1 l Tris smíchat s 500 μ l Tween.

3,3'-diaminobenzidin (DAB) - smíchat 1 ml SUBRS BUFFER s 20 μ l DAB chromogenu.

Čpavková voda - 5 ml amoniaku smíchat se 100 ml destilované vody.

4.3 Přístroje a vybavení laboratoře

Mikrovlnná trouba (HISTOS PRO RAPID MICROWAVE HISTOPROCESSOR), digestoř (Merci R3.33MF 10 - 3 MF 10 - 4), chladnička (ARDO GL34), mikroskop (Olympus CH 40RF200), pH metr (Orion 3 - star pH Benchtop), digitální časovač (Roth TR118), míchačka (MR Hei - Standard), laboratorní váhy (RADWAG PS 2100/C/2), přístroj pro tkáňovou array (Galileo TMA CK 3500), automatický barvicí přístroj (AUTOSTAINER - Ventana Benchmark), automatické pipety (100 - 1000 μ l) a špičky, skleněné kyvety, autoklávatelné

lahve, odměrné válce, nálevky, odpadní nádoba, buničina, pozitivně nabitá podložní skla, krycí skla, vlhká komůrka, 1,5ml mikrozskumavky, ochranné rukavice, fix Elite Pap Pen.

4.4 Tvorba TMA bloků

K tvorbě TMA bloků pomocí přístroje pro tkáňovou array byly použity vzorky nemalobuněčného karcinomu plic zalité v parafínu. Z jednoho donorového bloku byly odebrány a umístěny do recipientního bloku dva vzorky nádorové a jeden vzorek zdravé plicní tkáně pomocí duté jehly (4 mm). Pro správnou orientaci TMA bloku zde byly umístěny i vzorky dvou kontrolních tkání.

4.5 Imunohistochemická metoda

Prvním krokem imunoperoxidázové metody bylo nakrájení tkáně na mikrotomu. Získané řezy byly přemístěny na vodní hladinu k napínání a poté přichyceny na plusové sklo potažené poly-L-lysinem. Poté byly řezy inkubovány při teplotě 56 °C v termostatu do druhého dne.

Nakrájení řezů a jejich následné napínání provedly laborantky Ústavu klinické a molekulární patologie.

Po inkubaci následovalo odparafinování jednotlivých řezů tím způsobem, že sklíčka byla umístěna na 2 x 10 min do xylolu. Zajištění hydratace tkáně bylo provedeno jejich umístěním do alkoholové řady 96%, 80% a 70% na 5 min. Dále následoval 2x oplach destilovanou vodou.

Ke zkvalitnění vizualizace antigenů byla použita mikrovlnná stimulace, kdy byla sklíčka umístěna do citrátového pufru (pH 6,0) a zahřívána ve vodní lázni po dobu 15 min na teplotu 120 °C v mikrovlnné troubě. Poté byly vzorky chlazeny proudem studené vody po dobu 10 - 20 min. Následně byla sklíčka opláchnuta destilovanou vodou.

Vzhledem k tomu, že aktivita endogenní peroxidázy poskytuje falešně pozitivní reakce, bylo nutné ji blokovat umístěním sklíček na 15 min. do roztoku 5% peroxidu vodíku.

Po 15 min byly preparáty opláchnuty destilovanou vodou a promyty 2 x 5 min 1x Tris pufrem (pH 7,5) a 5 min. roztokem 1x Tris pufru a Tweenu.

Následovala aplikace 100 µl zředěné primární protilátky, viz tabulka I. Inkubace probíhala při pokojové teplotě ve vlhké komůrce 1h.

Po promytí preparátů 2 x 3 min 1x Tris pufrem (pH 7,5) a 3 min roztokem 1x Tris pufru a Tweenu, bylo napipetováno 100 µl sekundární protilátky (kozí anti - myší,

anti - králičí imunoglobuliny konjugované s polymerem křenové peroxidázy). Doba inkubace byla 1 h při pokojové teplotě.

Poté následovalo opět promytí 2 x 3 min 1x Tris pufrem (pH 7,5) a 3 min roztokem 1x Tris pufru a Tweenu.

Dále bylo naaplikováno 100 µl roztoku chromogenu DAB. K vizualizaci buněčných jader byl použit na 2 min hematoxylin.

Následoval oplach tekoucí vodou, poté čpavkovou vodou a opět tekoucí vodou.

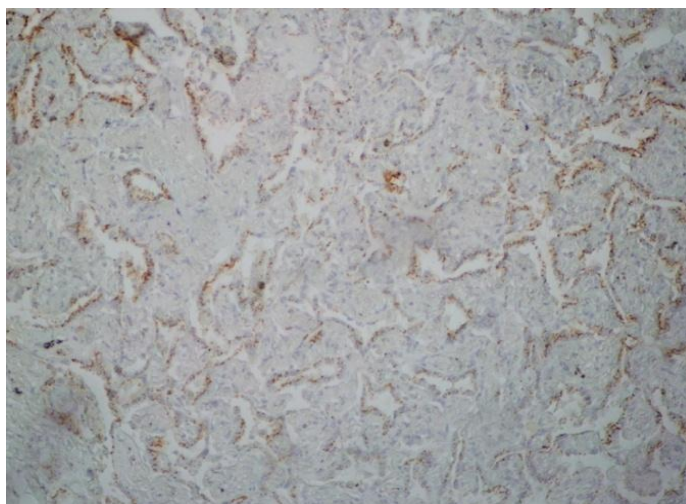
Odvodnění preparátů bylo provedeno v 96% ethanolu, acetonu, aceton - xylenu a poté 2x v xylenu, vždy po 3 min. Na závěr byla provedena montáž do bezvodého média Entellan.

Tab. I Použité primární protilátky

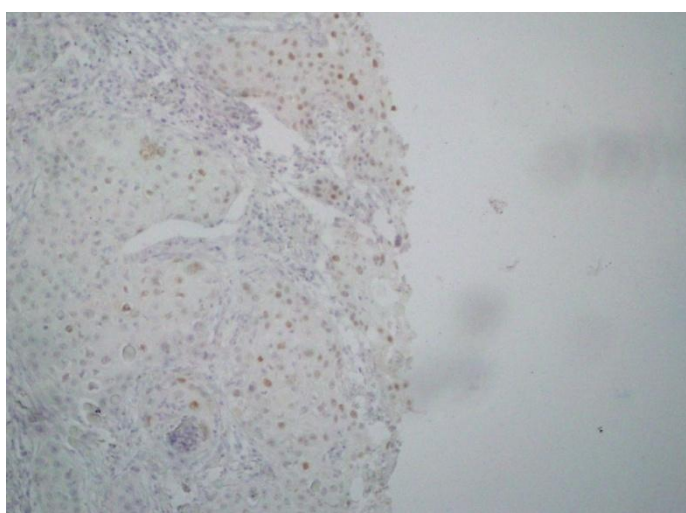
Protein	Typ protilátky	Klonalita	Ředění
K - RAS	anti - myší	monoklonální	1:50
ERCC1	anti - myší	monoklonální	1:50
FLNA	anti - myší	monoklonální	1:50

5. Výsledky

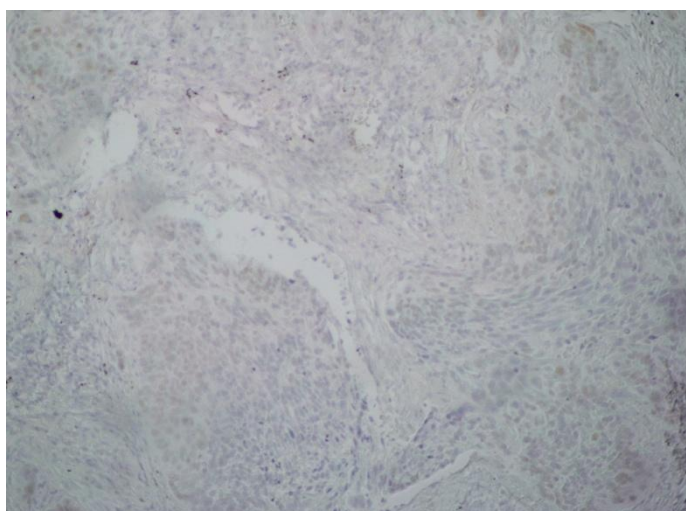
Expresí proteinů FLNA, ERCC1 a mutačního statusu K - RAS byla detekována pomocí nepřímé imunohistochemické metody na souboru 35 pacientů, jimž byl diagnostikován NSCLC a v rámci terapie jim byla aplikována neoadjuvantní chemoterapie. Expresí vybraných proteinů byla stanovena pomocí H - indexu, který odpovídá součinu stupně pozitivnosti a procent pozitivních buněk ve vzorku při celkovém zvětšení 200x. Stupeň pozitivnosti (slabá pozitivita - 1, střední - 2, vysoká - 3) byl hodnocen na základě intenzity hnědého zbarvení produktu oxidace DAB ve srovnání s kontrolní (zdravou) tkání. Statistická analýza výsledků byla provedena pomocí počítačového softwaru STATISTICA 2. V rámci zpracování výsledků byl porovnáván grading tumoru histologicky diferencovaný s expresí FLNA, ERCC1, K - RAS pomocí Mann - Whitney neparametrického testu. Hodnoty $p \geq 0,5$ jsou považovány za signifikantní. Ze získaných výsledků tedy nebyla zjištěna žádná signifikantní korelace mezi expresí FLNA, ERCC1, K - RAS a stupněm histologické diferenciace nádoru (FLNA $p = 0,067$, ERCC1 $p = 0,332$, K - RAS $p = 0,357$). Expresí proteinů FLNA, ERCC1 a K - RAS s ohledem na diferenciaci tumoru nevykazovala signifikantní vztah mezi dobře a špatně diferencovaným NSCLC (Obr. č. 12). Dále také nebyl zjištěn rozdíl expresí daných proteinů s ohledem na klasifikaci T (velikost tumoru) (Obr. č. 13). Rovněž nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly mezi expresí vybraných proteinů u pacientů s výskytem metastáz v regionálních uzlinách a pacientů bez rozvoje metastáz (Obr. č. 14). Totéž tvrzení platilo i u pacientů, kteří již měli vzdálené metastázy (Obr. 15). Také nebyly zjištěny výrazné korelace mezi expresí K - RAS, filaminu A, ERCC1 s přežitím a intervalem bezpříznakového období (Obr. č. 16 - 22).



Obrázek č. 4 Vizualizace imunohistochemické exprese ERCC1.
Adenokarcinom. Perinukleární pozitivita. Zvětšení 100x.



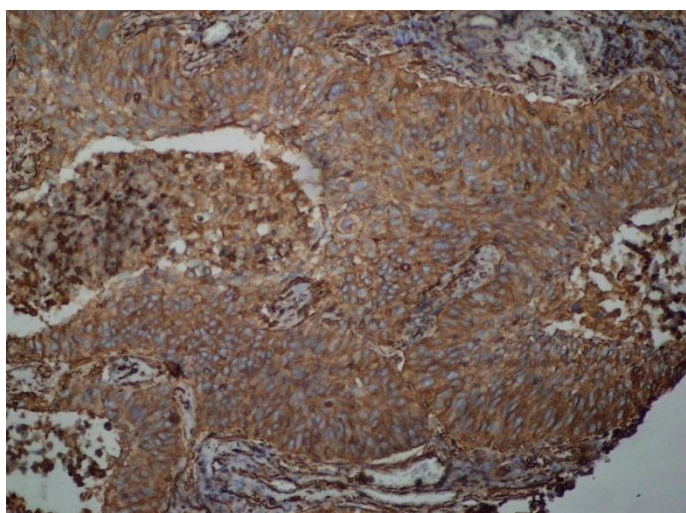
Obrázek č. 5 Vizualizace imunohistochemické exprese ERCC1.
Spinocelulární karcinom. Nukleární pozitivita. Zvětšení 100x.



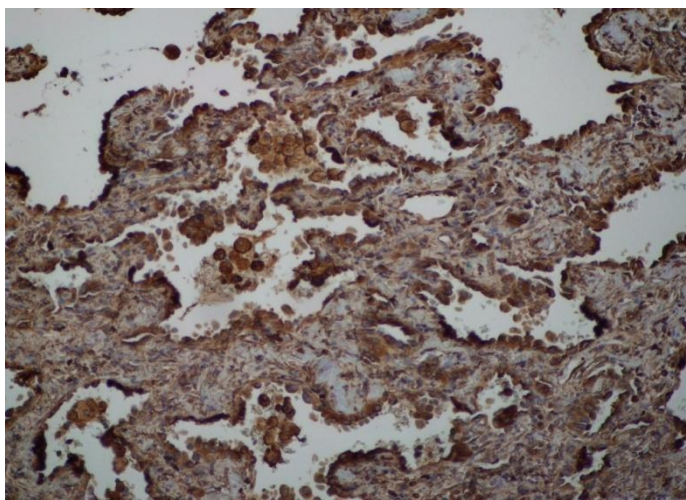
Obrázek č. 6 Vizualizace imunohistochemické exprese ERCC1.
Velkobuněčný karcinom. Nukleární pozitivita. Zvětšení 100x.



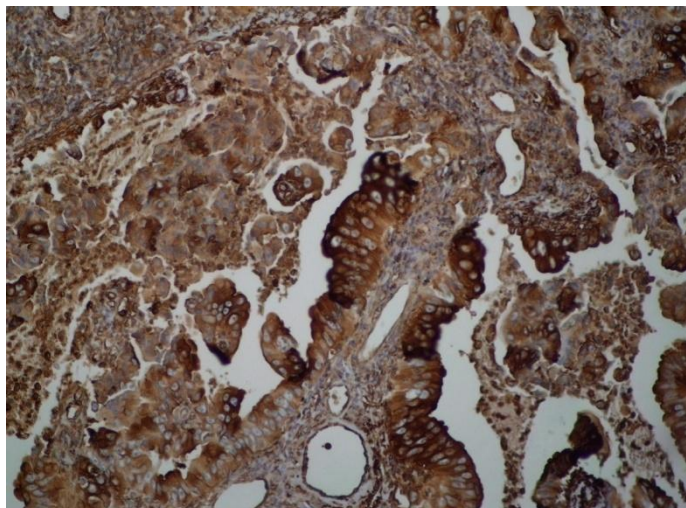
Obrázek č. 7 Vizualizace imunohistochemické exprese K - RAS. Spinocelulární karcinom. Nukleární pozitivita. Zvětšení 100x.



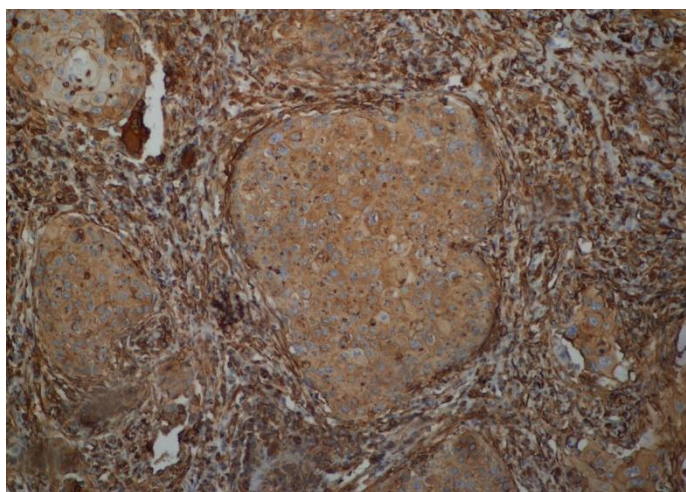
Obrázek č. 8 Vizualizace imunohistochemické exprese FLNA. Spinocelulární karcinom. Cytoplazmatická pozitivita. Zvětšení 100x.



Obrázek č. 9 Vizualizace imunohistochemické exprese FLNA. Lepidický adenokarcinom. Cytoplazmatická pozitivita. Zvětšení



Obrázek č. 10 Vizualizace imunohistochemické exprese FLNA.
Lepidický adenokarcinom. Cytoplazmatická pozitivita. Zvětšení 100x.



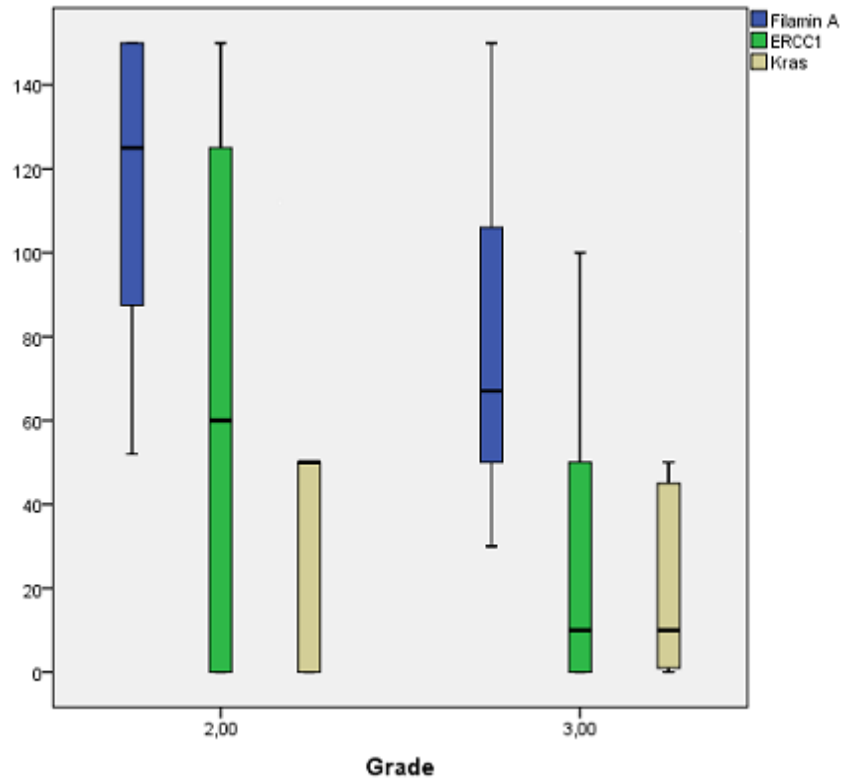
Obrázek č. 11 Vizualizace imunohistochemické exprese FLNA.
Velkobuněčný karcinom. Cytoplazmatická pozitivita. Zvětšení 100x.

Tab. II Charakteristika statistického testu Mann - Whitney část 1.

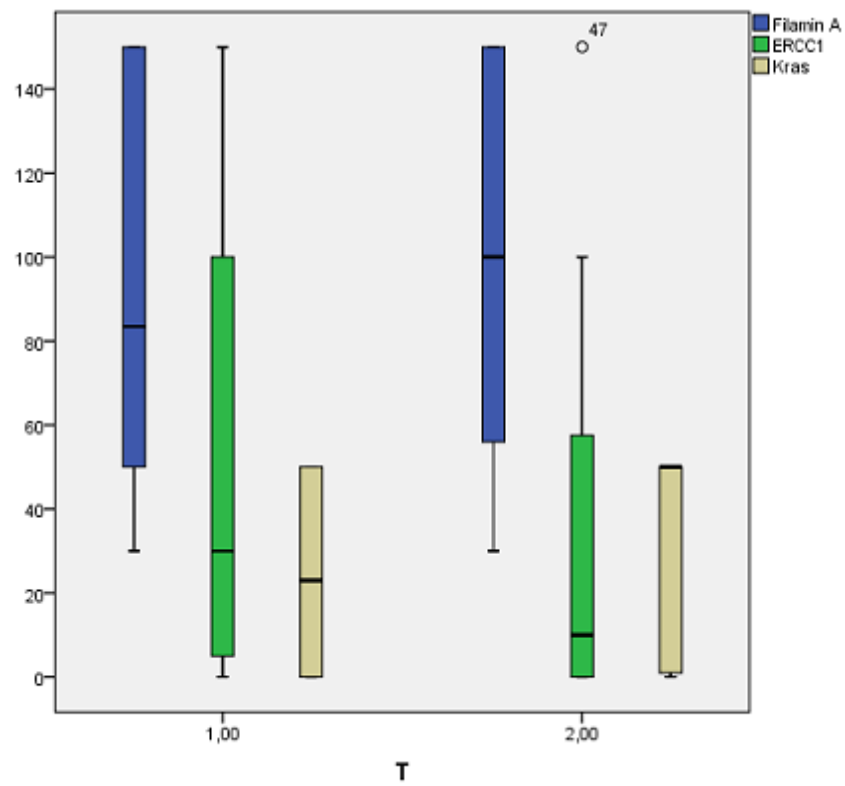
Case Processing Summary							
	Grade	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Filamin A	2	8	57,10%	6	42,90%	14	100,00%
	3	11	33,30%	22	66,70%	33	100,00%
ERCC1	2	8	57,10%	6	42,90%	14	100,00%
	3	11	33,30%	22	66,70%	33	100,00%
K - RAS	2	8	57,10%	6	42,90%	14	100,00%
	3	11	33,30%	22	66,70%	33	100,00%

Tab. III Charakteristika statistického testu Mann - Whitney část 2.

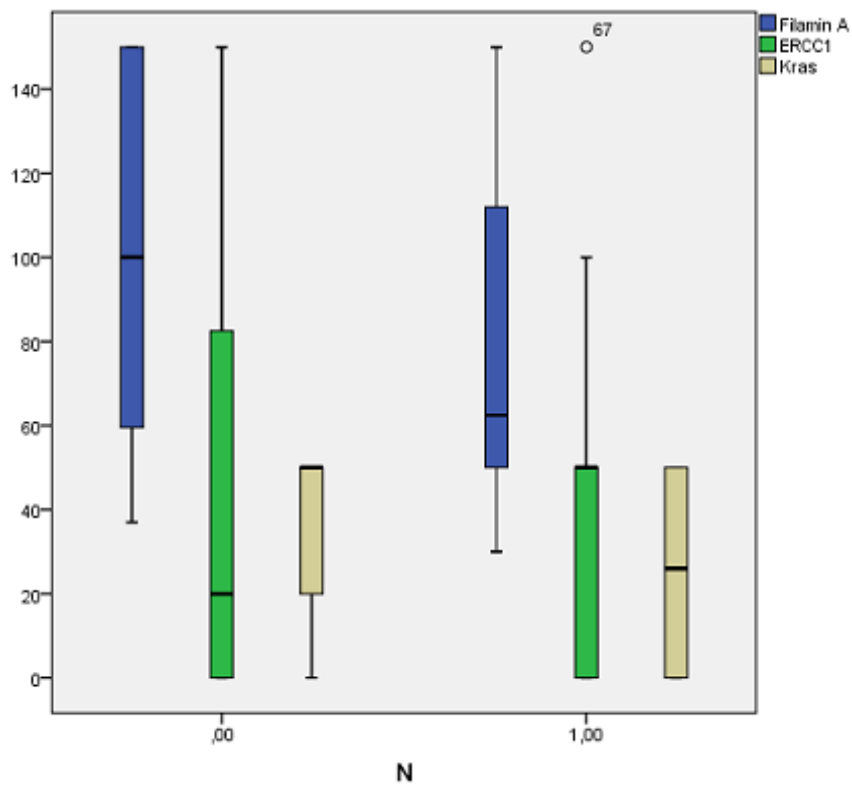
Ranks			
	Grade	N	Mean Rank
Filamin A	2	9	13
	3	12	9,5
	Total	21	
ERCC1	2	8	14,38
	3	16	11,56
	Total	24	
K - RAS	2	9	11,22
	3	11	9,91
	Total	20	



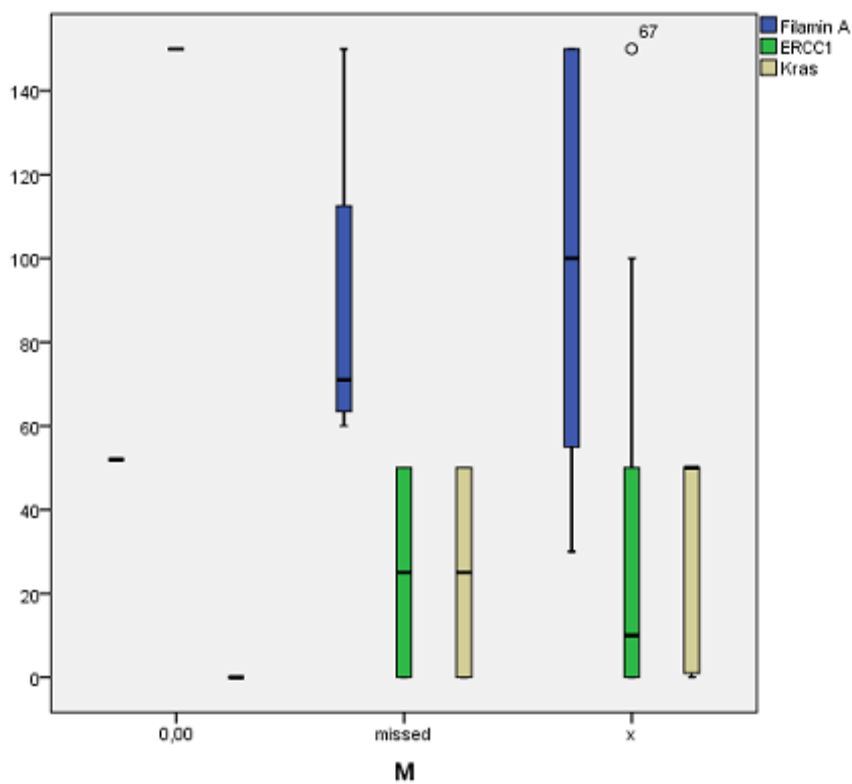
Obr. č. 12 Stanovení exprese vybraných proteinů v dobře a špatně diferencovaných tumorech.



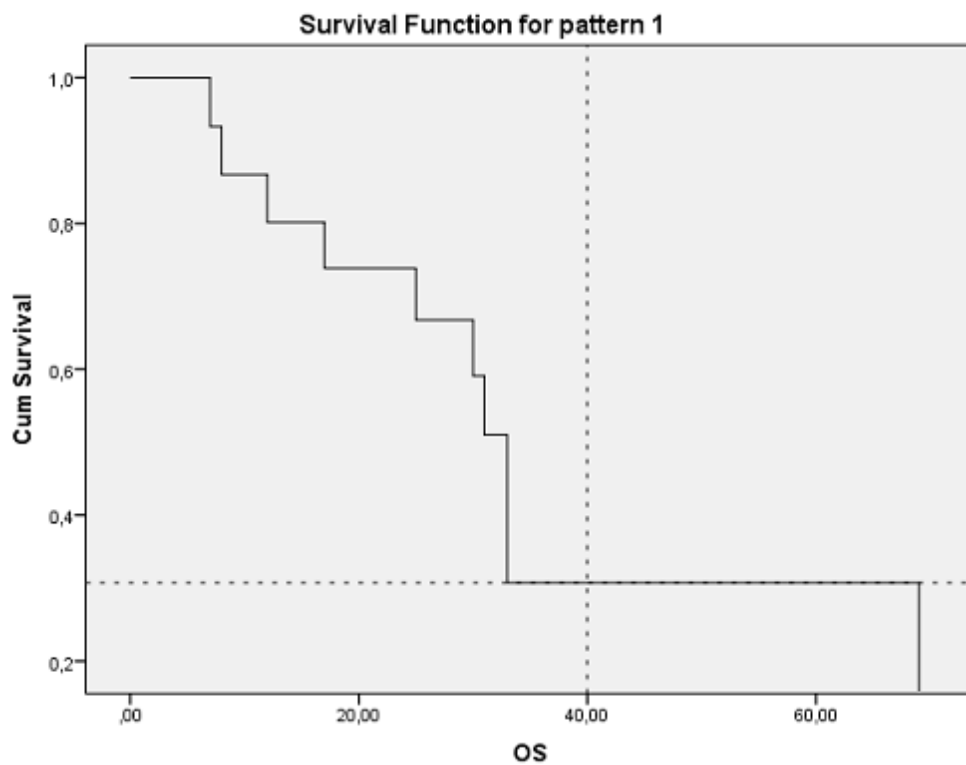
Obr. č. 13 Stanovení exprese vybraných proteinů s ohledem na klasifikaci T (velikost tumoru).



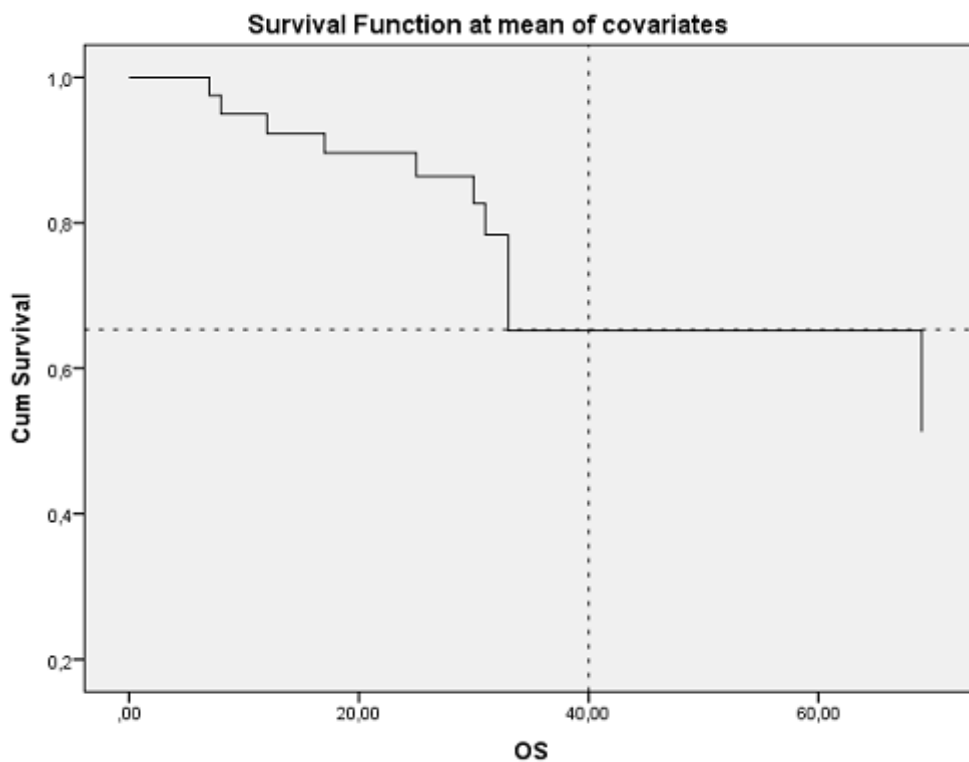
Obr. č. 14 Stanovení exprese vybraných proteinů u pacientů s ohledem na výskyt metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.



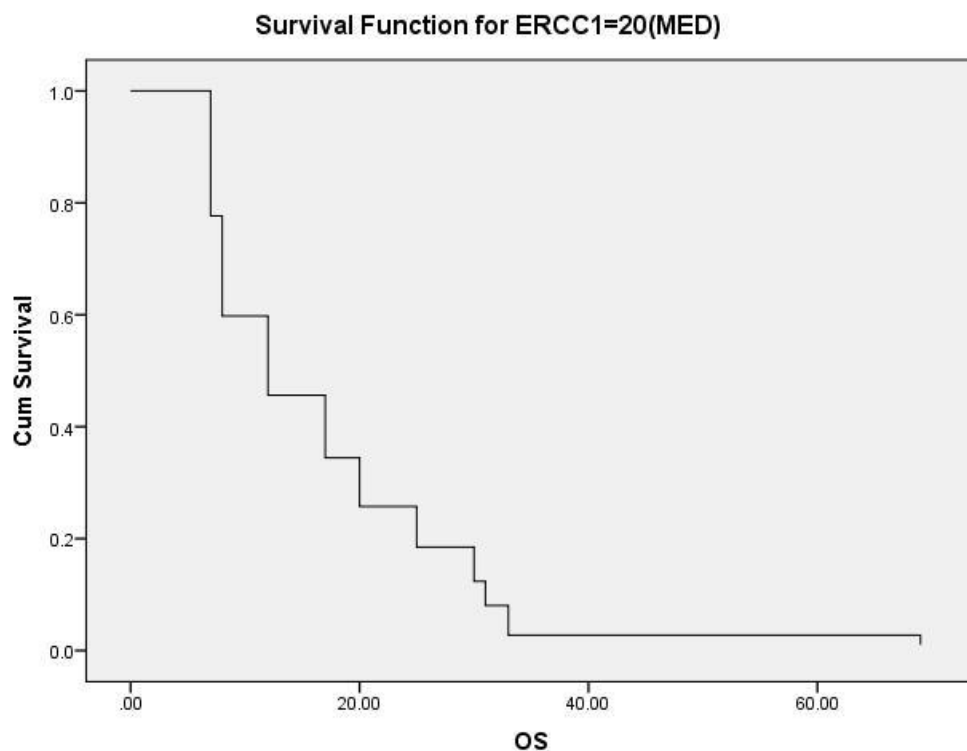
Obr. č. 15 Stanovení exprese vybraných proteinů u pacientů s ohledem na výskyt vzdálených metastáz.



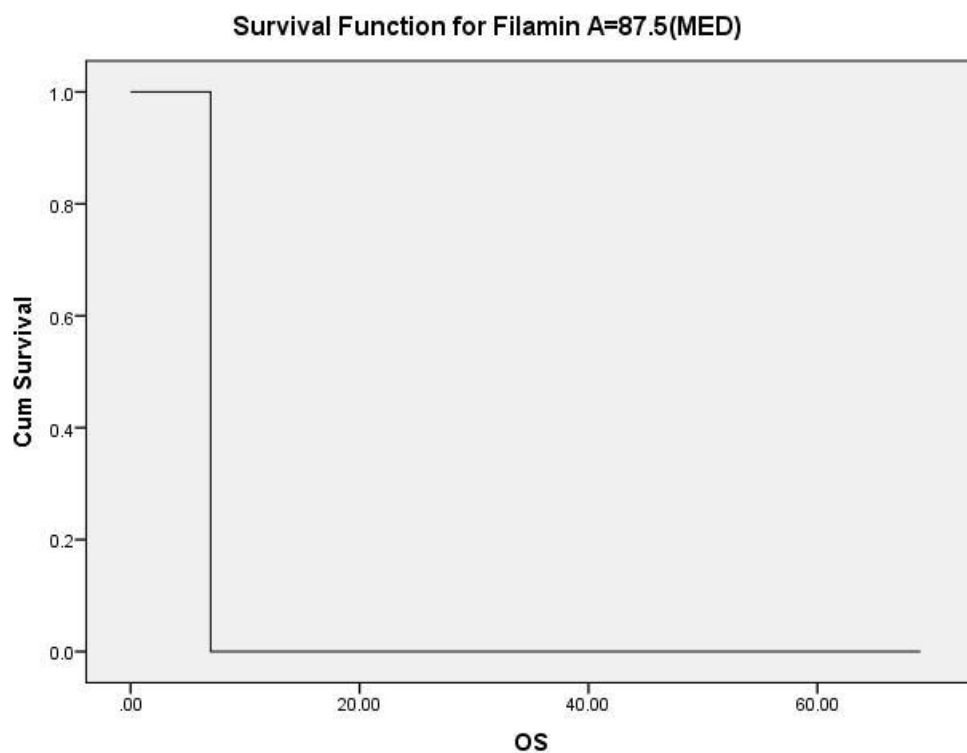
Obr. č. 16 Korelace mezi expresí K - RAS a celkovým přežitím pacientů v měsících.



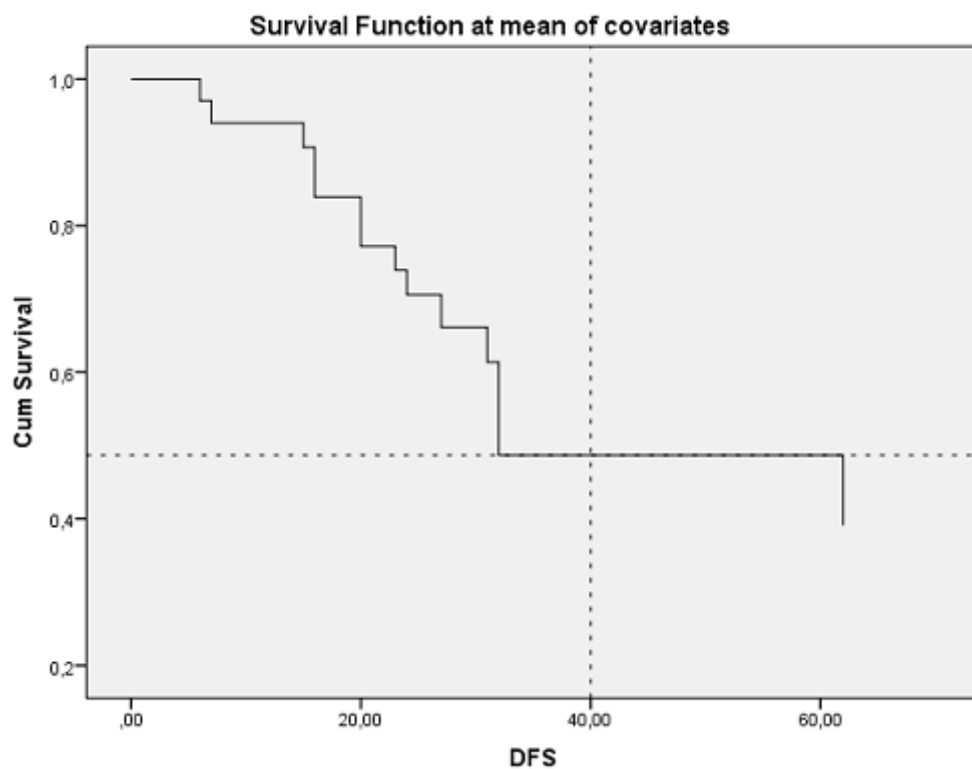
Obr. č. 17 Korelace mezi expresí K - RAS a celkovým přežitím pacientů v měsících.



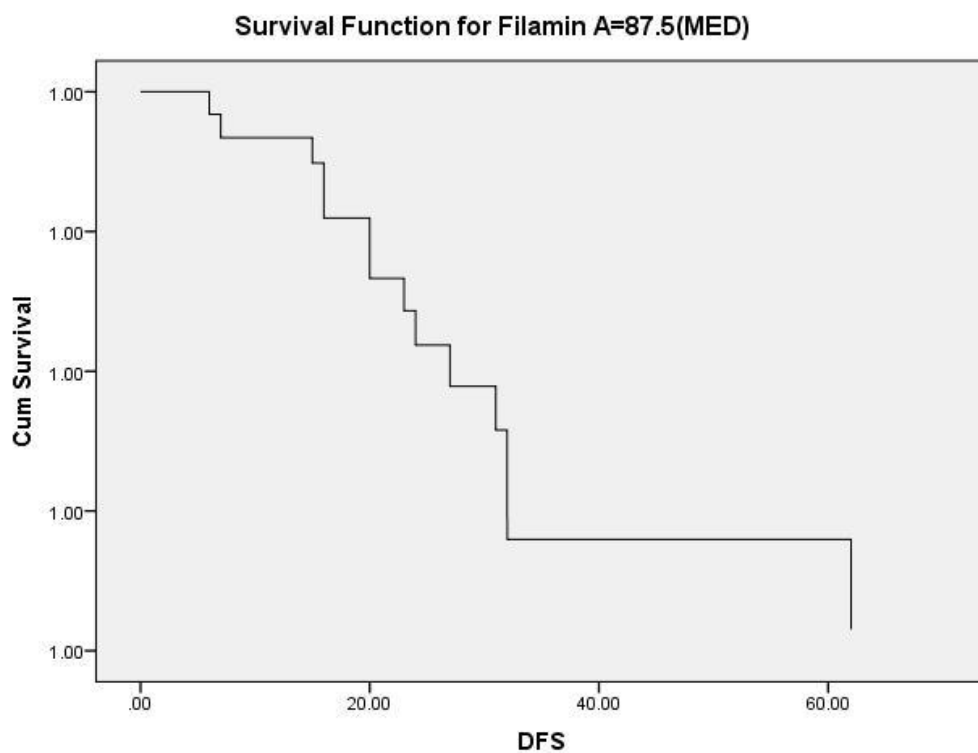
Obr. č. 18 Korelace mezi expresí ERCC1 a celkovým přežitím pacientů.



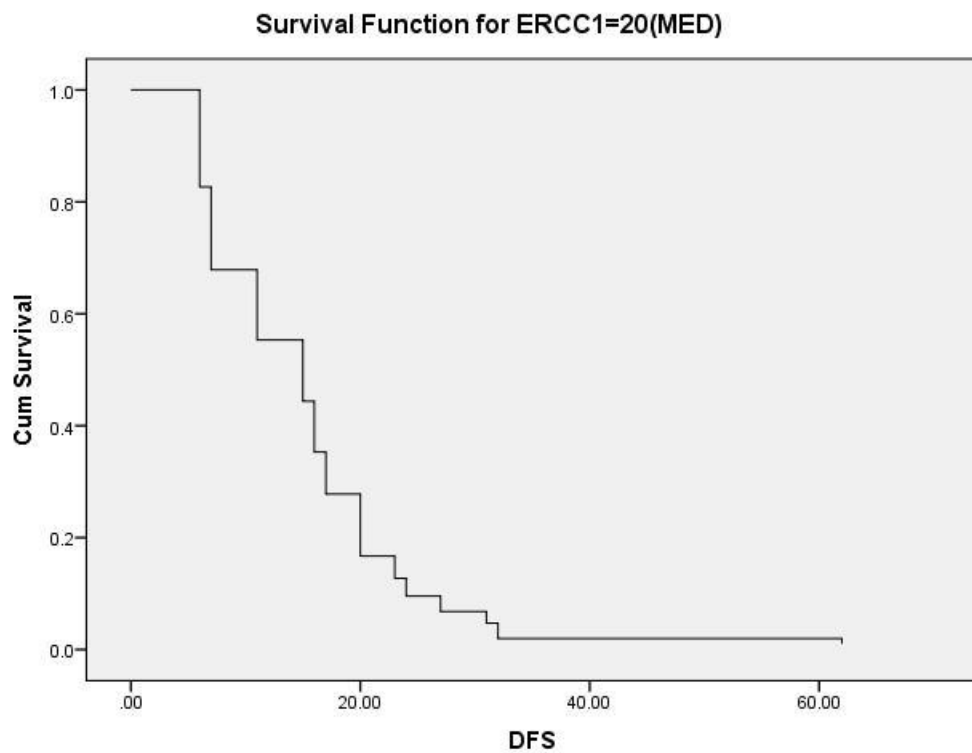
Obr. č. 19 Korelace mezi expresí FLNA a celkovým přežívání pacientů.



Obr. č. 20 Korelace mezi expresí K - RAS a intervalem bezpříznakového období.



Obr. č. 21 Korelace mezi expresí FLNA a intervalem bezpříznakového období.



Obr. č. 22 Korelace mezi expresí ERCC1 a intervalem bezpříznakového období.

6. Diskuze

Cílem práce byla detekce imunohistochemické exprese ERCC1, K - RAS a FLNA ve tkáni nemalobuněčného karcinomu plic u pacientů s neadjuvantní chemoterapií, a zjistit korelaci získaných výsledků se stupněm histologické diferenciaci nádoru, velikostí tumoru, výskytem metastáz v regionálních uzlinách a vzdálených metastáz. V případě histologické diferenciaci NSCLC nebyla zjištěna žádná korelace s expresí proteinu ERCC1, což se shoduje s výsledky studií autorů Seyhan *et al.*, 2011, Rui *et al.*, 2011, Okuda *et al.*, 2008, Zheng *et al.*, 2007. Ovšem Simson *et al.*, 2005 popsali vyšší expresi ERCC1 v adenokarcinomu ve srovnání s ostatními histologickými podtypy NSCLC. Tento rozdíl může být způsoben použitím odlišné metody detekce exprese, kdy v případě studie Simsona *et al.* byla použita real - time PCR a v případě ostatních imunohistochemická metoda. Dále nebyl zjištěn rozdíl exprese tohoto proteinu u pacientů s metastázemi v regionálních uzlinách a pacientů bez metastáz, což také potvrzuje studie Seyhana *et al.*, 2011 a Yana *et al.*, 2013.

V případě proteinu K - RAS skupina Liang *et al.*, 2011 zjišťovala jeho expresi u pacientů s adenokarcinomem a spinocelulárním karcinomem. V případě spinocelulárního karcinomu byla jeho exprese výrazně vyšší. Výsledek se neshoduje s výsledky této práce, což může být opět způsobeno použitím rozdílné metody (RT - PCR). Tato výzkumná skupina také zaznamenala korelaci mezi expresí K - RAS a velikostí tumoru. V rámci této práce naopak nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi jeho expresí a velikostí tumoru, což potvrzuje i studie Sunaga *et al.*, 2011. Vzhledem k tomu, že týmy Sunaga *et al.*, 2011 a Liang *et al.*, 2011 použili k detekci exprese K - RAS stejnou metodu (RT - PCR), jejich výsledky se mohou lišit díky různému souboru pacientů. Vztah exprese K - RAS a intervalem celkového přežití pacientů a intervalem bezpříznakového období se zabývala skupina Mellema *et al.*, 2013, nicméně nebyla zjištěna žádná korelace, což se shoduje se získanými výsledky této práce.

Studie Uramota *et al.*, 2010 pomocí imunohistochemické metody ukázala, že exprese FLNA nekoreluje s velikostí tumoru, histologickým podtypem a výskytem metastáz v regionálních uzlinách a také s celkovým pětiletým přežíváním pacientů, což se shoduje se získanými výsledky této práce.

7. Závěr

Cílem této bakalářské práce byla detekce exprese proteinů ERCC1, FLNA a K - RAS u nemalobuněčného karcinomu plic. V teoretické části byla zpracována literární rešerše zaměřená na problematiku mnohočetné lékové rezistence, mechanismů oprav DNA a na souhrn poznatků o vybraných proteinech a zakládání metastáz. V rámci experimentální části byla provedena tvorba tkáňových mikroarrayí a vlastní imunohistochemická detekce stanovených proteinů. Z výsledků statistické analýzy nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi expresí ERCC1, FLNA a K - RAS a histologickými subtypy, stupněm diferenciací NSCLC, velikostí tumoru, výskytem metastáz v regionálních uzlinách a vzdálených metastáz. Rovněž nebyla zjištěna korelace exprese proteinů s intervalem bezpříznakového období a celkovým přežíváním pacientů.

8. Literatura

ARORA, A., SCHOLAR, E. M. (2005): Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (315): 971 - 979

BEAUMMONT, P. O., MOORE, M. J., AHMAD, K., PAYNE, M. M., LEE, CH., RIDDICK, D. S. (1998): Role of Gluthation S-Transferases in the Resistance of Human Colon Cancer Cell Lines to Doxorubicin. *Cancer Research* (58): 947 - 955

DE BOER, J., HOEIJMARKERS, J. H. J. (2000): Nukleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* (21): 453 - 460

COLE, S. P. C., DEELEY, R. G. (1998): Multidrug resistance mediated by the ATP - binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* (20): 931 - 940

DALTON, W. S., SCHEPER, R. J. (1999): Lung Resistance - Related Protein: Determining Its Role in Multidrug Resistance. *Journal of the National Cancer Institute* (91): 1604 - 1605

DAS, M., JONATHAN W. RIESS, J. W., FRANKEL, P., SCHWARTZ, E., BENNIS, R., HSIEH, H. B., LIU, X., LY, J. C., ZHOU, L., NIEVA, J. J., WAKELEE, H. H., BRUCE, R. H. (2012): ERCC1 expression in circulating tumor cells (CTCs) using a novel detection platform correlates with progression - free survival (PFS) in patients with metastatic non - small - cell lung cancer (NSCLC) receiving platinum chemotherapy. *Lung Cancer* (77): 421 - 426

DENG, W., LOPEZ - CAMACHO, C., TANG, J - Y, MENDOZA - VILLANUEVA, D., MAYA -MENDOZA, A., JACKSON, D. A, SHORE, P. (2012): Cytoskeletal protein filamin A is a nucleolar protein that suppresses ribosomal RNA gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (109): 1524 - 1529

DEPEILLE, P., CUQ, P., MARY, S. PASSAGNE, I., EVRARD, A., CUISSOL, D., VIAN, L. (2004): Glutathione S-Transferase M1 and Multidrug Resistance Protein 1 Act in Synergy to Protect Melanoma Cells from Vincristine Effects. *Molecular Pharmacology* (65): 897 - 905

EBERHARD, D. A., JOHNSON, B. E., AMLER, L. C., GODDARD, A. D., HELDENS, S. L., HERBST, R. S., INCE, W. L., JÄNNE, P. A., JANUARIO, T., JOHNSON, D. H., KLEIN, P., MILLER, V. A., OSTLAND, M. A., RAMIES, D. A., SEBISANOVIC, D., STINSON, J. A., ZHANG, Y. R., SESHAGIRI, S., HILLAN, K. J. (2005): Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non - small - cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *Journal of clinical oncology* (23): 5900 - 5909

ELSAWY, W. H., TALEB, F. M. A., KADER, M. A., OMRAN, A. A., GHARIB, A. F. (2002): Prognostic Significance of Lung Resistance Protein (LRP) and Multidrug Resistance Protein (MRP1) in Patients with Diffuse Large B - Cell Lymphomas (DLBCL). *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* (14): 101 - 110

FARHAT, F. S., HOUHOU, W. (2013): Targeted therapies in non-small cell lung carcinoma: what have we achieved so far? *Therapeutic Advances in Medical Oncology* (5): 249 - 270

FENG, Y., WALSH, CH. A. (2004): The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nature Cell Biology* (6): 1034 - 1038

GAO, M., YAMAZAKI, M., LOE, D. W., WESTLAKE, CH. J., GRANT, C. E., COLE, S. P. C., DEELEY, R. G. (1998): Multidrug Resistance Protein. *The Journal of Biological Chemistry* (273): 10733 - 10740

HU, J., CHOI, J. H., GADDAMEEDHI, S., KEMP, M. G., REARDON, J. T., SANCAR, A. (2013): Nucleotide excision repair in human cells: fate of the excised oligonucleotide carrying DNA damage in vivo. *The Journal of biological chemistry* (288): 20918 - 20926

HUNT, J. D., STRIMAS, A., MARTIN, J. E., EYER, M., HADDICAN, M., LUCKETT, B. G., RUIZ, B., AXELRAD, T. W., BACKES, W. L., FONTHAM, E. T. (2002): Differences in KRAS mutation spectrum in lung cancer cases between African Americans and Caucasians after occupational or environmental exposure to known carcinogens. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* (11): 1405 - 1412

HUNTER, K. W., CRAWFORD, N. P., ALSARRAJ, J. (2008): Mechanisms of metastasis. Breast Cancer Research (10): Suppl 1:S2

CHRISTMANN, M., TOMICIC, M. T., ROOS, W. P., KAINA, B. (2003): Mechanisms of human DNA repair: an update. Toxicology (193): 3 - 34

JIANG, X., YUE, J., LU, H., CAMPBELL, N., YANG, Q., LAN, S., HAFFTY, B. G., YUAN, CH., SHEN, Z. (2013): Inhibition of Filamin - A Reduces Cancer Metastatic Potential. International Journal of Biological Sciences (9): 67 - 77

KARAHALIL, B., BOHR, V. A., DE SOUZA - PINTO, N. C. (2010): Base excision repair activities differ in human lung cancer cells and corresponding normal controls. Anticancer research (30): 4963 - 4971

KARACHALIOU, N., MAYO, C., COSTA, C., MAGRÍ, I., GIMENEZ-CAPITAN, A., MOLINA-VILA, M. A., ROSELL, R. (2013): KRAS Mutations in Lung Cancer. Clinical Lung Cancer (14): 205 - 214

KIM, S. Y., HA, H. K., PARK, S. W., KANG, J., KIM, K. W., LEE, S. S., PARK, S., H., KIM, A. Y. (2009): Gastrointestinal metastasis from primary lung cancer: CT findings and clinicopathologic features. American Journal of Roentgenology (193): 197 - 201

KLEIN, J. Chirurgie karcinomu plic. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2006, s. 24 - 53. ISBN 8024713845

KOUSALOVÁ, L., BARANOVÁ, J., ANZENBACHER, P. (2003): Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 - Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. Klinická farmakologie a farmacie (17): 151 - 157

KREJCI, L., ALTMANNOVA, V., SPIREK, M., ZHAO, X. (2012): Homologous recombination and its regulation. Nucleic Acids Research (40): 5795 - 5818

KRISHNAKUMAR, S., MALLIKARJUNA, K., DESAI, N., MUTHIALU, A., VENKATESAN, N., SUNDARAM, A., KHETAN, V., SHANMUGAM, M. P. (2004): Multidrug resistant proteins: P-glycoprotein and lung resistance protein expression in retinoblastoma. *The British journal of ophthalmology* (88): 1521 - 1526

DE LAAT, W. L., JASPERS, N. G. J., HOEIJMAKERS1, J. H. J. (1999): Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes and Development* (13): 768 - 785

LI, G. M. (2008): Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* (18): 85 - 98

LI, G. M. (2013): Decoding the histone code: Role of H3K36me3 in mismatch repair and implications for cancer susceptibility and therapy. *Cancer Research* (73): 6379 - 6383

LI, X., HEYER, W. D. (2008): Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research* (18): 99 - 113

LIU, Y., WILSON, S. H. (2012): DNA base excision repair: a mechanism of trinucleotide repeat expansion. *Trends in biochemical sciences* (37): 162 - 172

LYNCH, T., PRICE, A. (2007): The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. *American Family Physician* (76): 391 - 396

MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J. *Patologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2004, s. 194. ISBN 8024707853

MIRI, R., MEHDIPOUR, A. (2008): Dihydropyridines and atypical MDR: A novel perspective of designing general reversal agents for both typical and atypical MDR. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (16): 8329 - 8334

MUNFUS - MCCRAY, D., HARADA, S., ADAMS, CH., ASKIN, F., CLARK, D., GABRIELSON, E., LI, Q. K. (2011): EGFR and KRAS mutations in metastatic lung adenocarcinomas. *Human Pathology* (42): 1447 - 1453

NOSKOVÁ, V., HAJDÚCH, M., MIHÁL, V., CWIERTKA, K. (2000a): Mechanismy mnohočetné lékové rezistence. I. Typická MDR. *Klinická onkologie* (2): 4 - 9

NOSKOVÁ, V., HAJDÚCH, M., MIHÁL, V., CWIERTKA, K. (2000b): Mechanismy mnohočetné lékové rezistence. II. Atypická MDR. *Klinická onkologie* (2): 10 - 17

OLAUSSEN, K. A., DUNANT, A., FOURET, P., BRAMBILLA, E., ANDRÉ, F., HADDAD, V., TARANCHON, E., FILIPITS, M., PIRKER, R., POPPER, H. H., STAHEL, R., SABATIER, L., PIGNON, J. - P., TURSZA, T., LE CHEVALIER, T., SORIA, J. - CH. (2006): DNA Repair by ERCC1 in Non-Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *The New England Journal of Medicine* (355): 983 - 991

OLSEN, A. K., BJØRTUFT, H., WIGER, R., HOLME, J., SEEBERG, E., BJØRÅS, M., BRUNBORG, G. (2001): Highly efficient base excision repair (BER) in human and rat male germ cells. *Nucleic acids research* (29): 1781 - 1790

PECHANDOVÁ, K., BUZKOVÁ, H., SLANAŘ, O., PERLÍK, F. (2006): Efluxní transmembránový transportér - P - glykoprotein. *Klinická biochemie a metabolismus* (14): 196 - 201

RASHEED, Z. A., RUBIN, E. H. (2003): Mechanisms of resistance to topoisomerase I targeting drugs. *Oncogene* (22): 7296 - 7304

RIDDICK, D. S., LEE, CH., RAMJI, S., CHINJE, E. C., COWEN, R. L., WILLIAMS, K. J., PATTERSON, A. V., STRATFORD, I. J., MORROW, CH. S., TOWNSEND, A. J., JOUNAIDI, Y., CHEN, CH. - S., SU, T., LU, H., SCHWARTZ, P. S., WAXMAN, D. J. (2005): Cancer Chemotherapy and Drug Metabolism. *Drug Metabolism and disposition* (33): 1083 - 1096

RIELY, G. J., MARKS, J., PAO, W. (2009): KRAS Mutations in Non - Small Cell Lung Cancer. *Proceedings of The American Thoracic Society* (6): 201 - 205

RYBAROVA, S., BOOR, A., JURKOVIC, I., KOCAN, P. (2003): Expression of LRP - lung resistance - related protein in the normal colorectal mucosa and in colorectal carcinoma. Bratislavské lekárske listy (104): 179 - 183

SUKHANOVA, M. V., KHODYREVA, S. N., LEBEDEVA, N. A., PRASAD, R., SAMUEL WILSON, S. H., LAVRIK, O. I. (2005): Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase β and poly (ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity. Nucleic Acids Research (33): 1222 - 1229

ŠKARDA, J., HAJDÚCH, M., BOUCHAL, J., NOSKOVÁ, V., LUDKOVÁ, A., DŽUBÁK, P., TICHÝ, T., KLEIN, J., KOLEK, V., KOLÁR, Z., KRÁL, V., MIHAL, V. (2000): Vzťah medzi expresiou proteínov asociovaných s liekovou rezistenciou a výsledkami in vitro cytotoxického MTT testu u pacientov s NSCLC. Klinická onkologie (2): 55 - 57

THAKUR, D. S. (2011): Topoisomerase II Inhibitors in Cancer Treatment. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology (3): 1173 - 1181

TSUJI, K., WANG, Y. H., TAKANASHI, M., ODAJIMA, T., LEE, G. A., SUGIMORI, H., MOTOJI, T. (2012): Overexpression of lung resistance - related protein and P-glycoprotein and response to induction chemotherapy in acute myelogenous leukemia. Hematology reports (4): e18

UYBICO, S. J., WU, C. C., SUH, R. D., LE, N. H., BROWN, K., KRISHNAM, M. S. (2010): Lung Cancer Staging Essentials: The New TNM Staging System and Potential Imaging Pitfalls. Radiographics (30): 1163 - 1181

WANG, Q., ZAMBETTI, P. G., SUTTLE, P. D. (1997): Inhibition of DNA Topoisomerase II α Gene Expression by the p53 Tumor Suppressor. Molecular and Cellular Biology (17): 389 - 397

WEI, Q., FRAZIER, M. L., LEVIN B. (2000): DNA repair: a doubleedged sword. Journal of the National Cancer Institute (92): 440 - 441

WINNARD, P. T., PATHAK, A. P., DHARA, S., CHO, S. Y., RAMAN, V., POMPER, M. G. (2008): Molecular Imaging of Metastatic Potential. *The Journal of Nuclear Medicine* (49): 96 - 112

WHITSETT, T. G., INGE, L. J., DHARUV, H. D., CHEUNG, P. Y., WEISS, G. J., BREMNER, R. M., WINKLES, J. A., TRAN, N. L. (2013): Molecular determinants of lung cancer metastasis to the central nervous system. *Translational Lung Cancer Research* (2): 273 - 283

YAMASHITA, F., AZUMA, K., YOSHIDA, T., YAMADA, K., KAWAHARA, A., HATTORI, S., TAKEOKA, H., ZAIZEN, Y., KAWAYAMA, T., KAGE, M., HOSHINO, T. (2013): Prognostic Value of EGFR Mutation and ERCC1 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Undergoing Platinum-Based Chemotherapy. *Public Library of Science one.* (8): e71356

YUE, J., HUHN, S., SHEN, Z. (2013): Complex roles of filamin - A mediated cytoskeleton network in cancer progression. *Cell and Bioscience* (3): 7

ZAMAN, G. J. R., FLENS, M. J., VAN LEUSDEN, M. R., DE HAAS, M., MÜLDER, H. S., LANKELMA, J., PINEDO, H. M., SCHEPER, R. J., BAAS, F., BROXTERMAN, H. J., BORST, P. (1994): The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug - efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (91): 8822 - 8826

ZHANG, W., GUO, N., YU, CH., WANG, H., ZHANG, Y., XIA, H., YU, J., LU, J. (2012): Differential expression of ERCC-1 in the primary tumors and metastatic lymph nodes of patients with non - small cell lung cancer adenocarcinoma. *Tumor Biology* (33): 2209 - 2216

ZHENG, Z., CHEN, T., LI, X., HAURA, E., SHARMA, A., BEPLER, G. (2007): DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *The New England Journal of Medicine* (356): 800 - 808

Internetové zdroje:

<http://www.svod.cz/?sec=aktuality>

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_005106.2

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2067>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2316>

9. Seznam použitých zkratek

A	adenin
ABC	ATP Binding Cassette
ABD	doména vázající aktin
AP - místa	apurinové nebo apyrimidinové místo
at - MDR	atypická mnohočetná léková rezistence
ATP	adenosintrifosfát
BER	bázová excizní oprava
C	cytosin
CK	cytokeratin
CPDs	cyklobutanové pyrimidinové dimery
CTCs	cirkulující nádorové buňky
CYP450	cytochrom P450
DDB	<i>damage DNA binding protein</i>
DFS	<i>disease free survival</i> - přežívání bez projevů nemoci
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dRP	deoxyribózařfosfátové skupina
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> - receptor epidermálního růstového faktoru
ERCC1	<i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, group 1</i>
FEN - 1	<i>flap endonuclease 1</i>
FLNA	filamin A
G	guanin
GSTs	glutathion-S-transferázy
GTP	guanosintrifosfát
H - RAS	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
HJ	Holidayův spoj
hMLH	lidský homolog mutatoru L
HR	<i>homologní rekombinace</i>
HR23B	lidský homolog proteinu RAD23 kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
K - RAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
kDa	kiloDalton
LRP	<i>lung resistance related protein</i>
MDR	mnohočetná léková rezistence

MMR	<i>mismatch repair</i> - oprava řízená methylací
MRP	<i>multidrug resistance associated protein</i>
MutS	mutator S
MVP	<i>major vault protein</i>
NER	nukleotidová excizní oprava
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
OS	<i>overall survival</i> - celkové přežívání
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
Pgp	P - glykoprotein
RAD51	protein <i>RAD51 recombinase</i>
RFC	replikační faktor C
RPA	<i>ribonuclease protein assay</i>
RT - PCR	<i>real - time PCR</i> - zpětná polymerázová řetězová reakce
SCLC	malobuněčný karcinom plic
ssDNA	jednovláknová DNA
T	thymin
TFIIH	lidský transkripční faktor II
TKI	tyrosinkinázový inhibitor
TNM	<i>tumor-node-metastasis</i>
UV záření	ultrafialové záření
<i>wt</i>	<i>wild type</i> - nemutovaná forma
XPA	<i>Xenoderma pigmentosum</i> , skupina A
XPB	<i>Xenoderma pigmentosum</i> , skupina B
XPC	<i>Xenoderma pigmentosum</i> , skupina C
XPD	<i>Xenoderma pigmentosum</i> , skupina D
XPF	<i>Xenoderma pigmentosum</i> , skupina F
XPG	<i>Xenoderma pigmentosum</i> , skupina G