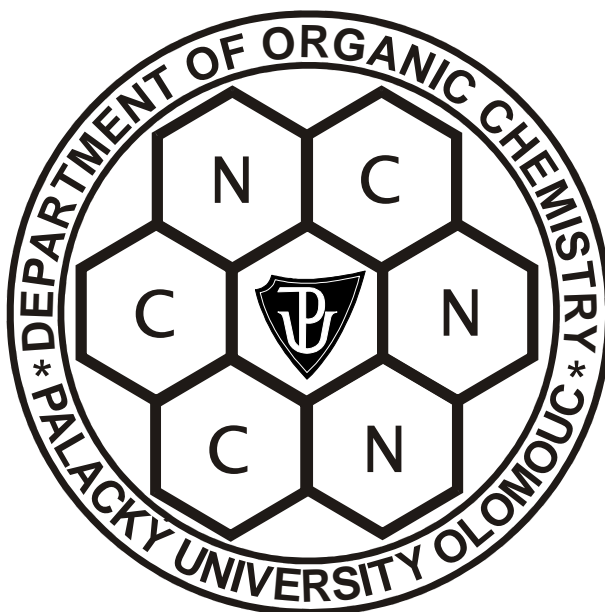


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



Michaela GILÍKOVÁ

**Využití imunohistochemie v onkologii
nádoru prsu**

Bakalářská práce

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: Mgr. Marta Dziechciarková, Ph.D.

Olomouc 2011

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, 29.4. 2011

.....

Podpis

Chtěla bych poděkovat Mgr. Martě Dziechciarkové, Ph.D. za odborné vedení mé práce, poskytnutí literatury, cenných rad a připomínek, MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. a celému kolektivu LEM za vytvoření vhodných podmínek při realizaci práce a kolegům z Masarykova onkologického ústavu za spolupráci při realizaci tohoto projektu. Tato práce by nevznikla bez podpory mé rodiny, které patří také mé poděkování.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Michaela Gilíková

Název práce: Využití imunohistochemie v onkologii nádoru prsu

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Laboratoř experimentální medicíny v Olomouci

Školitel: Mgr. Marta Dziechciarková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2011

Abstrakt:

Karcinom prsu patří v České republice k nejčastějším nádorovým onemocněním u žen. Vznik karcinomu je víceukrový proces, při němž dochází k hromadění mutací genů, kódujících proteiny, hrajících významnou roli v regulaci buněčného cyklu, proliferaci, diferenciaci a apoptóze. Nejčastější transmembránové proteiny, které jsou imunohistochemicky detekovány u karcinomu prsu jsou popsány v teoretické části této práce. Nejčastějším transmembránovým proteinem v karcinomu prsu je HER-2, jehož amplifikace a/nebo nadměrná exprese je zaznamenána u 15 – 20% případů [7]. HER-2 zvýšená exprese v tkáních karcinomu prsu je stanovována především imunohistochemicky. V tomto případě slouží imunohistochemie jako screeningová metoda a u pozitivních případů je dále potvrzován zvýšený status genu HER-2 metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH).

Amplifikace a nadměrná exprese HER-2 je důležitým markerem pro indikaci trastuzumabu, humanizované myší monoklonální protilátky, namířené proti extracelulární doméne receptoru HER-2. V dnešní době je používán k cílené terapii těchto karcinomů především v adjuvantní léčbě. V kombinaci s chemoterapií zvyšuje léčebnou odpověď, prodlužuje čas do progresu onemocnění a celkové přežití pacientů. Výsledky klinických studií ukázaly, že léčba humanizovanou myší monoklonální protilátkou trastuzumabem je u části pacientů neúčinná, primární a sekundární rezistence nádorového onemocnění se týká více než poloviny léčených pacientek. Léčba humanizovanou myší monoklonální protilátkou trastuzumabem je také spojena s vysokým rizikem kardiotoxicity u pacientů, kterým byly podávány současně s humanizovanou myší monoklonální protilátkou trastuzumabem antracykliny. Zvýšené riziko kardiotoxicity je také způsobeno antracykliny, které byly podávány v minulosti. Důležitou roli v léčbě s humanizovanou myší monoklonální protilátkou trastuzumabem hrají náklady na cílenou léčbu, které jsou velmi vysoké a představují u jednoho pacienta částku několika set tisíc korun. Proto jsme se rozhodli v této souvislosti identifikovat markery, které by byly vhodné k predikci primární a sekundární chemorezistence u karcinomu prsu s amplifikací genu HER-2 a díky jejich pomoci do budoucna individualizovat léčbu a předcházet tak aplikování neúčinných a vysoce nákladných léčiv.

Pro experimentální část byl vybrán soubor 70 pacientek, u kterých byla provedena analýza, zaměřená na studium vlastností primárního nádoru. Vyšetření bylo provedeno na vzorcích tumoru, uchovaných v parafinových blocích. Imunohistochemicky byla stanovena exprese vybraných molekulárních markerů: celkové Akt (pan) kinasy, pSer⁴⁷³Akt kinasy, pSer/Thr Akt kinasy, celkové mTOR kinasy, pSer²⁴⁴⁸ mTOR kinasy, celkového PTEN proteinu, celkového S6 Ribosomálního proteinu a pSer^{235/236} S6 Ribosomálního proteinu, které souvisí se signální dráhou HER-2 receptoru. U každého studovaného markeru jsme analyzovali, zda ovlivňuje efektivitu cílené léčby charakterizovanou časem do progresu onemocnění (TTP; time to progression). Hodnoty statistické významnosti (p) byly získány pomocí Gehan-Wicoxonova testu nebo χ^2 testu. Ke stanovení TTP byla použita Kaplan-Meierova metoda a statistická závislost byla stanovena na základě log-rank testu.

Z naší práce vyplývá, že pozitivní pacientky s karcinomem prsu, u kterých byly detekovány vybrané molekulární markery mají kratší dobu do recidivy než negativní a stejně tak mají kratší dobu celkového přežití. Pacientky s vysokou expresí celkové Akt kinasy s přítomností aktivované pSer⁴⁷³Akt kinasy v buněčném jádře vykazovaly lepší prognózu než ostatní pacientky. Pacientky s karcinomem prsu, exprimující aktivované formy S6 Ribosomálního proteinu, měly horší prognózu ve srovnání s pacientkami s tumory bez prokázané exprese aktivovaného S6 Ribosomálního proteinu.

Klíčová slova: Buněčný cyklus, imunohistochemie, protein HER-2, EGFR, dráha PI3K/Akt/mTOR, trastuzumab, karcinom prsu, tumorsupresorové geny, protoonkogeny

Počet stran: 56

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Michaela Gilíková

Title: The Use of Immunohistochemistry in Oncology Breast Cancer

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Laboratory of experimental medicine in Olomouc

Advisor: Mgr. Marta Dziechciarková, Ph.D.

The year of presentation: 2011

Abstract:

Breast cancer is the most frequent malignancy in the female population. The formation of tumors is multistep process involving accumulation of mutations in genes encoding proteins, playing an important role in regulating the cell cycle, proliferation, differentiation and

apoptosis. In the theoretical part of this bachelor thesis there are described the transmembrane proteins that are the most frequently detected by immunohistochemistry in breast cancer. The most common transmembrane protein in breast cancer is HER-2, the amplification and/or overexpression is reported in 15 - 20% of cases [6]. HER-2 overexpression in breast cancer tissues is determined primarily by immunohistochemistry. In this case immunohistochemistry is used as a screening assay and in the positive cases there is also confirmed the elevated HER-2 gene status by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

The amplification and/or the overexpression of HER-2 are important markers for the indication of trastuzumab and a humanized monoclonal mouse antibody that is directed against the extracellular domain of the HER-2 receptor. Nowadays humanized monoclonal mouse antibody trastuzumab is used for a targeted therapy of breast cancer, mostly in adjuvant treatment. In combination with other anti-cancer drugs it improves treatment response and prolongs time to progression and overall survival of patients. Results from clinical trials showed that humanized monoclonal mouse antibody trastuzumab therapy is ineffective in some patients, primary and secondary resistance of cancer affects more than half of treated patients. Humanized monoclonal mouse antibody trastuzumab is also associated with high risk of cardiotoxicity in patients who received humanized monoclonal mouse antibody trastuzumab concurrently with anthracyclines. Increasing risk of cardiotoxicity is also caused by anthracyclines which were submitted in the past. The humanized monoclonal mouse antibody trastuzumab costs of targeted therapies play an important role in the treatment because in one patient the amount corresponds to several hundred thousand crowns.

We selected and analysed primary tumor in a group of 70 patients. The evaluation was performed on paraffin blocks. The expression of selected molecular markers was examined by immunohistochemistry: total Akt (pan) kinase, pSer⁴⁷³ Akt kinase, pSer/Thr Akt kinase, total mTOR kinase, pSer²⁴⁴⁸ mTOR kinase, total PTEN protein, total S6 Ribosomal protein and pSer^{235/236} S6 Ribosomal protein that are related to HER-2 receptor signal pathways. For each marker we analyzed whether treatment affects the efficiency of time to progression (TTP). P-values were detected by the Gehan-Wilcoxon test or χ^2 test and TTP was obtained by Kaplan-Meier method and statistical dependence was determined by log-rank test.

Finally, it was found that positive patients with breast cancer, who were detected by selected molecular markers, have shorter time to recurrence than negative patients. It means they have shorter time to overall survival. Better prognosis is demonstrated in patients with high expression of total Akt kinase activated in the presence of pSer⁴⁷³ Akt kinases in the cell nucleus in comparison with other patients. Patients with cancer cells expressing active forms of S6 Ribosomal protein had worse prognosis compared with patients with tumors without evidence of expression of activated S6 Ribosomal protein.

Keywords: The cell cycle, IHC method, protein HER-2, EGFR, PI3K/Akt/mTOR signal pathway, trastuzumab, breast cancer, protooncogen, tumor suppressor genes

Number of pages: 56

Language: Czech

Seznam použitých zkratk

| | |
|----------------|--|
| 4E-BP1 | Translační iniciační faktor |
| AGC | Superrodina protein kinas |
| Akt | Protein kinasa B (také PKB) |
| ALB | „Bovine serum albumin“ |
| APAAP | Alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza |
| CDK | Cyklin - dependentní kinasy |
| CDKI | Inhibitor cyklin - dependentních kinas |
| CEP | Alfa satelitní (centromerická) forma proba |
| CISH | chromogenní <i>in situ</i> hybridizace |
| CTMP | „Carboxy - terminal modulator protein“ |
| DAB | 3,3-diaminobenzidin |
| DFS | Čas do relapsu |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina, nositel genetické informace |
| ECD | Extracelulární doména receptoru |
| EGF | Epidermální růstový faktor |
| EGFR | Receptor epidermálního růstového faktoru, (také HER-1, erB-1) |
| eIF4E | Translační iniciační faktor |
| ERK | „Extracelular signal – regulated kinases“ |
| FCS | Fetální sérum |
| FGF | Fibroblastový růstový faktor |
| FGFR | Receptor FGF |
| FISH | Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace |
| G ₀ | Klidová fáze buněčného cyklu |
| G ₁ | Fáze buněčného cyklu navazující na mitózu |
| G ₂ | Premitotická fáze buněčného cyklu |
| GPCR | Receptor spřažený s G proteinem |
| GβL | „G-protein B-subunit-like protein“ (známý mLST8) |
| HER-2 | „Human Epidermal Growth Factor Receptor“, (známý erB-2, Her-2/neu) |
| IGF | „Insulin – like growth factor“ |
| IgG | Imunoglobulin, protilátka, protein |
| IHC | Imunohistochemie |
| ISH | <i>In situ</i> hybridizace |
| LEM | Laboratoř experimentální medicíny |
| LFM | Nízkotučné mléko (Low fat milk) |
| LOH | Ztráta heterozygoty |
| LSI | Lokusově specifická sonda |
| M | Fáze buněčného cyklu kde probíhá cytokineze a mitóza |
| mAb | Monoklonální protilátka |
| MAPK | Mitogenně aktivovaná-protein kinasa |
| mRNA | Mediátorová RNA, přepis do struktury proteinu |
| mSIN1 | „Mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein“ |
| mTOR | „Mammalian target of rapamycin“ (také FK506) |
| mTORC1 | Multiproteinový komplex mTOR |
| mTORC2 | Multiproteinový komplex mTOR |

| | |
|---------------|--|
| OS | Celkové přežití pacienta |
| P | Hodnota statistické významnosti |
| p85 | Regulační podjednotka IA PI3K |
| p101 | Regulační podjednotka IB PI3K |
| p110 | Katalytická podjednotka IA PI3K |
| p110 γ | Katalytická podjednotka IB PI3K |
| p185 | Transmembránový glykoprotein |
| PAP | Peroxidáza-anti-peroxidáza |
| PBS | Fosfátový pufr „Phosphate Buffered Saline“ |
| PDGF | „Platelet-derived growth factor subunit A“ , růstový faktor |
| PDGFR | „Platelet-derived growth factor receptor“ |
| PDK1 | „3-phosphoinositide dependent protein kinase“ |
| PH | „Pleckstrin homolog domain“ |
| PI3K | Fosfatidylinositol-3-kinasa |
| PIK3CA | Gen, kódující p110 katalytickou podjednotku IA PI3K |
| PIK3R | Gen, kódující p85 regulační podjednotku IA PI3K |
| PIP2 | Fosfatidylinositol-4,5-difosfát (také PI-4,5-P ₂) |
| PIP3 | Fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (také PI-3,4,5-P ₃) |
| PKA | Protein kinasa A |
| PKC | Protein kinasa C |
| p. p. | Primární protilátka |
| PRAS40 | Proline – rich Akt substrate of 40 kDa |
| PRR5 | Proline – rich protein 5 (známý protor) |
| PTEN | Tumor supresorový gen na 10q (také MMAC1, TEP1) |
| q | Dlouhé rameno chromozomu |
| Rac | GTP-vázající protein |
| Raf | Protoonkogen |
| Ras | Rodina protoonkogenů |
| Rheb | „Ras homolog enriched in brain“, GTP vázající protein |
| RPS6KB1 | Gen kódující S6K |
| RSK | P90 ribosomální S6 kinasa |
| RTK | Receptor tyrosin kinasy |
| S | Fáze buněčného cyklu, replikace DNA |
| S473 | Aminokyselina serin, součást PKB |
| S6K | P70 ribosomální S6 kinasa |
| SABC | Streptavidin-biotin-komplex |
| SGK | Serin/threonin protein kinasa |
| SISH | Silver in situ hybridizace |
| s. p. | Sekundární protilátka |
| SRC | Proto-onkogenní tyrosin kinasa, nereceptorový protein |
| T308 | Aminokyselina threonin, součást PKB |
| TGF α | Transformující růstový faktor |
| TM | Transmembránová doména receptoru |
| TTP | Čas do progresu onemocnění |
| WCP | Celochromozomová sonda |

I. Obsah

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | Obsah..... | 10 |
| II. | Cíle práce..... | 12 |
| III. | Teoretická část..... | 13 |
| 1. | Karcinom prsu..... | 14 |
| 2. | Buněčný cyklus..... | 17 |
| 2.1. | Cyklin - dependentní kinasy..... | 18 |
| 2.2. | Zahájení buněčného cyklu..... | 18 |
| 2.3. | Růstové faktory (ligandy)..... | 19 |
| 2.4. | Receptory pro růstové faktory..... | 20 |
| 2.4.1. | HER-2..... | 20 |
| 2.4.2. | EGFR..... | 22 |
| 3. | Dráha PI3K/Akt/mTOR..... | 23 |
| 3.1. | PI3K..... | 23 |
| 3.2. | PTEN..... | 24 |
| 3.3. | PDK1..... | 26 |
| 3.4. | Akt..... | 26 |
| 3.5. | mTOR..... | 28 |
| 3.6. | S6K..... | 29 |
| 4. | Imunohistochemie..... | 29 |
| 4.1. | Rozdělení IHC metod..... | 30 |
| 4.1.1. | Přímá metoda..... | 30 |
| 4.1.2. | Nepřímá metoda..... | 31 |
| 4.1.3. | Nepřímá trojstupňová metoda..... | 31 |
| 4.1.3.1. | <i>Peroxidáza-anti-peroxidáza (PAP-Komplex).....</i> | <i>32</i> |
| 4.1.3.2. | <i>Metoda avidin-biotin-komplex.....</i> | <i>32</i> |
| 5 | Možnosti detekce HER-2..... | 32 |
| 5.1. | Imunohistochemická detekce..... | 32 |
| 5.2. | Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)..... | 34 |
| IV. | Experimentální část..... | 35 |
| 6 | Úvod..... | 36 |
| 6.1. | IHC detekce vybraných molekulárních markerů..... | 37 |
| 6.1.1. | Materiál a přístrojové vybavení..... | 37 |
| 6.1.2. | Reagencie..... | 37 |
| 6.1.3. | Příprava zásobních roztoků..... | 37 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 6.1.4. | Vlastní imunohistochemická detekce..... | 38 |
| 6.2. | Výsledky a diskuse..... | 41 |
| V. | Závěr..... | 47 |
| VI. | Seznam použité literatury..... | 48 |

II. CÍLE PRÁCE

Bakalářská práce je složena z teoretické a experimentální části. V teoretické části jsou popsány všeobecné informace o zhoubném nádoru prsu. V literární rešerši jsou shrnuty vlastnosti a funkce proteinů, především proteinu HER-2, se zaměřením na důležité signální dráhy které jsou u karcinomu prsu detekovány.

V experimentální části byla imunohistochemicky vyšetřena exprese vybraných molekulárních markerů, které souvisí se signální drahou HER-2 receptoru. Cílem bylo identifikovat markery, které by byly vhodné k predikci primární a sekundární chemorezistence na humanizovanou myš monoklonální protilátku trastuzumab u karcinomu prsu s amplifikací genu HER-2 a díky jejich pomoci do budoucna individualizovat léčbu a předcházet tak aplikování neúčinných a vysoce nákladných léčiv.

III. Teoretická část

1. Karcinom prsu

Karcinom prsu patří v ČR k nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním u žen, jehož incidence (výskyt) neustále stoupá, snižuje se však mortalita (úmrtnost) [75]. Z posledních kompletních údajů (Tab. 1) vyplývá, že v roce 2007 bylo v ČR diagnostikováno 8782 nemocných, s incidencí 129,29 případů na 100 000 žen a mortalitou 36,47 na 100 000 žen. Incidence karcinomu prsu u žen prudce narůstá po 40. roku věku. V období 1977 – 2007 bylo 12,5% případů v rozmezí 65 – 69 let. Rostoucí trend je patrný i ve věkových kategoriích 45 – 60 let a 80< let, který je však méně výrazný (4 – 6%) [78].

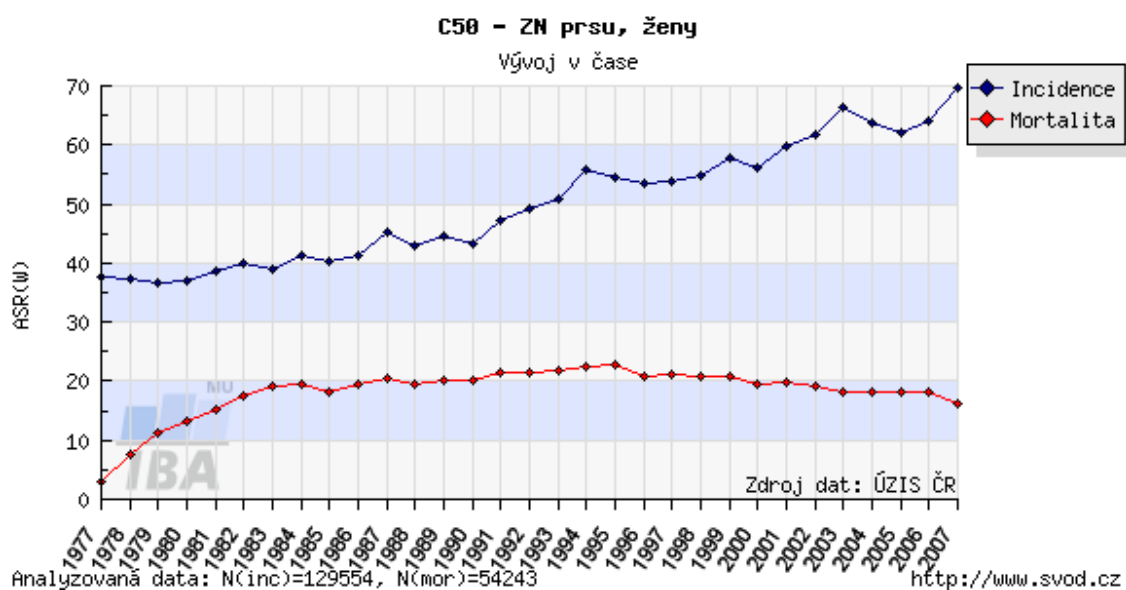
Vysoká incidence nádorů prsu byla pozorována ve všech vyspělých zemích světa, nejvíce však v severní a západní Evropě a v severní Americe. Česká republika zaujímá ve srovnání s ostatními zeměmi světa 23. místo v počtu diagnostikovaných případů karcinomu prsu, ve srovnání s evropskými pak 17. místo [43].

Díky zavedení pravidelného vyšetřování a lepších léčebných možností umírá dnes na toto nádorové onemocnění méně žen než v minulosti [75].

Tab. 1: Incidence a mortalita karcinomu prsu v ČR v letech 1977 - 2007 [78].

| rok | incidence | počet případů na 100 tis. Osob | mortalita | počet případů na 100 tis. osob |
|------|-----------|-----------------------------------|-----------|-----------------------------------|
| 1977 | 2824 | 53,67 | 269 | 5,11 |
| 1978 | 2772 | 52,42 | 634 | 11,99 |
| 1979 | 2796 | 52,65 | 931 | 17,53 |
| 1980 | 2855 | 53,67 | 1117 | 21,00 |
| 1981 | 2982 | 56,15 | 1270 | 23,91 |
| 1982 | 3083 | 57,99 | 1435 | 26,99 |
| 1983 | 3056 | 54,47 | 1624 | 30,54 |
| 1984 | 3246 | 61,02 | 1621 | 30,47 |
| 1985 | 3174 | 59,65 | 1567 | 29,45 |
| 1986 | 3268 | 61,41 | 1716 | 32,25 |
| 1987 | 3598 | 67,59 | 1774 | 33,33 |
| 1988 | 3422 | 64,24 | 1730 | 32,48 |
| 1989 | 3605 | 67,68 | 1807 | 33,93 |
| 1990 | 3531 | 66,28 | 1821 | 34,18 |
| 1991 | 3898 | 73,46 | 1926 | 36,29 |
| 1992 | 4095 | 77,09 | 1966 | 37,01 |
| 1993 | 4246 | 79,89 | 2033 | 38,25 |

| | | | | |
|------|------|--------|------|-------|
| 1994 | 4734 | 89,11 | 2124 | 39,98 |
| 1995 | 4682 | 88,26 | 2198 | 41,43 |
| 1996 | 4659 | 87,95 | 2045 | 38,61 |
| 1997 | 4703 | 88,9 | 2121 | 40,09 |
| 1998 | 4859 | 91,95 | 2093 | 39,61 |
| 1999 | 5242 | 99,34 | 2091 | 39,62 |
| 2000 | 5136 | 97,4 | 2066 | 39,18 |
| 2001 | 5387 | 102,84 | 2110 | 40,28 |
| 2002 | 5740 | 109,61 | 2085 | 39,82 |
| 2003 | 6176 | 117,94 | 1971 | 37,64 |
| 2004 | 6058 | 115,62 | 2021 | 38,57 |
| 2005 | 5891 | 112,24 | 2051 | 39,08 |
| 2006 | 6219 | 118,21 | 2134 | 40,56 |
| 2007 | 6850 | 129,29 | 1932 | 36,47 |



Graf. 1: incidence a mortalita v ČR od 1977 – 2007 [78].

Incidence zhoubných nádorů prsu v posledních letech neustále stoupá, současně se však snižuje mortalita.

Onkologická onemocnění nejsou problémem pouze dnešní doby, ale jsou zaznamenávána už od pravěku. V rentgenových snímcích kosterních pozůstatků byly nalezeny změny odpovídající kosterním nádorům. Kromě toho se také jednotlivé zmínky nalézají v pozůstatcích spisů z Mezopotámie, starého Egypta, Indie, Japonska, Číny a Řecka [45, 27].

První poznatky o karcinomu prsu byly zaznamenány už z období 3 000 let př. n. l., na papyrech pocházejících ze starého Egypta. Významnou osobností té doby byl Galén, který přirovnal rozšířené lymfatické a krevní cévy u pokročilého karcinomu prsu ke krabím nohám, z čehož pochází dodnes používaný název „cancer“ [11, 47].

Zvýšený zájem a rozvoj léčby karcinomu prsu lze sledovat od počátku 19. století, kdy vědci s lékaři začínali cíleně vytvářet odborně zaměřené skupiny a předkládali první vědecky podložené informace. Významným přelomem v léčbě rakoviny byl objev anti karcinogenních účinků rentgenových paprsků a radia, které se i přes nežádoucí účinky využívají dodnes [27, 45]. V současné době je rakovina prsu považována za genetickou aberaci somatických buněk, jehož výsledkem je nekontrolovatelný, invazivní a metastatický růst.

Ačkoliv byla genetická podstata vzniku a vývoje karcinomu prsu relativně dobře popsána, přesná příčina vzniku není dosud známa, s čímž úzce souvisí i kurabilita tohoto onemocnění [11, 47].

Tab. 2: Rozdělení rizikových faktorů vzniku karcinomu prsu podle možnosti jejich ovlivnění aktivním přístupem pacienta [1].

| Rizikové faktory | | | | | |
|--|------------------|-----------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| faktory ovlivnitelné změnou životního stylu | | | faktory dispoziční | | |
| návyky | fyzická aktivita | ostatní | osobní anamnéza | hormonální a gynekologické faktory | genetické faktory |
| kouření | pohyb | vzdělání | věk | menarché | genetická predispozice |
| alkohol | denní režim | bydliště | tělesná výška | věk menopauzy | dědičné nádorové onemocnění v rodině |
| strava | obezita | životní prostředí | krevní tlak | věk prvního porodu | - |
| - | - | psychologické aspekty | nezhoubné onemocnění prsu | počet porodů | - |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---------------------------------|---|
| - | - | - | - | kojení | - |
| - | - | - | - | gynekologická operace | - |
| - | - | - | - | hormonální léčba a antikoncepce | - |

Vznik karcinomu prsu je ovlivňován různými faktory, z nich část je ovlivnitelná životním stylem pacienta např. kouřením, alkoholem nebo stravou. Zatímco druhá skupina je tvořena predispozičními faktory jako jsou dědičná nádorová onemocnění v rodině nebo genetická predispozice.

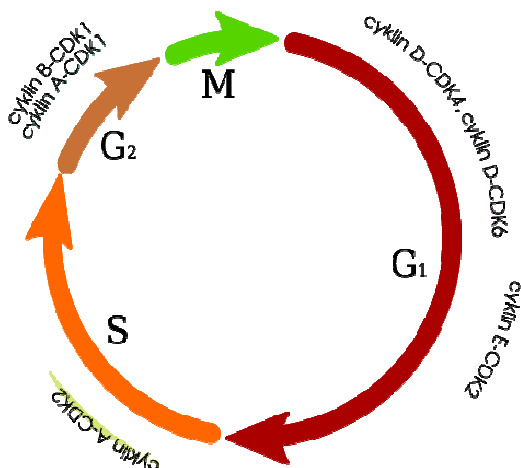
I přes provedené rozsáhlé epidemiologické studie jsou všechny odhady osobního rizika vzniku karcinomu prsu pouhou pravděpodobností [1].

2. Buněčný cyklus

Nádorové buňky jsou schopné procházet buněčným dělením i s poškozením, vyvolávajícím u zdravé buňky programovou buněčnou smrt (apoptózu). Nesprávná funkce či poškození jednotlivých genů, které regulují buněčný cyklus a apoptózu způsobuje maligní transformaci buňky. Buněčným cyklem se souhrnně nazývají děje, jimž se mateřská buňka rozdělí ve dvě buňky dceřiné [16].

Buněčný cyklus je členěn do čtyř základních fází (Obr.1): G_1 , S, G_2 a M. G_1 fáze zahrnuje období ve kterém buňka roste, duplikuje své organely a připravuje se na syntézu DNA a RNA. Pokud nejsou splněny podmínky pro správný průběh buněčného dělení může buňka přejít z G_1 fáze do fáze G_0 , která bývá označována jako klidová fáze, ve které se buňka nedělí. Doba setrvání v této fázi je různě dlouhá, u některých buněk může být až do konce života buňky. V S fázi dochází k replikaci DNA. V G_2 fázi probíhá syntéza specifických proteinů, buňka se připravuje na mitózu. Poslední část buněčného cyklu tvoří M fáze, ve které probíhá vlastní mitóza (rozdělení jádra), kdy dochází k rozdělení chromozomů a k následnému zaškrvení a rozdělení celé buňky na dvě dceřiné diploidní buňky tzv. cytokinezí [10, 2].

Buněčný cyklus je tvořen řadou kontrolních mechanismů, nacházejících se v G_1 a G_2 fázi, které zabraňují spuštění dalšího kroku v cyklu, dokud není předchozí krok úplně dokončen [2]. Pokud je v kterémkoliv kontrolním bodě detekován nevhodný průběh buněčného cyklu, může buňka iniciovat opravné procesy či indukovat programovou buněčnou smrt, apoptózu. Nesprávná funkce či vyřazení kontrolních bodů může vést k nekontrolovatelnému dělení poškozených buněk [16].



Obr. 1: Jednotlivé fáze buněčného cyklu [80].

Během interfáze buňka neustále roste. V M fázi se růst zastaví, rozdělí se jádro a následuje buněčné dělení. K replikaci DNA dochází v S fázi. G_1 fáze se nachází mezi koncem M-fáze a začátkem S fáze, zatímco G_2 fáze je umístěna mezi koncem S fáze a začátkem M fáze.

2.1. Cyklin - dependentní kinasy (CDK)

V regulaci buněčného cyklu hrají důležitou roli cyklin-dependentní kinasy (CDK), které jsou aktivovány příslušnými cykliny. CDK jsou schopny fosforylovat proteiny specifické pro danou fázi cyklu, přičemž navázaný typ cyklinu rozhoduje o tom, který protein bude tímto komplexem fosforylován [45, 58].

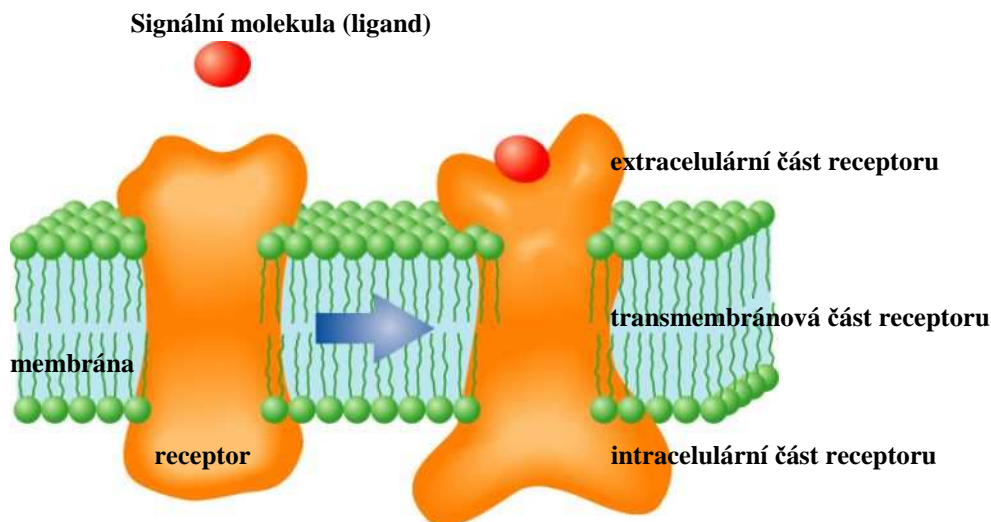
Cyklin-dependentní kinasy jsou Ser/Thr ATP-kinasy, zodpovědné za přenos fosfátu na cílové substráty [16]. Zajišťují správnou časovou posloupnost jednotlivých fází buněčného cyklu a integrují extracelulární a intracelulární signály za účelem koordinace průchodu buněčným cyklem. CDK jsou složeny z vlastní katalytické podjednotky a z pozitivní regulační cyklinové podjednotky, která je nezbytná pro katalytickou aktivitu [42, 53]. CDK jsou aktivovány vazbou na příslušné cykliny, které jsou přítomné v buňce pouze v určité části cyklu a obsahují homologické oblasti o velikosti asi 100 aminokyselin. Cykliny můžeme dělit do dvou skupin: G_1 cykliny, proteiny s krátkou životností, zatímco druhou skupinu tvoří mitotické cykliny s delší životností, které jsou odbourávány před vstupem buňky do mitózy.

CDK mohou být inhibovány přirozenými polypeptidovými inhibitory CDKI (inhibitory cyklin-dependentních kinas)[16].

2.2. Zahájení buněčného cyklu

Za fyziologických podmínek je vstup do buněčného cyklu u mnohobuněčných organismů řízen soustavou extracelulárních růstových a mitogenních faktorů, které se váží na povrchové receptory buňky. Vzniklý signál je přenášen pomocí soustavy signálních drah směrem k jádru [16].

Buněčný cyklus je aktivován navázáním signálu (růstového faktoru) na extracelulární část membránového receptoru. Ten je následně aktivován (nejčastěji fosforylován) změnou jeho konformace. Aktivovaný membránový receptor interaguje s dalšími proteiny řetězce signální dráhy, čímž dojde k přenosu signálu až do jádra buňky, kde signál ovlivní transkripci genů, zodpovědných za buněčný cyklus. Případné poruchy (mutace) v této kaskádě mohou vést k nekontrolované stimulaci buněčného dělení a tím i ke vzniku nádorového onemocnění. [10].



Obr. 2: Vazba ligandu na receptory pro růstové faktory, umístěné v membráně a jejich struktura [28].

Celý systém přenosu signálu do buněčného jádra zahrnuje několik úrovní [10]:

- růstové faktory
- receptory pro růstové faktory
- přenašeče signálu (signální transduktory)
- intracytoplazmatické kinázy
- jaderné receptory a transkripční faktory
- proteiny regulující přímo buněčný cyklus

2.3. Růstové faktory (ligandy)

Růstové faktory jsou proteiny nebo polypeptidy (např. EGF, FGF, IGF) produkované buňkami jednotlivých tkání, jejichž signalizace má krátký dosah účinku. Důležitou funkcí růstových faktorů je stimulace buněčného dělení, dále ovlivňují metabolismus, diferenciaci a růst. Membrána buněk je pro proteinové molekuly růstových faktorů nepropustná, proto působí na cílové buňky prostřednictvím receptorů pro růstové faktory [10].

2.4. Receptory pro růstové faktory

Receptory pro růstové faktory jsou proteiny, vytvářené na plasmatické membráně cílových buněk, zodpovědné za transmembránový přenos signálu. Po navázání signální molekuly (ligand) na receptory dojde ke změnám konformace jejich bílkovinného řetězce, čímž jsou aktivovány další části signální kaskády, přenášející signály na cílový protein v jádře buňky, kde je vytvářena odpověď [10].

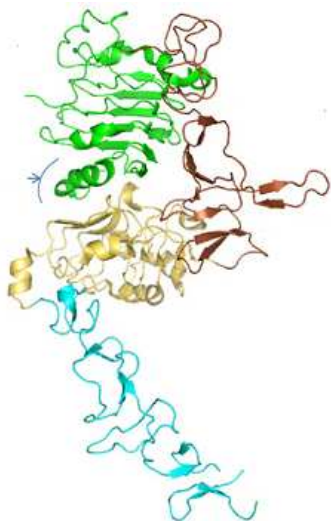
Receptory pro růstové faktory jsou složeny ze tří základních částí. Z N-terminální extracelulární domény (ECD), která je místem vazby ligandu + z poměrně krátké α -helix transmembránové domény (TM), která je složena z hydrofobního řetězce aminokyselin. Poslední část tvoří intracelulární (C-konec), obsahující vlastní doménu s tyrosinkinasovou aktivitou [10, 55], která katalyzuje fosforylaci vlastního receptoru v jeho cytoplazmatické části a slouží k navázání adaptorových proteinů. Tato vazba následně umožní navázání intracelulárních přenašečů signálu (tzv. transduktorů). Hlavní funkcí této domény je regulace důležitých aspektů fyziologie, růstu a diferenciací buněk [10].

2.4.1. HER-2 (erbB-2, Her-2/neu)

Tento 185 kDa transmembránový receptor tyrosin kinasy, hrající důležitou úlohu v apoptóze, buněčném růstu, přežití a diferenciaci, je členem rodiny epidermálních růstových faktorů (EGF) [7, 48, 55]. Řadíme sem EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), jenž je také nazýván jako HER-1 nebo erbB-1, dále HER-3 a HER-4 (označovány také erbB-3, respektive erbB-4) [16, 55]. Mezi nejdůležitější signální dráhy, zprostředkované tímto receptorem patří MAPK a PI3K. [55]. Přestože pro HER-2 neexistuje žádná signální molekula, je považován za preferovaného partnera k tvorbě heterodimerů s ostatními partnery rodiny EGF. [7, 55].

HER-2 je tvořen ze tří základních částí (viz 2.4.), z nichž za největší část, která se podílí na procesu dimerizace, je považována N-terminální ECD, dělí se do čtyř základních subdomén (I-IV) (Obr. 3). Subdomény I a III mohou tvořit vazebné místo pro ligand, zatímco cystein-bohaté II a IV jsou zapojeny do homo či hetero dimerizace receptoru. Existují dvě konformace ECD: V uzavřené dochází k interakci mezi II. a IV. subdoménou a k následnému pohlčení vyčnívajícího dimerizačního ramena subdoménou II, čímž je zabráněno jeho spojení s dimerizačními rameny ostatních HER receptorů. V otevřené konformaci dochází po navázání ligandu na receptor k následnému vyvolání asociace mezi subdoménou I a III. V této konformaci je dimerizační rameno umístěné mimo subdoménu II a IV, čímž je přístupné jiným HER receptorům s dimerizačními rameny. Jednotlivými studiemi bylo zjištěno, že většina HER-2 receptorů se nachází v otevřené konfiguraci, což naznačuje, že je dimerizační rameno HER-2 připraveno vždy k dimerizaci. [55].

Mezi ligandy, vázající se na extracelulární doménu HER-2 patří EGF, které po navázání způsobují konformační změnu, dimerizaci a polymeraci receptoru. Tato formace pravděpodobně reguluje jeho autofosforylaci a tyrosin-kinasovou aktivitu, čímž může být aktivováno buněčné dělení. Kromě ligandu EGF váže HER-2 také TGF α . Jedná se o účinný onkogen, který způsobuje transformaci buněk i při neúčasti EGF [16].



Obr. 3: Struktury extracelulární domény HER-2 [upraveno dle 55].

Doména I je zbarvena zeleně s modrou šipkou, poukazující na vazbu ligandu. Doména II s dimerizačním ramenem hnědě, domény III světle žlutě, a doména IV je azurová.

Protoonkogen HER-2, který kóduje tento transmembránový receptor s tyrosin-kinasovou aktivitou (známý rovněž jako p185), je lokalizován na dlouhém ramenu chromozomu 17 v oblasti 17q 12-21.32 [9, 19]. Byl identifikován v roce 1981 v linii krysího neuroblastomu a je identický s c-erbB-2 onkogenem [16].

Amplifikace a zvýšená exprese onkogenu HER-2 byla pozorována u celé řady primárních tumorů a metastáz, včetně karcinomu prsu, ovaria, plic, žaludku, endometria a močového měchýře. U karcinomu prsu je zvýšená exprese a/nebo amplifikace HER-2 nalézána u 10 - 34% invazivních karcinomů [19]. Vysoká exprese proteinu HER-2 na povrchu buňky vede k jeho homodimerizaci. Dimer HER-2/HER-2 je pak aktivní i bez navázaného růstového faktoru, čímž je neustále iniciována signální dráha. Buňky se zvýšenou expresí HER-2 bývají obvykle málo diferencované, bez řítmnosti hormonálních receptorů a onemocnění obvykle zasahuje také uzliny [16]. Pacienti vykazují obecně horší prognózu s ohledem na délku období bez nemoci i na celkovou dobu přežití [7, 16, 48]. Až do 90. let minulého století byla zvýšená exprese/amplifikace HER-2 považována pouze za negativní prognostický faktor [50]. V těchto letech byla syntetizována humanizovaná myšší monoklonální protilátka trastuzumab, namířená proti extracelulární doméně tohoto receptoru a později zavedena do rutinní klinické praxe, pod

názvem Herceptin (Genentech, anti-p185^{Her2}) [55]. V České republice byla humanizovaná myší monoklonální protilátka Herceptin schválena k léčbě HER-2 pozitivního invazivního duktálního karcinomu v paliativním režimu v roce 2001 a v roce 2009 v režimu adjuvantním. Od roku 2010 je současně používán k léčbě invazivního karcinomu žaludku, s vysokou amplifikací/overexpresí HER-2 [59].

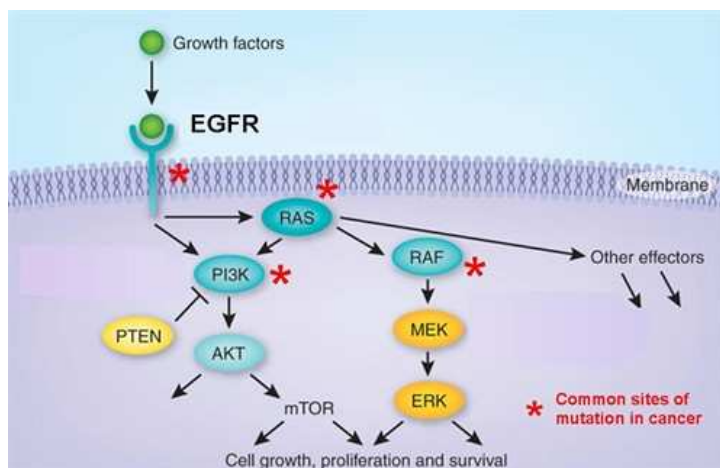
2.4.2. EGFR (Her-1, erbB-1)

Receptor epidermálního růstového faktoru je 170-kD transmembránový glykoprotein, kódovaný genem EGFR na chromozomu 7. Vazba ligandů na EGFR vede k autofosforylaci receptorů tyrosin kinasy a k následné aktivaci signálních drah (Obr. 4), do kterých řadíme Ras/Raf/MAPK, jejíž aktivace vede ke zvýšení proliferační aktivity, dále pak signální cesty PI3K/Akt/mTOR, jejíž aktivace má zejména cytoprotektivní antiapoptotický účinek [51]. EGFR může být aktivován až 4 různými ligandy, nejčastěji epidermálním růstovým faktorem (EGF) a transformujícím růstovým faktorem α (TGF- α), dále pak homodimerním nebo heterodimerním komplexem s ostatními členy rodiny HER receptorů [20, 37, 51].

Aktivace EGFR epidermálním růstovým faktorem (EGF) nebo transformujícím růstovým faktorem alfa (TGF α) způsobuje progresi buněčného cyklu, urychluje buněčnou proliferaci, nádorový růst, diferenciaci a snižuje apoptózu [20, 51]. Overexprese a/nebo amplifikace EGFR byla nalezena u karcinomu plic, prsu, žaludku, jícnu, prostaty, vaječníku, dělohy, děložního čípku atd. [20, 46, 51].

EGFR je důležitý pro zachování normální funkce a obnovení zdravých epidermálních tkání, ve kterých je jeho exprese přísně regulována. Důsledkem jeho aberantně zvýšené exprese je nekontrolovatelná buněčná proliferace, která může vést až ke vzniku nádorů. Zvýšená aktivita EGFR u nádorových buněk je způsobená overexpresí receptoru, genovou amplifikací EGFR, přítomností aktivační mutace EGFR s neregulovanou signalizací receptoru, nebo ztrátou negativních intracelulárních regulačních mechanismů.

Pacienti, u nichž byla prokázána zvýšená aktivita EGFR vykazují celkově vyšší agresivitu onemocnění, kratší přežívání, sníženou citlivost k cytostatické léčbě, radioterapii a rozvoj vzdálených metastáz [51].



Obr. 4: Signální dráhy EGFR [74].

Mezi důležité signální dráhy EGFR patří Ras/Raf/MAPK a PI3K/Akt/mTOR

3. Dráha PI3K/Akt/mTOR

Signální dráha PI3K/Akt/mTOR je jednou z hlavních signálních drah, které se podílejí na procesu kancerogeneze a patří tak k důležitým cílům onkologické léčby. Inhibice PI3K/Akt/mTOR signální dráhy se stala slibným cílem výzkumu, poněvadž aberace v jednotlivých složkách této signální dráhy se vyskytují u širokého spektra nádorových onemocnění [54].

Tato dráha, zahrnující kinasy PI3K, Akt a mTOR, se v buňce účastní regulace celé řady biologických procesů, mezi které patří proliferace, buněčný růst, apoptóza buňky, metabolismus. [6, 18, 31, 56]. Předchozí studie ukázaly, že je zvýšeně aktivována u nádorových buněk ve srovnání s buňkami normálními. Aktivace signální dráhy PI3K/Akt/mTOR hraje významnou antiapoptotickou úlohu, čímž přispívá k patogenezi některých typů nádorových onemocnění [56, 71]. Signální dráha může být postižena amplifikací a mutacemi katalytické podjednotky PI3K, Akt, mTOR a S6K [38, 39, 53].

PI3K/Akt/mTOR signální dráha je negativně regulována proteinem PTEN, který je produktem tumor supresorového genu PTEN. Ztráta funkce tohoto genu způsobená mutací nebo epigenetickou modifikací patří asi k nejčastějším příčinám hyperaktivace dráhy PI3K, které se vyskytují u mnoha nádorových onemocnění. [54].

3.1. PI3K

PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) je lipidová kinasa, která je rozdělena do tří hlavních podčeledí podle jejich struktury a substrátové specifity na I PI3Ks, II PI3Ks a III PI3Ks, z nichž nejlépe prozkoumaná je třída I PI3Ks, která je zapojena do buněčného růstu, proliferace a přežití. Třída I PI3Ks je aktivována buňkami povrchových receptorů a skládá se ze dvou podčeledí: Z třídy IA PI3Ks, složené z p110 katalytické podjednotky a p85 regulační

podjednotky. Katalytická podjednotka p110 má tři různé isoformy (p110 α , p110 β , p110 δ), kódované pomocí PIK3CA, PIK3CB a PIK3CD, zatímco regulační podjednotka má isoformy p85 α , p85 β , p55 γ , které jsou kódované PIK3R1, PIK3R2 a PIK3R3. Druhou skupinu tvoří třída IB PI3Ks, která je složena z p101 regulační podjednotky a p110 γ podjednotky.

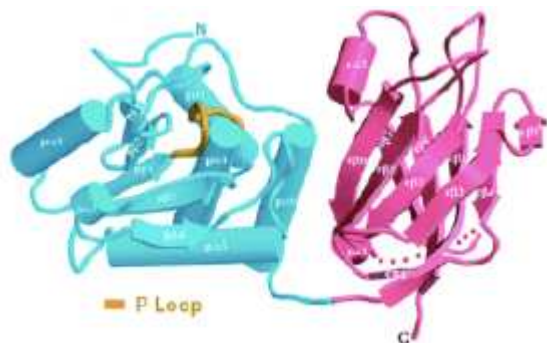
Třída IA PI3Ks je aktivována receptory tyrosin kinasy (RTK) zatímco třída IB PI3K pomocí GPCR. Mezi produkty třídy IA PI3Ks, která je zapojena do mnoha buněčných funkcí včetně buněčného růstu, proliferace a přežití, patří PIP2 a PIP3, které se získávají z fosfatidylinositol-4,5-bifosfátu [23].

PI3K může být aktivována tyrosin kinasovými receptory (RTK), do kterých řadíme např. EGFR, PDGFR, FGFR, IGF atd. RTK interagují s p85 regulační podjednotkou, zatímco s p110 katalytickou podjednotkou PI3K interaguje protein Ras. PI3K může být také aktivována protein kinasou C (PKC), Rac atd. [23]. Aktivovaná PI3K katalyzuje fosforylaci inositolového kruhu v D3 pozici, čímž dochází k fosforylaci PIP2 na PIP3, jehož vznik je negativně regulován fosfatázou PTEN. Druhý posel PIP3 aktivuje proteiny s PH doménou, především Akt a PDK1 [26].

3.2. PTEN

PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*), patřící mezi tumorsupresorové geny, je znám také pod názvem MMAC (*Mutated in Multiple Advanced Cancers*) nebo TEP1 (*TGF β -regulated and Epithelial Cell Enriched Phosphatase*) [8, 35, 45, 62].

Je lokalizován na dlouhém rameni chromozomu 10 v oblasti 10q 23.31 a kóduje 47 kDa protein s fosfatasovou aktivitou, který je exprimován převážně v cytoplazmě. Tento gen se skládá z 9 exonů a z dvou základních domén (obr. 5). Doména (C-konec) především reguluje aktivitu a stabilitu celé molekuly, zatímco druhá doména je tvořena N-koncem s fosfatasovou aktivitou, vykazující dualní specifitu. Jeho substrátem mohou být jak lipidy, tak proteiny [45, 62].

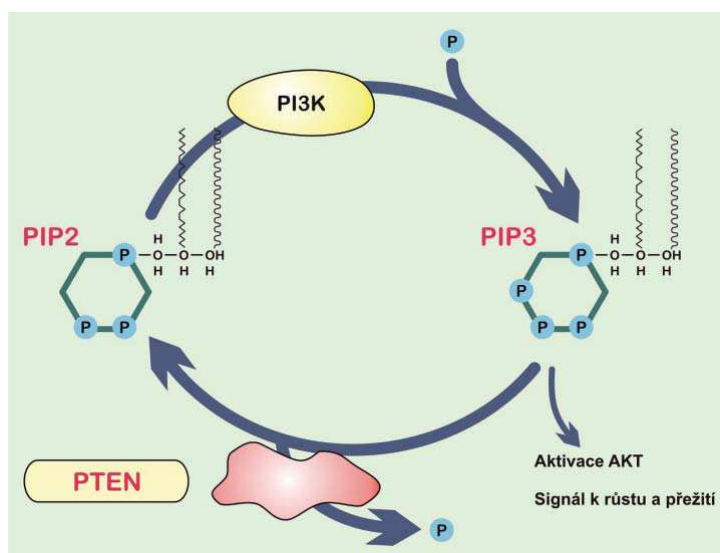


Obr. 5: Struktura proteinu PTEN [73].

Protein se skládá z C-konce, který je na obrázku vyznačen červeně, a z modrého N-konce s fosfatasovou aktivitou.

PTEN je negativním regulátorem signální kaskády PI3K/Akt/mTOR, ovlivňující buněčný růst, proliferaci a přežívání buněk. Deregulace této signální dráhy, způsobená defosforylací substrátu PIP3 na třetí pozici (Obr. 6), přispívá k mnoha druhům rakoviny u člověka. Působí tedy jako přímý antagonist antiapoptických, proliferačních, migračních pochodů PI3K u mnohých typů buněk [22].

Mutace nebo delece genu PTEN může mít za následek nedostatek aktivního PTENU, způsobující zvýšenou aktivaci kinasy Akt, která by mohla být zodpovědná za zprostředkování rezistence nádorových buněk k některým chemoterapeutickým látkám [34, 56]. Somatické mutace nebo homozygotní delece PTEN byly nalezeny v různých druzích primárních zhoubných nádorů, jako například v glioblastomech, v karcinomu prostaty, karcinomu endometria a karcinomu prsu, což naznačuje, že PTEN mohou být zapojeny do progresu tumoru. [8, 52]. Ztráta PTEN funkce, a to buď v myších embryonálních kmenových buňkách nebo v lidských nádorových buněčných liniích má za následek hromadění PIP3 napodobující účinek PI3K aktivace jeho downstream efektorů PDK1 a Akt/PKB [6].



Obr. 6: mechanismus působení proteinu PTEN [54].

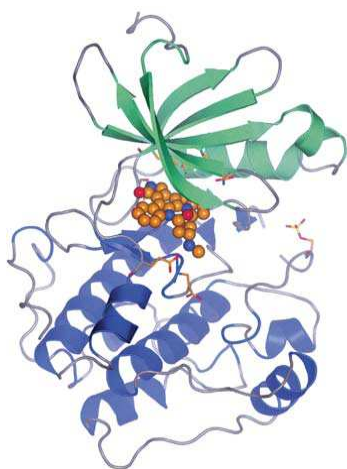
PTEN defosforyluje PIP3 na třetí pozici za vzniku PIP2, čímž přispívá k mnoha druhům nádorů u člověka.

Zárodečné mutace genu PTEN způsobují tři vzácné autosomálně dominantní dědičné nádorové syndromy. Jedná se o Cowdenův syndrom, Lhermitt-Duclosovo onemocnění a Bannayan-Zoanův syndrom. Např. Cowdenův syndrom vyvolává u lidí větší pravděpodobnost vzniku nádorového onemocnění, především v karcinomu prsu (30 - 50%), štítné žlázy (10%) a mozku [8, 52].

3.3. PDK1

PDK1 (*3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*) je klíčová protein kinasa, hrající důležitou roli v regulaci signální dráhy aktivací superrodiny kinas AGC, která zahrnuje Akt a S6K, RSK a SGK. Tyto enzymy jsou stimulovány hormony, růstovými faktory a regulačními proteiny.

PDK1 se skládá z N-terminální kinasové katalytické domény a C-terminální PH domény (Obr. 7) [5]. Navázáním PIP3 na C-terminální PH doménu PDK1 dojde k jeho aktivaci a k následné fosforylaci T308, čímž je aktivována serin/threoninová kinasa Akt, stimulující buněčný cyklus, progresi, přežití a metabolismus [6].



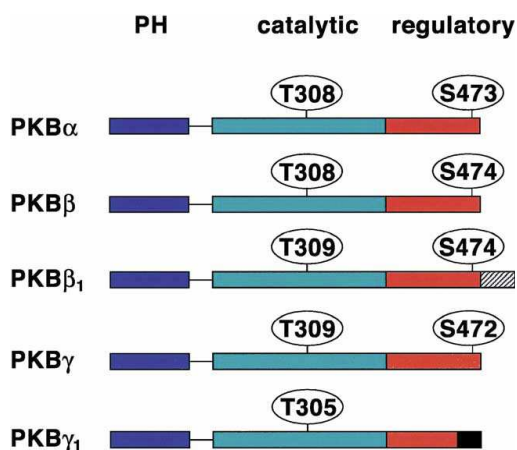
Obr. 7: struktura PDK1 [29].

PDK1 se skládá ze zelené N-terminální domény a modré C-terminální domény.

3.4. Akt (PKB)

Akt, známá jako protein kinasa B (PKB), je serin/threoninová kinasa, která je buněčným homologem virového proteinu v-Akt, označovaného v anglosaské literatuře jako *AKT-8 acute transforming retrovirus* [34, 53] a hraje klíčovou úlohu v buněčném metabolismu, proliferaci a proteinové syntéze [13, 23]. Akt je řazena do AGC superrodiny protein kinas obsahující také protein kinasu C (PKC), SGK, S6K a další. Existují tři strukturně podobné isoformy Akt, které se podobají z více než 85% a patří k jedním z nejdůležitějších proudových cílů PI3K (Obr. 8). Jedná se o Akt-1 (PKB α), Akt-2 (PKB β) a Akt-3 (PKB γ). Všechny isoformy též obsahují v N-terminální části molekuly PH doménu [3, 33, 53].

Akt genová amplifikace byla pozorována u určitého počtu nádorů, zahrnujících karcinom žaludku, glioblastomu a gliosarcomy. Další amplifikace jednotlivých isoform Akt byly nalezeny např. v oblasti hlavy, slinivky břišní, vaječníků, prsu a prostaty [23].



Obr. 8: Doménová struktura jednotlivých isoform Akt a jejich splicingových variant [21].

Struktura Akt je dána N-terminální částí, obsahující PH-doménu, dále pak z hydrofobní C terminální části složené z katalytické a regulační podjednotky.

Akt je často aktivována v karcinomu prsu amplifikací receptorů růstového faktoru (HER-2, EGFR), aktivačních mutací intracelulárních kinas (PIK3CA), amplifikací nebo mutací isoform Akt, inaktivací fosfatázy PTEN [13].

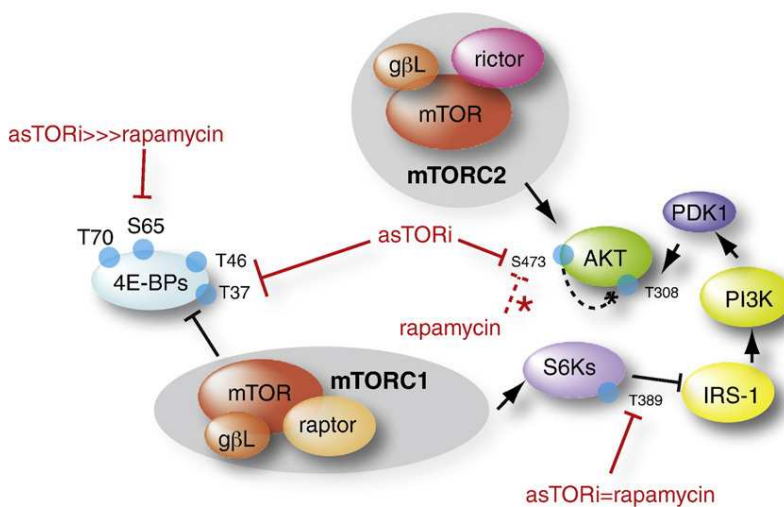
Aktivace Akt spočívá ve fosforylaci dvou aminokyselin, threoninu (T308) nacházejícího se v katalytické doméně Akt a serinu (S473), umístěného v hydrofobní C-terminální části molekuly. T308 je fosforylována prostřednictvím PDK1, která je aktivována fosforylací PIP2 na PIP3, pomocí PI3K. Přesný mechanismus fosforylace S473 není přesně objasněn. Tak jako fosforylace T308, tak i fosforylace S473 je závislá na aktivitě PI3K.

Po vazbě ligandu na receptor dochází k aktivaci PI3K, která může být stimulována jak receptory zpraženými s G-proteiny (GPCR), tak i receptory s tyrosin-kinasovou aktivitou (RTK). Aktivace PI3K způsobí fosforylaci PIP2 na D3 pozici inositolového kruhu za vzniku PIP3, který je vázán PH-doménou Akt a PDK1. Fosforylací PIP2 dojde ke změně konformace Akt, která tak zajistí lepší přístupnost fosforylačních míst pro fosforylaci. Po aktivaci Akt na cytoplasmatické membráně dochází k jejímu uvolnění a následné translokaci do jádra [3, 33, 53].

Aktivace Akt je negativně regulována nádorovým supresorovým genem PTEN, jehož inaktivace vede ke zvýšené aktivitě Akt u mnoha typů nádorů. Proto změny v úrovni PTEN transkripce mohou ovlivnit přežití PI3K/Akt/mTOR signální dráhy [32]. Mezi důležitý negativní regulátor Akt patří také CTMP, který přímo interaguje s Akt a inhibuje tak fosforylaci na T308 a S473 [38, 53].

3.5. mTOR

mTOR (*mammalian target of rapamycin*) je serin/threoninová kinasa o velikosti 289 kDa, která je také známa jako FK506 [60]. Je součástí rodiny PI3K a hraje ústřední roli v buněčných procesech jako je buněčný růst, proliferace, organizace cytoskeletu, syntéza bílkovin, přežívání buňky a angiogeneze [54]. mTOR je složena ze dvou funkčně odlišných multiproteinových komplexů: Komplex mTORC1 je aktivován PI3K a Ras signalizací prostřednictvím přímé fosforylace a inaktivace TSC2, extracelulární signalizací regulovaných kinas (ERK) a RSK [24]. Skládá se z mTOR, raptoru (*regulatory associated protein of TOR*), který funguje jako regulační protein nezbytný pro fosforylaci S6K a 4E-BP1. Dále je složen z GβL, z deptoru (*disheveled, Egl-10, pleckstrin*) a PRAS40 [14, 49, 54]. mTORC1 aktivuje S6K a inaktivuje eIF4E vázající protein 1, který podporuje proteinovou translaci a růst buněk [60]. Dále pak reguluje mRNA translaci a biogenezi ribosomů a je negativním regulátorem aktivace Akt. mTORC2 je složen ze specifické regulační podjednotky rictor (*rapamycin insensitive companion of TOR*), jehož fosforylace vyžaduje mTORC1 aktivitu, konkrétně S6K. Dále se skládá z mSIN1, PRR5 a deptoru [14, 24, 49]. mTORC2 fosforyluje Akt, SGK a PKC (členy rodiny AGC kinas), které kontrolují buněčné přežití a cytoskeletovou organizaci [14]. mTOR může být aktivována různými růstovými faktory, např. PDGF, EGF, IGF [54].



Obr. 9: struktura mTORC1 a mTORC2 [14].

Zvýšená aktivace mTOR je nejčastěji způsobena amplifikací, mutací nebo ztrátou klíčových regulátorů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy, zvyšující buněčný růst a proliferaci buněk. Tato signální dráha, řídící proces buněčné replikace pomocí dvou klíčových proteinů, 4E-BP1 a S6K, je spuštěna navázáním ligandu na membránový receptor, čímž dojde ke změně konformace receptoru a vzniklý signál je následně přenášen z cytoplazmatické membrány pomocí malých molekul, tzv. druhých posílů. Důležitým momentem signální dráhy

PI3K/Akt/mTOR je fosforylace serin/threoninové protein kinasy PDK1 prostřednictvím PI3K kinasy, čímž je aktivována Akt kinasa, která může následně fosforylovat řadu dalších kinas, např. mTOR kinasu [54].

3.6. S6K

70 kDa ribosomální protein S6 kinasa je-serin/threonin kinasa, která je členem rodiny AGC kinas [60]. S6K kinasa je kódována genem RPS6KB1, lokalizovaným v oblasti 17q23. Zvýšená exprese S6K kinasy, nacházející se v 10 - 30% případech karcinomu prsu, je spojována s agresivním onemocněním a horší prognózou u pacientů.

S6K kinasa je regulována signální kaskádou PI3K/Akt/mTOR aktivovanou HER-2 receptorem a hraje důležitou roli při kontrole buněčného cyklu, růstu a přežití. Aktivace S6K pomocí PDK1 a mTOR kinasy způsobuje fosforylaci 40S ribosomálního proteinu S6 [17], čímž dochází k translaci ribozomálních proteinů, elongačních faktorů a dalších proteinů nezbytných pro přechod buňky z fáze G₁ do fáze S buněčného cyklu [54].



Obr. 10: struktura S6 ribosomálního proteinu [79].

Ribosomální protein S6 se skládá ze dvou šroubovic α -helixů. A ze čtyř β -listů .

4. Imunohistochemie

Imunohistochemie se začala rozvíjet postupným zaváděním objevovaných zákonitostí specifických imunologických reakcí a stala se tak jednou z modernějších metod spadajících do „histochemie“ vznikající přibližně od 30. let 20. století. [30]. První antigeny byly detekovány v tkáních pomocí fluorescenčně značené protilátky už v roce 1941 tzv. přímou metodou, kterou zavedl Coonson s Kaplanem, ale měla pár nedostatků. Její využití bylo značně omezeno v klinické praxi díky nutnosti použít nativní materiál. Bouřlivý rozvoj byl zaznamenán v roce 1976, kdy Milstein s Köhlerem připravili protilátky namířené proti jednomu epitopu antigenní

molekuly. Zásadní revoluce v imunohistologii nastala koncem 70. let, kdy se podařilo spojit enzym s protilátkou a tím byly IHC metody zavedeny do praxe [15].

Základním cílem IHC, pomocí nichž jsou vyšetřovány patientské vzorky, je detekce specifických antigenních determinant s využitím imunologické vazby antigen – protilátka, kterou si lze představit jako vztah specifického klíče (volné protilátky) k zámku (antigenu). Předmětem našeho projektu je detekce antigenů sdružených s nádorovými buňkami a možnosti IHC klasifikace nádorů podle jejich původu.

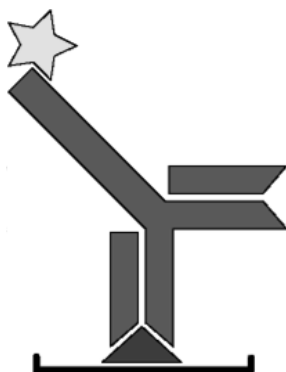
Do IHC spadají všechny techniky, které využívají značené monoklonální a polyklonální protilátky, lokalizující a vizualizující příslušné tkáňové antigeny. IHC využívá poznatků imunologie o činnosti imunitního systému, který plní kontrolní funkci vlastních buněk, které toleruje a cizí buňky zaznamenává jako antigeny. IHC je využívána ke specifitějšímu průkazu látek v preparátech, objasnění distribuce prokazovaných látek (schopných zúčastnit se reakce jako antigeny), a to extra intracelulárních strukturních a informačních molekul, enzymu nebo sekrečních produktů [15].

V posledním desetiletí se IHC stala přínosným nástrojem sloužícím k výzkumu biologických objektů v návaznosti na metody histologické a elektromikroskopické na jedné straně a metody biochemické a molekulárně genetické na straně druhé [36]. V současnosti je role IHC v diagnostické praxi u řady chorob prakticky nezastupitelná [15, 30].

4.1. Rozdělení imunohistochemických metod

4.1.1. Přímá metoda

Jedná se o nejjednodušší IHC metodu, lokalizující antigen v tkáni pomocí primární protilátky značené fluoresceinem, enzymem nebo kovem. Přestože má široké využití v nativních řezech, je málo citlivá na řezech parafínových. Přímá metoda se používá tehdy, je-li antigen přítomen v dostatečně vysoké koncentraci ve studované tkáni [15, 30].



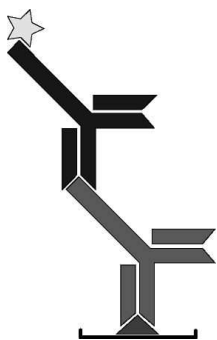
Obr. 11: schéma přímé metody [77]

Přímá metoda je založena na detekci antigenu pomocí přímo značené primární protilátky např. kovem či fluoresceinem.

4.1.2. Nepřímá metoda

Tato dvojestupňová metoda je založená na imunologické vazbě primární protilátky se značenou protilátkou. Nejdříve dochází k aplikaci prvního specifického antiséra a k následnému promytí řezů. Poté je tkáň pokryta vrstvou druhého antiséra, které je značené fluorochromem nebo enzymem, namířeného proti imunoglobulinovému dárci primární protilátky.

Nepřímé IHC metody jsou ve srovnání s přímými komplikovanější, ale jejich výhodou je, že jsou mnohem citlivější [15, 30].



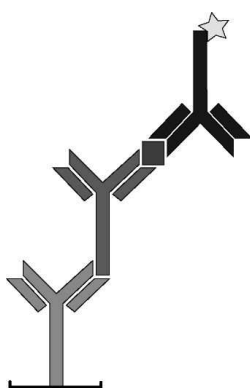
Obr. 12: schéma nepřímé metody [77]

Nepřímá metoda je založena na imunologické vazbě sekundární značené protilátky (např. fluorochromem či enzymem) na protilátku primární.

4.1.3. Nepřímá trojstupňová metoda

Nepřímé IHC metody spočívají v navrstvení jednoho a více neznačených imunoglobulinových reagentů na primární protilátku a přímo se vážou na neznámý antigen [15].

Jedná se o amplifikační metody, které slouží k zesílení signálu v případě, pokud je množství molekul antigenu v tkáni je nízké [30].



Obr. 13 : obecné schéma trojstupňové metody [77]

V první fázi této metody reaguje primární specifická protilátka s antigenem prokazovaným v tkáni. Ve druhé fázi je aplikována neznačená specifická protilátka proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky se používají v první a třetí fázi. Tato sekundární protilátka se také nazývá protilátka spojovací a tvoří můstek.

4.1.3.1. Peroxidáza-anti-peroxidáza (PAP-Komplex)

Tato IHC metoda, využívající vazbu křenové peroxidázy na dvojici protilátek pocházejících ze zvířat, je ekonomicky výhodná a použitelná v širokém rozsahu histologie. [15]. Nejdříve reaguje primární protilátka s antigenem v tkáni. Poté je aplikována neznačená specifická sekundární protilátka, která tvoří spojovací můstek, proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky se používají v první a třetí fázi této metody. Můstek je nutno přidávat v nadbytku, aby nebyla vazebně vysycena obě ramena jeho IgG molekuly, jinak by došlo k falešně negativnímu výsledku. Ve třetí fázi je nanášen značený PAP komplex.

Při nahrazení peroxidázy v komplexu alkalickou fosfatázou se jedná o metodu alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza (APAAP), která je vhodná pro vyšetřování preparátů, u kterých je velmi vysoká aktivita endogenní peroxidázy a nelze tak spolehlivě zaručit její úplnou inaktivaci [30].

4.1.3.2. Metoda avidin-biotin-komplex

Metoda využívá schopnost pevné neimunologické a druhově nspecifické vazby vaječného bílkovinného proteinu avidinu s vitamínem biotinem. Avidin má schopnost vázat čtyři molekuly biotinu. Některá vazebná místa avidinu jsou volná a některá jsou obsazena komplexem biotin-peroxidáza. Volná místa jsou připravena pro navázání biotinylované protilátkové molekuly (můstku). Při použití avidinu získaného z bakterie *Streptomyces avidini* je tento komplex nazýván SABC, tj. streptavidin-biotin-komplex. Metoda je založena na navázání sekundární protilátky, konjugované s biotinem, na primární specifickou protilátku. Třetím stupněm této metody je pak (strept) avidin-biotinovým komplex označený křenovou peroxidázou. Enzymatická aktivita této peroxidázy indikuje místa v preparátu, na nichž došlo k primární specifické reakci. [15, 30].

5. Možnosti detekce HER-2

HER-2 lze v nádorové tkáni vyšetřovat nejčastěji dvěma principiálně odlišnými metodami. Jedná se o detekci proteinu metodou imunohistochemie (IHC) nebo pomocí detekce genu v jádře metodou *in situ* hybridizace (ISH), nejčastěji fluorescenční-FISH, nověji chromogenní-CISH. [50].

5.1. Imunohistochemické metody

Imunohistochemií proteinu HER-2 je stanovována zvýšená exprese proteinu HER-2 v tkáních karcinomu prsu. Detekce v tkáni je prováděna inkubací v primární anti-HER-2 protilátce, která obsahuje vhodný detekční systém a následné navázání sekundární protilátky na protilátku primární. Konečným výsledkem je vizualizace proteinu a následné vyhodnocení pod světelným mikroskopem. Výhodou této metody je schopnost odlišit membránový HER-2

protein od cytoplasmatického, který není důvodem k indikaci léčby, humanizované myší monoklonální protilátky, Herceptinem [19, 45, 57]. Přesnost výsledků je velmi závislá na kvalitě tkání, barvicích metodách, zejména na vyhledávání antigenů a interpretaci a zkušenosti hodnotitele [47]. Metoda IHC je podrobněji popsána v kapitole 4.

V současné době nejpoužívanějším imunohistochemickým systémem k detekci HER-2 je komerčně vyráběný HercepTest™ (*DakoCytomation*). Tato metoda využívá inkubaci primární králičí protilátky proti lidskému proteinu HER-2. Poté jsou vzorky inkubovány se značeným polymerem sekundárního systému, který je založen na polymeru značeném křenuvou peroxidásou a konjugovaném se sekundární protilátkou. Po přidání chromogenu dojde k vytvoření viditelného reakčního produktu v místě antigenu.

Značený polymer neobsahuje avidin ani biotin, v důsledku toho jsou eliminovány nespecifické výsledky barvení. Závěrem jsou vzorky obarveny hematoxylinem a zakryty krycím sklíčkem. Výsledky jsou interpretovány pomocí světelného mikroskopu [12].

Tabulka. 3: Kritéria intenzity barvení buněčné membrány [12].

| Barvicí obrazec | Skóre | Hodnocení overexprese proteinu HER2 |
|---|--------------|--|
| Nebylo pozorováno žádné zbarvení nebo nebylo pozorováno membránové zbarvení v méně než 10% nádorových buněk. | 0 | negativní |
| Nejasné/sotva znatelné membránové zbarvení bylo zjištěno ve více než 10% nádorových buněk. Buňky byly zbarveny pouze na části své membrány. | 1+ | negativní |
| Slabé až střední úplné membránové zbarvení bylo pozorováno ve více než 10% nádorových buněk. | 2+ | slabě pozitivní |
| Silné úplné membránové zbarvení bylo pozorováno ve více než 10% nádorových buněk. | 3+ | silně pozitivní |

Výsledek IHC 0 a IHC 1+ se hodnotí jako negativní, výsledek IHC 3+ jako pozitivní a je dostačující k zahájení léčby, pokud byl stanoven v referenční laboratoři. Výsledek IHC 2+ je nejistý výsledek, k potvrzení nebo vyloučení pozitivitu je vždy nutno doplnit vyšetření amplifikace metodou FISH nebo SISH (fluorescenční in situ hybridizace nebo silver in situ hybridizace).

5.2. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Metoda FISH je využívána u metafázích a/nebo interfázních buněk k detekci počtu kopií genů, chromozomů či chromozomálních úseků anebo k detekci chromozomálních přestaveb, mapování genů a DNA sekvencí, k detekci zhoubných nádorů [40].

Podstatou metody FISH je hybridizace neradioaktivně značených DNA sond ke komplementárním úsekům cílové DNA chromozomů buněčných jader fixovaných na mikroskopickém preparátu, následná vizualizace a analýza fluorescenčních signálů ve fluorescenčním mikroskopu. Sondy jsou značeny přímo různými fluorochromy nebo nepřímo, např. biotinem či digoxigeninem. U nepřímo značených sond následuje po hybridizaci detekce pomocí systému protilátek, které jsou konjugované s různými fluorochromy.

Metoda FISH využívá tří typů sond: Jedná se o lokusově specifické sondy (LSI), které hybridizují specificky ke konkrétním lokusům na chromozomech a slouží k přímé lokalizaci genů či chromozomálních úseků, k detekci jejich amplifikace a k detekci strukturálních chromozomových aberací (např. delece, translokace, inverze atd.). Další skupinu tvoří alfa-satelitní sondy (CEP), využívané pro hybridizaci s centromerickými a nebo telomerickými oblastmi chromozomu. Jsou vhodné např. k detekci početních odchylek chromozomů (např. monosomie, trisomie atd.). Poslední skupinu používaných sond tvoří celochromozomové sondy (WCP), které hybridizují s celými chromozomy a detekují strukturální přestavby chromozomu. [41].

IV. Experimentální část

6. Úvod

Jak již bylo řečeno, karcinom prsu představuje v dnešní době druhou nejčastější příčinu malignity u žen. Přibližně v 15 - 20% případech zhoubných nádorů prsu byla detekována zvýšená amplifikace a/nebo overexprese genu HER-2, vedoucí obecně k horší prognóze [7]. Nicméně, zvýšená pozitivita HER-2 je současně pozitivním prediktivním markerem. V klinické praxi je k dispozici humanizovaná verze myší monoklonální protilátky trastuzumab (Herceptin), která je namířena proti extracelulární doméně HER-2 receptoru (p185 HER-2). Jeho protinádorový účinek spočívá v inaktivaci tohoto receptoru a jeho signálních drah, ale jeho přesný mechanismus nebyl objasněn, hovoří se o internalizaci a degradaci receptoru. Humanizovaná myší monoklonální protilátka Trastuzumab v kombinaci s chemoterapií zvyšuje léčebnou odpověď, prodlužuje čas do progresu onemocnění a celkové přežití pacientů. V dnešní době je humanizovaná myší monoklonální protilátka trastuzumab indikována především v adjuvantním režimu u pacientů s karcinomem prsu či žaludku, nicméně vzhledem k dosaženým výsledkům u respondérů lze předpokládat rozšíření indikace i na další skupiny pacientů s prokázanou HER-2 pozitivitou. Výsledky klinických studií ukázaly, že léčba humanizovanou myší monoklonální protilátkou trastuzumabem je u části pacientek neúčinná a jeho náklady na cílenou léčbu jsou velmi vysoké. Proto jsme se rozhodli v této souvislosti identifikovat markery, které by byly vhodné k predikci primární a sekundární chemorezistence u karcinomu prsu s amplifikací genu HER-2 a díky jejich pomoci do budoucna individualizovat léčbu a předcházet tak aplikování neúčinných a vysoce nákladných léčiv.

Do naší studie byly zařazeny pacientky s HER-2 pozitivním karcinomem prsu, léčené humanizovanou myší monoklonální protilátkou trastuzumabem. V naší práci byla imunohistochemicky vyšetřena exprese vybraných molekulárních markerů, které souvisí se signální drahou HER-2 receptoru. Z parafinových bloků nádorových tkání zařazených pacientek byly imunohistochemicky vyšetřeny následující biomarkery: celková Akt (pan) kinasa, pSer⁴⁷³ Akt kinasa, pSer/Thr Akt kinasa, celková mTOR kinasa, pSer²⁴⁴⁸ mTOR kinasa, celkový PTEN protein, celkový S6 Ribosomální protein a pSer^{235/236} S6 Ribosomální protein. U každého studovaného markeru jsme analyzovali, zda ovlivňuje efektivitu cílené léčby, charakterizovanou TTP. P-hodnoty statistické významnosti byly založeny na Gehan - Wicoxonova testu nebo χ^2 testu a pouze p-hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní. Ke stanovení TTP byla použita Kaplan - Meierova metoda a statistická závislost byla stanovena na základě log-rank testu. V parametrech přežití jsme hodnotili pouze biomarkery alespoň s 10% pozitivitou v testovaném souboru vzorků.

6.1. Imunohistochemická detekce vybraných molekulárních markerů

6.1.1. Materiál a přístrojové vybavení

Vlhká komůrka, podložní a krycí skla, pipety, špičky, barvicí nádoby, falkony, eppendorfy, laboratorní sklo, bločky s tkáněmi, pinzeta, buničina, budík, míchačka, váha, digestoř, mikrotom, histologická vodní lázeň, termostat, světelný mikroskop, lednice, pH metr.

6.1.2. Reagencie

Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, kat. č. K3466), Streptavidin-Horseradish Peroxidase Pre-Diluted (SAV-HRP) (BD Biosciences Pharmingen, kat. č. 51-75477E), $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (Sigma, kat. č. A-6435), Hematoxylin (Sigma, kat. č. H 3136), Akt (pan) (11E7) Rabbit mAb (Cell Signaling, kat. č. 4685), Phospho-Akt (Ser473) (587F11) Mouse mAb (Cell Signaling, kat. č. 9271), Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrate Antibody (Cell Signaling kat. č. 9611), S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb (Cell Signaling, kat. č. 2217), Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (91B2) Rabbit mAb (Cell Signaling, kat. č. 4857), PTEN (138G6) Rabbit mAb (Cell Signaling, kat. č. 9559), mTOR (7C10) Rabbit mAb (Cell Signaling kat. č. 2983), Phospho-mTOR (Ser2448) (49F9) Rabbit mAb (Cell Signaling, kat. č. 2976), Biotinylated Anti-Rabbit IgG (Vector Laboriem, kat. č. BA-1000), Biotinylated Anti-Mouse IgG (Vector Laboriem, kat. č. BA-9200), Pertex (Bamed, kat. č. HI00801), citrát sodný dihydrát (Aldrich, kat. č. 85,578-2), nízkotučné mléko (LFM), Bovine Serum Albumin (Sigma, kat. č. 85040C), Tween-20 (Serva, kat. č. 37470), fetální sérum (FCS), 10x PBS pufr pH 7.4, citrátový pufr pH 6, peroxid vodíku, methanol, ethanol, xylén, formaldehyd, purifikovaná voda (deionizovaná či destilovaná), kyselina chlorovodíková, NaOH, NaCl, KCl, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, KH_2PO_4 , H_5IO_6 (pokud není u chemikálií uveden výrobce, byly získány z ústavní lékárny).

6.1.3. Příprava zásobních roztoků

- **Promývací pufr (1x PBS/0,1% Tween-20):** 100 ml 10x PBS a doplnit destilovanou H_2O do 1 l válce a přidat 1 ml Tween-20.
- **10x koncentrovaný PBS:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 2 g $KH_2PO_4 \cdot H_2O$, doplnit do 1 litru destilovanou vodou a upravit na pH 7.4.
- **10mM Citrátový pufr pH 6.0:** 2,9 g citrát sodný dihydrát (Aldrich, kat. č. : 85,578-2), doplnit do 1 litru deionizované vody a upravit pH 6.0 pomocí HCl.
- **Roztok pro blokaci endogenní peroxidázy:** 3% Peroxid vodíku: 10 ml 30% H_2O_2 plus 90 ml 1x PBS s Tweenem.
- **Blokační mléko:** 3 g 3% LFM (Low-fat milk), 2 g 2% ALB (Bovine Serum Albumin), 1 ml 0,1% NaN_3 , rozpustit ve 100 ml 1xPBS s Tweenem.

- **Ředící roztok pro primární protilátku:** 900 µl 1x PBS s Tweenem, 100 µl FCS (Fetální sérum), 10 µl 0,1% NaN₃ z 10% zásobního roztoku NaN₃
- **Ředící roztok pro sekundární protilátku:** 900 µl 1x PBS, 100 µl FCS.
- **Kamencový Hematoxylin:** 50 ml 5% kamence hlinitodraselného, 1 ml 10% hematoxylinu v 96% EtOH, 1 ml 2% kyseliny jodisté, 10 kapek 3% konc. HCl. Skladujeme při laboratorní teplotě (18°C – 27°C).
 - **5% zásobní roztok kamence hlinitodraselného (KAl(SO₄)₂·12H₂O):** 5 g KAl(SO₄)₂·12H₂O rozpustit ve 100 ml dest. H₂O.
 - **10% zásobní roztok hematoxylinu v 96% EtOH:** 1 g hematoxylinu rozpustit v 10 ml 96% EtOH.
 - **2% zásobní roztok kyseliny jodisté:** 0,5 g H₅IO₆ rozpustit ve 25 ml destilované vody.
 - **3% zásobní roztok konc. HCl (35%):** 91,4 ml destilované vody a pokapkách přidat 8,6 konc. HCl.

6.1.4. Vlastní imunohistochemická metoda

Nakrájení tkání

Pacientské bločky s tkáněmi byly nakrájeny na mikrotomu na řezy tenké 4 µm a uchyceny na pozitivně nabitá podložní skla, která byla přes noc inkubována při teplotě 56°C v termostatu.

Deparafinizace preparátů

Skla byla inkubována v xylenu při laboratorní teplotě po dobu 5 min. Pak byla přenesena do nové barvicí nádobky (koplínky) s xylenem a inkubována dalších 5 minut, toto bylo zopakováno ještě jednou v další koplince s xylenem. Po vyjmutí z xylenu byla lehce osušena přitisknutím hrany skla na savou podložku. Pak byly připraveny dvě koplínky, do každé bylo nalito 90 ml 99,5% ethanolu. Preparáty byly inkubovány v 99,5% ethanolu při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Skla byla přenesena do další koplínky s 99,5% ethanolom.

Na závěr byla připravena koplínka s 90 ml 95% ethanolu. Preparáty byly inkubovány v 95% ethanolu při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Po vyjmutí preparátů z ethanolu byly propláchnuty 3x destilovanou vodou.

Zpracování řezů v mikrovlnné troubě

Podle návodu byl připraven citrátový pufr pH 6, barvicí nádobka určená pro inkubaci v mikrovlnné troubě byla naplněna roztokem 10 mM citrátového pufru pH 6.0. Barvicí nádobka byla umístěna do mikrovlnné trouby. Roztok v mikrovlnné troubě byl zahřát na teplotu varu.

Preparáty byly naskládány do košíků při pokojové teplotě a ponořeny do předehřátého pufru v barvicí nádobce. Mikrovlnná trouba byla zapnuta. Doba zahřívání byla 15 minut, poté byla nádoba vyndána z trouby a preparáty byly chlazeny 20 minut při pokojové teplotě. Ochlazené preparáty byly ponořeny do destilované vody a pak ponořeny do kyvety s 1x koncentrovaným pufrům PBS.

Blokace endogenní peroxidázy

Preparáty po fixaci, deparafinizaci, rehydrataci a odmaskování byly umístěny do roztoku pro blokaci endogenních peroxidáz a inkubovány 10 min. při laboratorní teplotě. Pak byly dvakrát opláchnuty v roztoku 1x PBS. Preparáty po blokaci endogenních peroxidáz byly vloženy do kyvety s 1x PBS a inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Toto bylo zopakováno ještě dvakrát.

Blokace v blokačním mléce

Opláchnuté preparáty byly ponořeny do předem připraveného roztoku blokačního mléka v kyvetě a inkubovány při laboratorní teplotě 1 hodinu. Pak byly vloženy do kyvety s 1x PBS a inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Toto bylo zopakováno ještě dvakrát.

Inkubace v primární protilátce

Po blokaci preparátů v blokačním mléce a oplachu v 1x PBS byly preparáty inkubovány s primární protilátkou. Sklíčka před nanesením primární protilátky byla osušena (Pozor!!! řez nesmí vyschnout), vložena do vlhké komůrky. Na řez bylo naneseno 200 μ l primární protilátky a skla byla uzavřena ve vlhké komůrce a inkubována přes noc v chladu v ledničce. Řezy byly inkubovány s následujícími primárními protilátkami dle následujícího ředění:

Akt (pan) (11E7) Rabbit mAb (Cell Signaling, kat. č. 4685) - Ř 1:50 20 μ l p. p. do 1000 μ l ředícího roztoku.

Phospho-Akt (Ser473) (587F11) Mouse mAb (Cell signaling kat. č. 9271) - Ř 1:200 5 μ l p. p. do 1000 μ l ředícího roztoku.

Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrate Antibody (Cell signaling kat. č. 9611) - Ř 1:250 4 μ l p. p. do 1000 μ l ředícího roztoku.

S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb (Cell Signaling, kat.č. 2217) – Ř 1:100 10 μ l p. p. do 1000 μ l ředícího roztoku.

Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (91B2)Rabbit mAb (Cell Signaling, kat. č 4857) - Ř 1:75 13,3 μ l p. p. do 1000 μ l ředícího roztoku.

PTEN (138G6) Rabbit mAb (Cell Signaling, kat. č. 9559) - Ř 1:100 10 μ l p. p. do 1000 μ l ředícího roztoku.

mTOR (7C10) Rabbit mAb (Cell Signaling kat .č. 2983) - Ř 1:50 20 µl p. do 1000 µl ředícího roztoku.

Phospho-mTOR (Ser2448) (49F9) Rabbit mAb (Cell Signaling, kat. č. 2976) - Ř 1:50 20 µl p. do 1000 µl ředícího roztoku.

Druhý den oplach preparátu v 1x PBS

Druhý den ráno byly preparáty vloženy do kyvety s 1x PBS a 2x rychle opláchnuty v tomto pufru. Poté byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě v 1x PBS. Toto bylo zopakováno ještě dvakrát.

Aplikace biotinylované sekundární protilátky

Skříčka byla před nanesením biotinylované protilátky osušena (Pozor!!! řez nesmí vyschnout) a vložena do vlhké komůrky. Na sklo bylo naneseno 200 µl biotinylované protilátky (biotinylated anti-rabbit IgG, nebo biotinylated anti-mouse IgG) a skla byla uzavřena ve vlhké komůrce. Vzorky byly inkubovány 2 hodiny ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Řezy byly inkubovány s následujícími sekundárními protilátkami dle následujícího ředění:

Biotinylated Anti-Rabbit IgG (Vector Laboratoriem)

5 µg/ml.....Ř 1:300.....(1500 µg)

3,33 µl s.p. do 1000 µl ředícího roztoku

Biotinylated Anti-Mouse IgG (Vector Laboratoriem) (Pro primární protilátku: Phospho Akt (Ser473))

5 µg/ml.....Ř 1:300.....(1500 µg)

3,33 µl s.p. do 1000 µl ředícího roztoku

Oplach preparátu v 1x PBS

Po inkubaci se sekundární protilátkou byly preparáty vloženy do kyvety s 1x PBS a 2x rychle opláchnuty v tomto pufru. Poté byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě v 1x PBS. Toto bylo zopakováno ještě dvakrát.

Aplikace streptavidin-peroxidáza konjugátu

Skříčka před nanesením roztoku streptavidinu byla osušena (Pozor!!! řez nesmí vyschnout), vložena do vlhké komůrky. Na tkáň bylo naneseno 200 µl Streptavidin-Horseradish Peroxidase (SAV-HRP) Pre-Diluted konjugát a vlhká komůrka byla uzavřena. Preparáty byly inkubovány 30 min. ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě.

Oplach preparátu v 1x PBS

Po inkubaci preparátů v roztoku streptavidinu byla skla vložena do kyvety s 1x PBS a 2x rychle opláchnuta v tomto pufru. Poté byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě v 1x PBS. Toto bylo zopakováno ještě dvakrát.

Vizualizace

Pro vizualizaci byl použit detekční komplex značený peroxidázou, jako chromogen je používán 3,3-diaminobenzidin (DAB). Křenová peroxidáza reaguje se substrátem peroxidem vodíku v inkubačním roztoku, přičemž oxidací DABu vzniká stabilní hnědý produkt. Byl použit kit Liquid DAB + Substráte Chromogen System (DakoCytomation, kat. č. K3466).

V mikroskopu bylo smícháno 1 ml DAB + substráte buffer s 1 kapkou DAB + chromogen. Na osušená sklíčka bylo naneseno cca. 100 µl Liquid DAB + Substráte Chromogen a inkubována při laboratorní teplotě 5 – 10 min. Po vizualizaci byly preparáty vloženy zpět do kyvety s 1x PBS a 3x rychle opláchnuty v destilované vodě.

Podbarvení hematoxylinem

Po promytí a vizualizaci byly preparáty vloženy do kyvety s roztokem hematoxylinu a inkubovány po dobu 30 sekund při laboratorní teplotě. Po 30 sekundách byly preparáty vytaženy do kyvety s destilovanou vodou a kyveta s preparáty byla dána pod studenou tekoucí vodu, kde byla promývána 3 minuty. Poté byly preparáty opláchnuty v destilované vodě.

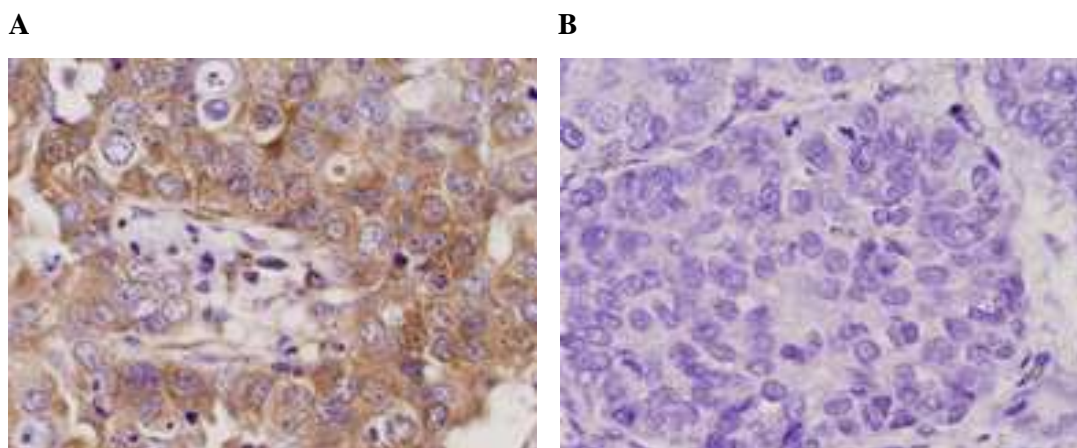
Odvodnění a zamontování

Preparáty byly oplachovány v 70% ethanolu – 1 minutu, 80% ethanolu – 1 minutu, 100% ethanolu – 1 minutu a 3 minuty v xylenu. Vše bylo následně ukončeno vytáhnutím preparátu z xylenu a po vysušení v digestoři byly preparáty zamontovány do montovacího média Pertex. Jednotlivé preparáty byly hodnoceny pod světelným mikroskopem.

6.2. Výsledky a diskuse

Z parafinových bloků nádorových tkání zařazených pacientek byly standardním způsobem provedeny imunohistochemické analýzy: stanovení celkové a fosforylované Akt kinasy, a to zvlášť pro serin a pro substrát serinu-threoninu. Dále stanovení celkového a fosforylovaného S6 ribosomálního proteinu. Stanovení celkové i fosforylované mTOR kinasy a stanovení PTEN. Všechny primární protilátky používané v naší práci byly od firmy Cell Signaling. Hodnocení imunohistochemického značení bylo provedeno kvantitativně, na počet nádorových buněk, zatímco statistická analýza přežití byla provedena Kaplan - Meierovou metodou.

Imunohistochemická detekce celkové Akt (pan) kinasy

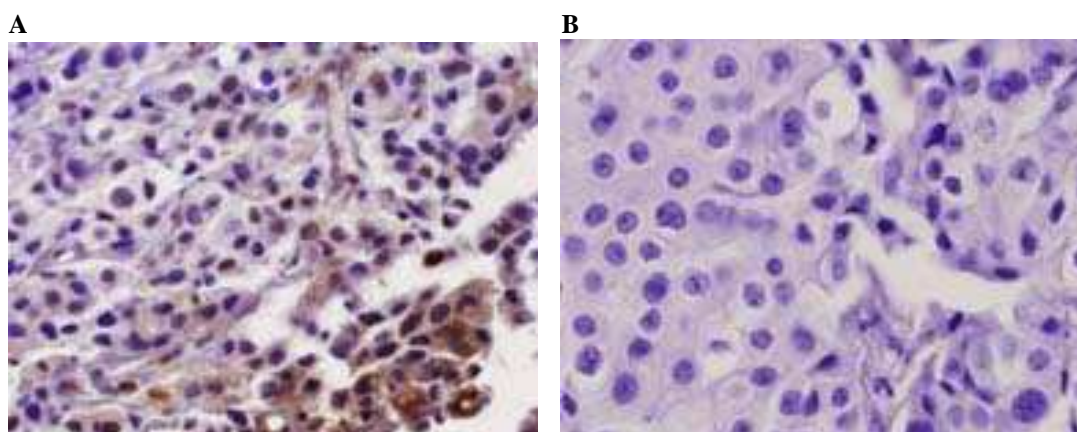


Obr. 13: Detekce celkové Akt (pan) kinasy metodou IHC.

Na Obr. A je zobrazena pozitivní tkáň pacienta, na Obr. B je tkáň negativní.

Křivky přežití (OS) a doby do relapsu (DFS) se signifikantně neliší u negativních pacientek ve srovnání s pacientkami, u kterých byla detekována slabá nebo silná exprese Akt kinasy.

Imunohistochemická detekce Phospho-Akt (Ser473) kinasy

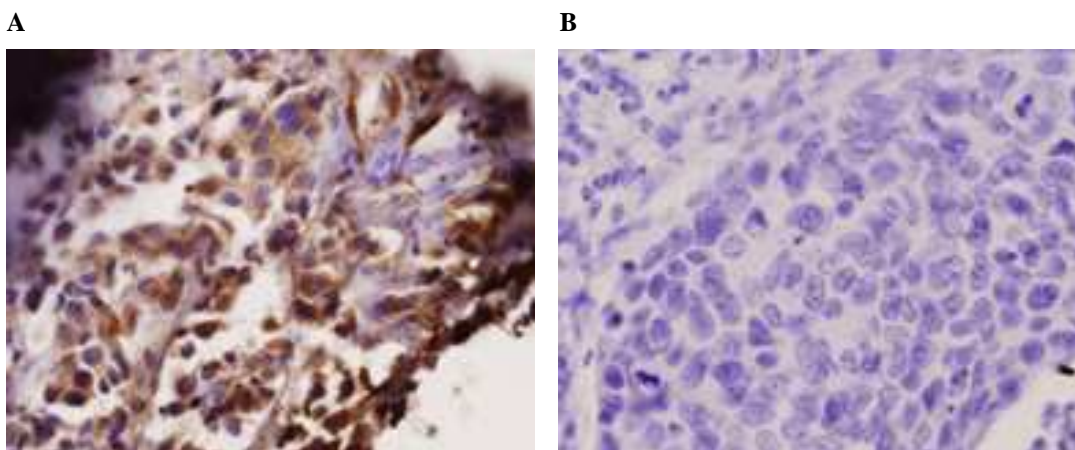


Obr. 14: Detekce Phospho-Akt (Ser473) kinasy metodou IHC

Na Obr. A je zobrazena pozitivní tkáň pacienta, na Obr. B je tkáň negativní.

Ve výsledném zpracování jsme nenašli žádný signifikantní rozdíl mezi DFS a OS u pacientek, u nichž nebyla prokázána exprese fosforylované Akt (Ser473) kinasy ve srovnání s pacientkami pozitivními, jak v cytoplazmě tak v jádře.

Imunohistochemická detekce Phospho-(Ser/Thr) substrát Akt kinasy

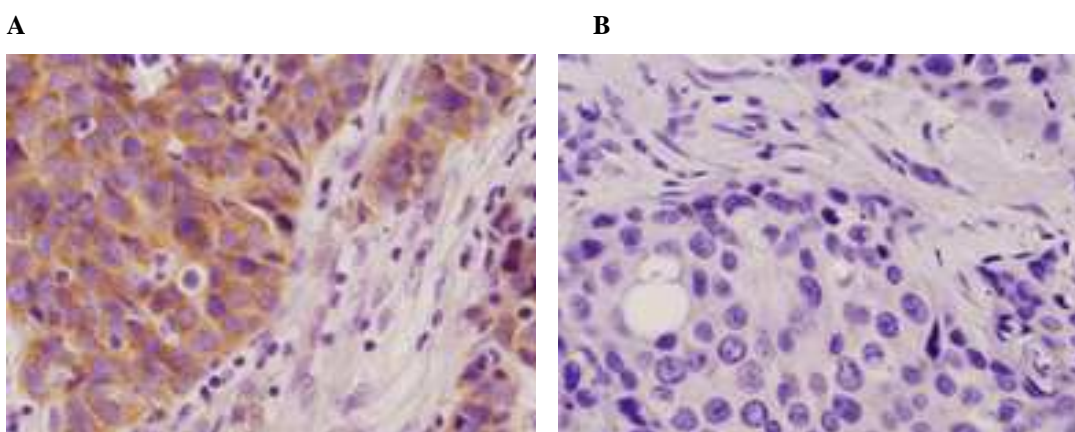


Obr. 15: Detekce Phospho-(Ser/Thr) substrát Akt kinasy metodou IHC

Na Obr. A je zobrazena pozitivní tkáň pacienta, na Obr. B je tkáň negativní.

U detekce Phospho-(Ser/Thr) Akt kinasy se statisticky významně liší křivky doby do relapsu a celkového přežití. U křivky DFS je statisticky významný rozdíl mezi negativními phospho-(Ser/Thr) Akt pacientkami oproti pozitivním v cytoplazmě na hladině významnosti $p = 10\%$. U křivky celkového přežití je statisticky významný rozdíl mezi negativními phospho-(Ser/Thr) Akt a pozitivními phospho-(Ser/Thr) Akt v cytoplazmě a jádře na hladině významnosti $p < 5\%$.

Imunohistochemická detekce celkové mTOR kinasy

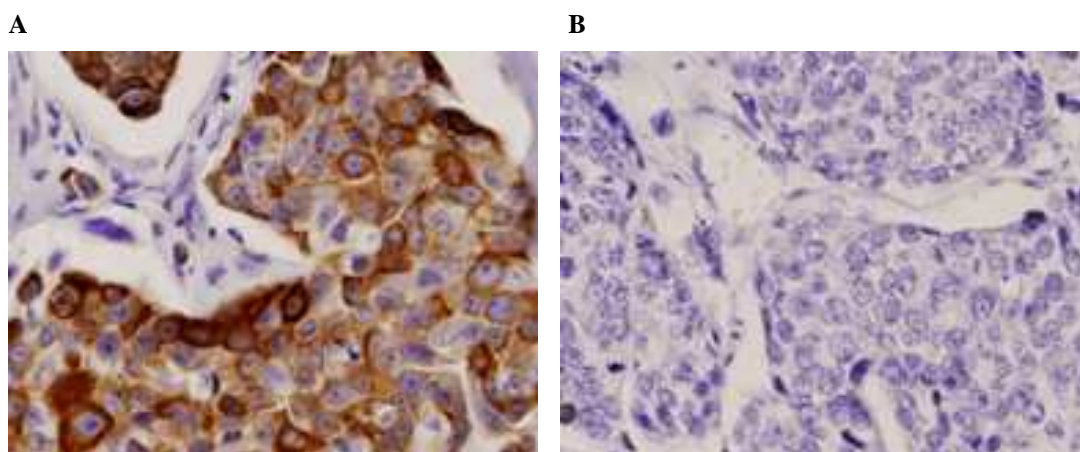


Obr. 16: Detekce celkové mTOR kinasy metodou IHC

Na Obr. A je zobrazena pozitivní tkáň pacienta, na Obr. B je tkáň negativní.

Pacientky, u nichž nebyla detekována mTOR kinasa vykazují stejnou dobu do relapsu i celkového přežití, stejně jako pacientky, u kterých byl tento marker detekován.

Imunohistochemická detekce Phospho-mTOR (Ser2448) kinasy

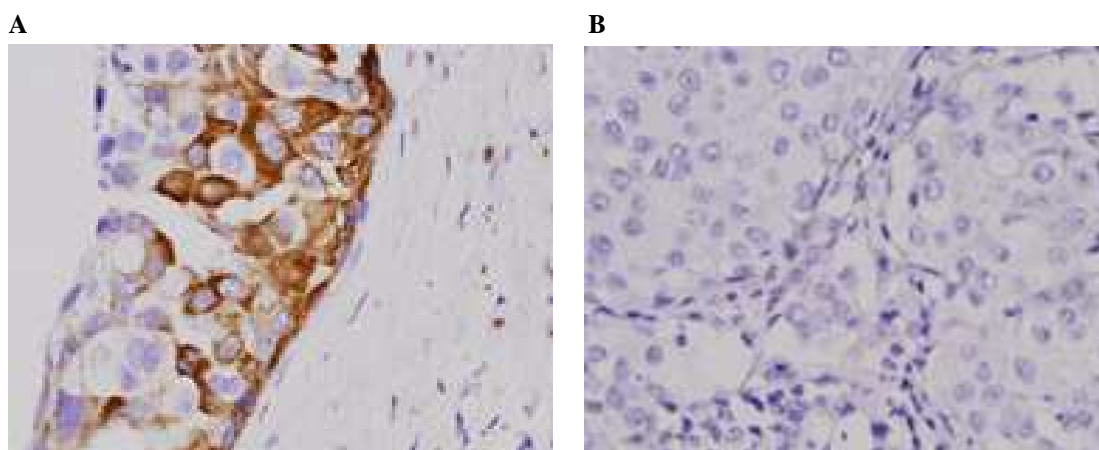


Obr. 17: Detekce Phospho-mTOR (Ser2448) kinasy metodou IHC

Na Obr. A je zobrazena pozitivní tkáň pacienta, na Obr. B je tkáň negativní

U Phospho-mTOR (2448) kinasy nebyl nalezen žádný významný statistický rozdíl.

Imunohistochemická detekce pSer 235/236 S6 Ribosomálního proteinu

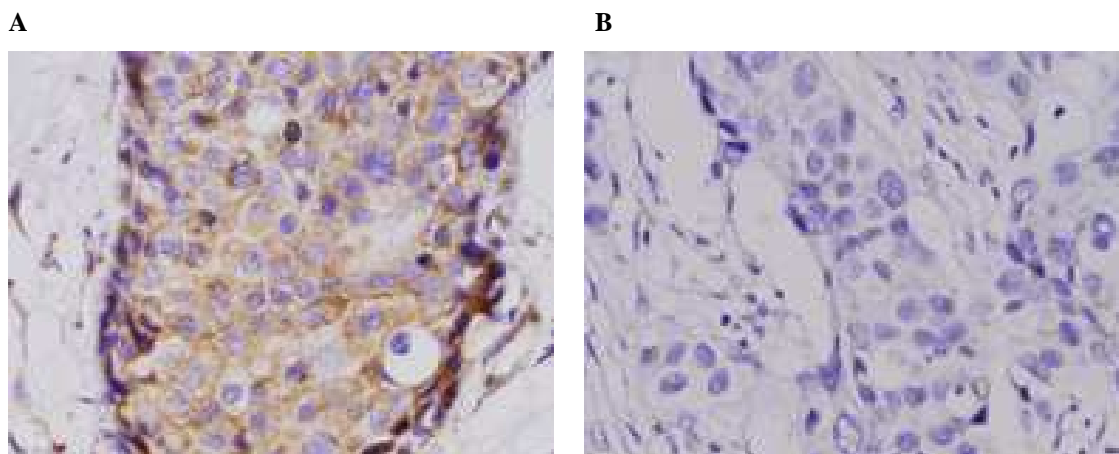


Obr. 18: Detekce pSer 235/236 S6 Ribosomálního proteinu metodou IHC

Na Obr. A je zobrazena pozitivní tkáň pacienta, na Obr. B je tkáň negativní

U fosforylovaného S6 Ribosomálního proteinu byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi dobou do relapsu a celkovým přežitím u negativních a pozitivních pacientek. Negativní pacientky mají výrazně delší dobu do relapsu i celkové přežití ve srovnání s pozitivními pacientkami (v cytoplazmě, popř. v cytoplazmě a v jádře).

Imunohistochemická detekce celkového S6 Ribosomálního proteinu

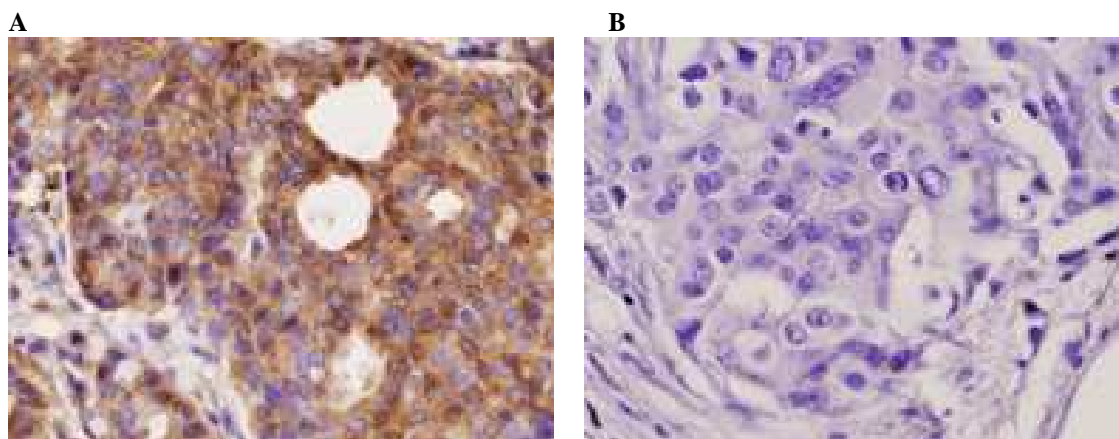


Obr. 19: Detekce celkového S6 Ribosomálního proteinu metodou IHC

Na Obr. A je zobrazena pozitivní tkáň pacienta, na Obr. B je tkáň negativní

Pacientky, u nichž nebyl detekován S6 Ribosomální protein vykazují stejnou dobu do relapsu i celkového přežití, stejně jako pacientky, u kterých byl tento marker detekován.

Imunohistochemická detekce celkového PTEN proteinu



Obr. 20: Detekce celkového PTEN proteinu metodou IHC

Na Obr. A je zobrazena pozitivní tkáň pacienta, na Obr. B je tkáň negativní

U křivek doby do relapsu a celkového přežití nebyl nalezen žádný významný statistický rozdíl celkového PTEN proteinu.

Záměrem celé studie je u souboru pacientek s karcinomem prsu, léčených humanizovanou myší monoklonální protilátkou Herceptin, vyhodnotit význam sledovaných markerů. Na základě imunohistochemické detekce nebyl zjištěn signifikantní rozdíl u křivek celkového přežití a doby do relapsu u následujících biomarkerů: celkové mTOR kinasy, pSer²⁴⁴⁸ mTOR kinasy a celkového S6 Ribosomálního proteinu. Dále bylo zjištěno, že pacientky, u nichž byla detekována vysoká exprese celkové Akt kinasy s přítomností aktivované pSer⁴⁷³ Akt kinasy v buněčném jádře vykazují lepší prognózu, než ostatní pacientky. Význam Akt kinasy byl prokázán např. i ve studiích Franke et al., Burgering et. al., Meier et. al. a Chan et. al., které poukázaly na fakt, že mezi nejkritičtější dráhy pro přežití nádorové buňky patří ty, zprostředkované Akt kinasou, a to u širokého spektra nádorových onemocnění [63, 64, 65, 66]. Například ve Studii Sun et. al. byl detekován signifikantní nárůst aktivity Akt1 kinasy u primárních nádorů prostaty (116 ze 30), prsu (19 z 50), a ovária (11 z 28). Nejvyšší exprese Akt1 byla pozorována u pokročilých nádorů vysokého gradu a stupně III/IV. [62].

V práci Fabi et. al. byla imunohistochemicky studována exprese proteinu PTEN a p-Akt kinasy u 73 pacientek léčených trastuzumabem s HER-2 pozitivním metastazujícím karcinomem prsu. Z výsledků vyplývá, že 48% pacientek bylo PTEN pozitivních a 71% pacientek bylo p-Akt pozitivních. Byla nalezena signifikantní korelace mezi expresí PTEN a p-Akt (κ 0.22, $p = 0,03$). PTEN pozitivní pacientky měly delší čas do progresu onemocnění než PTEN negativní. Tento trend jsme pozorovali i u naší analýzy. PTEN a p-Akt koexprese byla vyhodnocena jako nezávislý prediktor nižšího rizika progresu (hazard ratio 0,53, $p = 0.05$). U HER-2 pozitivních metastazujících karcinomů může zároveň koexprese PTEN a p-Akt identifikovat pacienty, které budou profitovat s léčby na trastuzumabu [67]. Kanamoriho et al. studie zjišťovala vztah mezi ztrátou exprese PTEN a Akt fosforylací na vzorcích karcinomu endometria, odebraných ze skupiny 103 pacientek, které podstoupily hysterektomii. Tato práce demonstrovala, že fosforylace Akt je doprovázena ztrátou exprese PTEN u klinických vzorků karcinomu endometria [25]. Toto zjištění potvrdilo, že Akt aktivace je doprovázená PTEN inaktivací, což je klíčový krok ve vývoji či progresi nádorového onemocnění [68, 72]. Důvod snížené exprese PTEN je vysvětlován mechanismem homozygotní delece, nesmyslnou mutací s LOH či metylací promotoru [70]. Kanamoriho et. al. studie korespondovala s našimi výsledky, ve kterých jsme zjistili, že pacientky se zvýšenou expresí p-Akt kinasy doprovázenou ztrátou exprese PTEN mají delší celkovou dobu do relapsu a celkové přežití pacienta. Studie Fabi et. al. a Kanamoriho et al. se od sebe liší, naše výsledky podporuje studie Kanamoriho et al.

Studie Bärlunda et al. použila fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) k detekci počtu kopií jednoho z over-exprimovaných genů, Ribosomálního proteinu S6 kinasy (S6K), lokalizovaného v oblasti 17q23. Exprese jak S6K genu tak S6K proteinu byla stanovena pomocí Northern a Western hybridizace a enzymatický test byl použit pro měření S6K aktivity. Také bylo zjištěno, že například u buněčné linie MCF je S6K gen amplifikován, vysoce overexprimován

a enzymatická aktivita S6K proteinu je vyšší v porovnání s normálním nenádorovým epitelem prsní tkáně. Studie současně detekovala amplifikaci S6K genu u 59 (8,8%) z 668 primárních nádorů prsu a zároveň byla pozorována statistická signifikance mezi amplifikací a špatnou prognózou ($p=0,0021$). Koamplifikace obou genů jak S6K tak HER-2 naznačuje obecně špatné přežití ($p=0,0001$) [4]. Výsledky studie Bärlund et al. 2000 korespondují i s našimi daty, která potvrdila prognostický význam S6 Ribosomálního proteinu. V naší studii jsme potvrdili, že pacientky s HER-2 pozitivními nádory prsu, léčené humanizovanou myší monoklonální protilátkou trastuzumabem, exprimující fosforylovaný S6 Ribosomální protein, vykazují horší prognózu.

V. Závěr:

Z molekulárních markerů, analyzovaných pomocí imunohistochemického vyšetření jsme zjistili, že pacientky s karcinomem prsu, u nichž byla detekována vysoká exprese celkové Akt kinasy s přítomností aktivované p-Akt-473 kinasy v buněčném jádře, vykazovaly lepší prognózu v léčbě s myší monoklonální protilátkou trastuzumab, než ostatní pacientky. Byl také potvrzen prediktivní význam celkového S6 Ribosomálního proteinu. Naše výsledky prokázaly význam sledování aktivity a kompartmentalizace Akt kinasy a aktivity S6 Ribosomálního proteinu pro predikci odpovědi HER-2 pozitivních karcinomů prsu na paliativní protinádorovou léčbu s trastuzumabem.

VI. Seznam použité literatury

- [1] Abrahámová, J. - Dušek, L. a kolektiv. Možnosti včasného záchytu rakoviny prsu. Grada. 1.vyd. Praha, 2003, Kap. 3, s. 41-47, ISBN: 80-247-0499-4
- [2] Alberts, B. – Bray, D. - Johnson, A. – Lewis, J. – Raff, M. – Roberts, K. – Walter, P. Základy buněčné biologie. Espero Publishing, s. r. o. 2. vyd. Ústí nad Labem, 2001, Kap. 17 - 18, ISBN: 80-902906-2-0
- [3] Alessi, D. R. - Cohen, P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 8, 1998, s. 55-62.
- [4] Bärlund, M. - Forozan, F. - Kononen, J. - Bubendorf, L. - Chen, Y. - Bittner, M. L. - Torhorst, J. - Haas, P. - Bucher, Ch. - Sauter, G. - Kallioniemi, O. P. – Kallioniemi, A. Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst*, 2000, vol. 92, no. 15, s. 1252-1259.
- [5] Biondi, R. M. - Komander, D. - Thomas, Ch. C. - Lizcano, J. M. - Deak, M. - Alessi, D. R. - Aalten, D. M. F. High resolution crystal structure of the human PDK1 catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site. *EMBO J.*, 2002, vol. 21, no. 16, s. 4219 - 4228.
- [6] Blanco-Aparicio, C. - Renner, O. - Leal, J. F. M. - Carnero, A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*, 2007, vol. 28, no 7, s. 1379-1386.
- [7] Burstein, H. J. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* 353; 16, 2005, s. 1652-1654.
- [8] Cantley, L. C. - Neel, B. G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, vol. 96, s. 4240-4245.
- [9] Casalini, P. – Iorio, M. V. *ERBB2 (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/ glioblastoma derived oncogene homolog (avian))*. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. [online]. 2004. Datum poslední revize textu 26.3. 2011. [cit. 2011-04-19]. Dostupné z URL: <<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/ERBB2ID162ch17q11.html>>.

- [10]. Cibula, D. - Petruželka, L. a kolektiv. Onkogynekologie. Grada. 1.vyd. Praha, 2009. Kap. 1, s. 25-41. ISBN: 978-80-247-2665-6
- [11] Citterbart, K. Gynekologie. Galén: 1. vyd. Praha, 2001. ISBN: 80-7262-094-0
- [12] DakoCytomation, Manuál k HercepTest™, Manuál k EGFR pharm Dx
- [13] Ding, Z. - Liang, J. - Li, J. - Lu, Y. - Ariyaratna, V. - Lu, Z. - Davies, M. A. - Westwick, J. K. - Mills, G. B. Physical association of PDK1 with AKT1 is sufficient for pathway activation independent of membrane localization and phosphatidylinositol 3 kinase. PLoS ONE, 2010, vol. 5, no.3, s. 1-10.
- [14] Dowling, R. J. O. - Topisirovic, I. - Fonseca, B. D. - Sonenberg, N. Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. Biochim Biophys Acta 1804, 2010, s. 433–439.
- [15] Gomolčák, P. Základy imunohistochemie v patologii.1.vyd. Brno, 1997. ISBN: 80-7013-375-9
- [16] Hajdúch, M. – Trojanec, R. – Nosková, V. – Džubák, P. – Kolář, Z. – Špačková, K. – Škarda, J. – Dušek, L. – Bouchal, J. – Vydra, D. – Cwiertka, K. – Žaloudík, J. – Mihál, V. Racionální individualizace protinádorové léčby-molekulární, buněčné a klinické aspekty. Edukační sborník, XXVII. Brněnské onkologické dny, 2003, s. 136-147.
- [17] Heinonen, H. – Nieminen, A. – Saarela, M. – Kallioniemi, A. – Klefström, J. – Hautaniemi, S. – Monni, O. Deciphering downstream gene targets of PI3K/mTOR/p70S6K pathway in breast cancer. BMC Genom., 2008, no. 9, vol. 348, s. 1-9.
- [18] Hemmings, B. A. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. Science, 1997, 275(5300): 628-30.
- [19] Hermanová, M. - Nenutil, R. - Kroupová, I. - Brázdil, J. - Lukášová, E. - Kozubek, S. Amplifikace a overexprese Her-2/neu v invazivních karcinomech prsu: srovnávací analýza metod imunohistochemických a fluorescenční in situ hybridizace, Klinická onkologie, 2001, vol. 14, no. 5, s. 157-162.

- [20] Hong, K. W. - Kim, CH. G. - Lee, S. H. - Chang, K. H. - Shin, Y. W. - Ryoo, K. H. - Kim, S. H. - Kim Y.S. A novel anti-EGFR monoclonal antibody inhibiting tumor cell growth by recognizing different epitopes from cetuximab. *J Biotechnol* 145, 2010, s. 84–91.
- [21] Hill, M. M. - Hemmings, B. A. Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 2002, 93:243-51.
- [22] Chow, L. M. L. - Baker, S. J. PTEN function in normal and neoplastic growth. *Canc Lett* 241, 2006, s. 184–196.
- [23] Jiang, B. H. - Liu, L. Z. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochem. Biophys Acta* 1784, 2008, s. 150–158.
- [24] Julien, L. A. - Carriere, A. - Moreau, J. - Roux, P. P. mTORC1 - activated S6K1 phosphorylates rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol*, 2010, vol. 30, no. 4, s. 908–921.
- [25] Kanamori, Y. - Kigawa, J. - Itamochi, H. Phosphorylation in endometrial carcinoma correlation between loss of PTEN expression and Akt. *Clin Cancer Res*, 2001;vol. 7, s. 892-895.
- [26] Klener, P. - Klener, P. Jr. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii, 2010, Kap. 10, s. 97. ISBN: 978-80-247-2808-7
- [27] Klener P. *Klinická onkologie*. Galén. Praha, 2002, s. 1-46.
- [28] Kodíček, M. *Biochemické pojmy: výkladový slovník: elektronická verze 2.0* Praha: VŠCHT, 2007, kapitola IV, ISBN–978–80–7080–669-2.
- [29] Komander, D. - Kular, G. S., Bain, J. - Elliot, M. - Alessi, D. R. - Aalten, D. M. F. Structural basis for UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) specificity and PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) inhibition. *Biochem J*. 375, 2003, s. 255–262
- [30] Králíčková, M. - Tonar, Z. *Principy a příklady imunohistochemie. Příručka pro studenty. Ústav histologie a embryologie LF UK. Plzeň*, 2002, s. 3-7

[31] Kulik, G. - Klippel, A. - Weber, M. J. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt Mol Cell Biol, 1997, vol.17, no.3, s. 1595-1606.

[32] Lee, S. - Choi, E. J. - Jin, CH. - Kim, D. H. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. Gynecol Oncol. 97, 2005, s. 26-34.

[33] Leslie, N. R. - Biondi, R. M. - Alessi, D. R. Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. Chem Rev, 2001, 101:2365-80.

[34] Liu, W. - James, C. D. - Frederick, L. - Alderete, B. E. - Jenkins, R. B. PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas. Cancer Res, 1997, vol. 57, no.23: 5254-5257.

[35] Longy, M. *PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten)*. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, [online]. 1999. Datum poslední revize textu 26.3. 2011. [cit. 2011-04-19].

Dostupné z URL: <<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/PTENID158.html>>.

[36] Lukáš, Z. - Dráberová, E. - Feit, J. - Vojtěšek, B. Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice. 1.vyd. Brno, 1997, ISBN 80-210-0620-x (brož)

[37] Magkou, Ch. - Nakopoulou, L. - Zoubouli, Ch. - Karali, K. - Theohari, I. – Bakarakos, P. – Giannopoulou, I. Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas. Breast Cancer Research, 2008, vol. 10, no. 3, s. 1-8.

[38] Maira, S. M. - Galetic, I. - Brazil, D. P. - Kaeck, S. - Ingley, E. - Thelen, M., and Hemmings, B.A. Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. Science, 2001, 294:374-80.

[39] Masopust, J. Cílové molekuly pro terapii nádorů. Labor Aktuell 04, 2006, s. 4-10.

[40] Michalová, K. - Zemanová, Z.. Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi. Klin. Biochem Metab, 13 (34), 2005, no. 2, s. 63–67.

[41] Michalová, K., Zemanová, Z. *Návrh laboratorní směrnice pro molekulárně cytogenetickou analýzu chromosomových odchylek v nádorových buňkách metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH)*. [online]. [cit. 2011-04-19].

Dostupné z URL: <http://www.uhkt.cz/files/nrl-dna/blp/Smernice_FISH.pdf>.

[42] Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997, 13:261-91.

[43] Mužík, J. - Dušek, L. - Abrahámová, J. - Koptíková, J. Stručný přehled epidemiologie zhoubného novotvaru prsu v České republice, *Onkologie* 3 (1), 2009, s. 7–11.

[44] Nahta, R. - Yu, D. - Hung, M. Ch. – Hortobagyi, G. N. - Francisco, J. E. Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2006, vol. 3, no. 5, 269-280.

[45] Palková, V. *Patologie 17. chromosomu u solidních nádorů*. Olomouc, 2006, s. 25-28, 37-39. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého na katedře biochemie. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Radek Trojanec, Ph. D.

[46] Pannala, M. - Kher, S. - Wilson, N. - Gaudette, J. - Sircar, I. - Zhang, S. H. - Bakhirev, A. - Yang, G., Yuen, P. - Gorcsan, F. - Sakurai, N. - Barbosa, M. - Cheng, J. F. Synthesis and structure–activity relationship of 4-(2-aryl-cyclopropylamino)-quinoline-3-carbonitriles as EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 2007, s. 5978-5982.

[47] Podwiková, A. *Znalosti žen o riziku a prevenci karcinomu prsu*. Pardubice, 2009, s. 12-13. Bakalářská práce na fakultě zdravotnických studií Univerzity Pardubice na katedře porodní asistence. Vedoucí bakalářské práce MUDr. Germund Hensel.

[48] Provenzano, E. - Johnson, N. Overview of recommendations of HER2 testing in breast cancer. Elsevier Ltd, 2009, s. 478-484.

[49] Rosner, M. - Hanneder, M. - Siegel, N. - Valli, A. - Fuchs, CH. - Hengstschläger, M. The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mut Res* 1659, 2008, s. 284–292.

[50] Ryška A., *Co je nového v morfologické diagnostice karcinomu prsu*. Med Tribune 19, LF UK a FN Hradec Králové. [online]. 2010. c2000 – 2011. Datum poslední revize textu 19.4. 2011. [cit. 2010-11-25]. Dostupné z URL: <<http://www.tribune.cz/clanek/19092-co-je-noveho-v-morfologicke-diagnostice-karcinomu-prsu>>.

[51] Sirák, I. - Hatlová J. - Petera, J. - Vošmik, M. - Ryška, A. - Vošmiková, H. Receptor pro epidermální růstový faktor a jeho úloha v radioterapii. *Klinická onkologie* 21, 2008, s. 338-347.

[52] Suzuki, A. - Pompa, J. L. - Stambolic, V. - Elia, A. J. - Sasaki, T. - Barrantes, I. B. - Ho, A. - Wakeham, A. - Itie, A. - Khoo, W. - Fukumoto, M. - Mak, T.W. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol*, 1998, vol. 8, no 21, s. 1169–1178.

[53] Šolc, P. Úloha protein kinázy B při znovuzahájení meiózy u myši. Praha, 2005, s. 22-25, 28. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze na katedře fyziologie živočichů a vývojové biologie. Vedoucí diplomové práce Prof. MVDr. Jan Motlík, DrSc.

[54] Študentová, H. - Melichar, B. Nový mechanismus v léčbě karcinomu ledviny: m-TOR – nová cílová struktura. *Onkologie* 4(3), 2010, s. 185–188.

[55] Tai, W. - Mahato, R. - Cheng, K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release* 146, 2010, s. 264–275.

[56] Tománková, S. Molekulární mechanismy regulující rezistenci/citlivost nádorových buněk prostaty k apoptóze indukované TRAILem. Brno, 2010, s. 12-14. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy Univerzity na katedře experimentální biologi. Vedoucí bakalářské práce RNDr. A. Vaculové, Ph.D.

[57] Trojanec, R. – Špačková, K. – Cwiertka, K. – Džubák, P. – Janošťáková, A. – Kolář, Z. – Houserková, D. – Mihál, V. - Hajdúch M. Amplifikace genu Her-2/neu: molekulární, buněčné a klinické aspekty. *Klin Farmakol Farmac*, 2002, 16 (1-2), 23-29.

[58] Vermeulen, K. – Van, Bockstaele, D. R. – Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Prolif.*, 2003, 36, 131-149.

- [59] Vyzula, R. Zásady cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění. Česká onkologická společnost ČLS JEP. 12. vyd. Brno:, 2011, Kap. 1, ISBN: 978-80-254-9142-3
- [60] Xiao, L. - Wang, Y. C. - Li W. S. - Du, Y. The role of mTOR and phospho-p70S6K in pathogenesis and progression of gastric carcinomas: an immunohistochemical study on tissue microarray. *J Exp Clin Canc Res* 28:152, 2009, s. 1-9.
- [61] Yamada, K. M. – Araki, M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci*, 2001, 114, 2375–2382.
- [62] Sun, M. - Wang, G. - Paciga, J. E. - Feldman, R. I. - Yuan, Z-Q. - Ma, X-L. - Shelley, S. A. - Jove, R. - Tsihchlis, P. N. -Nicosia, S. V. – Chev J.Q. AKT1/PKB_ Kinase Is Frequently Elevated in Human Cancers and Its Constitutive Activation Is Required for Oncogenic Transformation in NIH3T3 Cells. *Ame. Jour. Pathol.*, 2001; 159(2):431-437.
- [63] Franke, T. F. – Yang, S. L. – Chan, T.O. – Datta, K. – Kazlauskas, A. – Morrison, D. K. – Kaplan, D. R. – Tsihchlis, P. N. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, 1995; 81:727–736.
- [64] Burgering, B. M. T – Coffey, P. J Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol- 3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 1995; 376:599–602.
- [65] Meier, R. – Alessi, D. R. – Cron, P. – Andjelkovic, M. – Hemmings, B. A. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272:30491–30497.
- [66] Chan, T. O. – Rittenhouse, S. E. – Tsihchlis, P. N.: AKT/PKB and other D3 phosphoinositide- regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide- dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 1999; 68:965– 1014.
- [67] Fabi, A. - Metro, G. - DiBenedetto, A. – Nisticó, C. – Voci, P. – Melucci, E. – Antoniani, B. – Perracchio, L. – Sperduti, I. – Milena, M. – Cognetti, F. – Mottolese M. Clinical Significance of PTEN and p-Akt Co- Expression in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab-Based Therapies. *Oncology*, 2010; 78(2):141-149.
- [68] Di Cristofano, A. - Pandolfi, P. P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*, 2000, s: 387–390.

[69] Maxwell, G. L. - Risinger, J. I. - Gumbs, C. - Shaw, H. - Bentley, R. C. - Barrett, J. C. - Berchuck, A. - Futreal, P. A. Mutation of the *PTEN* tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res.*, 1998; 58:2500–2503.

[70] McMenamin, M. E. - Soung, P. - Perera, S. - Kaplan, I. - Loda, M. - Sellers, W. R. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.*, 1999;59: 4291–4296.

[71] Khaleghpour, K. - Li, Y. - Banville, D. - Yu, Z. - Shen, S. H. Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 2004, 25(2): 241-8.

[72] Stambolic, V. - Suzuki, A. - de la Pompa, J. L. - Brothers, G. M. - Mirtsos, C. - Sasaki, T. - Ruland, J. - Penninger, J. M. - Siderovski, D. P. and Mak, T. W. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95: 29–39, 1998.

[73] Janet Hart Melonakos. *Phosphatase and TENsin homolog (PTEN) located on chromosome 10*. [online]. c2008. [cit. 2011-04-19].

Dostupné z URL: <<http://www.duke.edu/~jhl13/research.html>>.

[74] Source BioScience Healthcare. *The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Pathway - Gene and Protein Alterations* [online]. [cit.2010-12-05].

Dostupné z URL: <<http://healthcare.sourcebioscience.com/diagnostic-tests/egfr>>.

[75] Linkos. *Nádory prsu* [online]. [cit.2011-14-01]. Dostupné z URL:

<<http://www.linkos.cz/pacienti/prs.php>>.

[76] Linkos. *SPC-Herceptin* [online]. c2000. Datum poslední revize textu 24. 4. 2007. [cit. 2011-04-05]. Dostupné z URL:

<http://www.linkos.cz/odbornici/sponzori/prezentace_roche/SPC_Herceptin.pdf>.

[77] Division of Molecular Biology of Palacky University in Olomouc. *Imunologické metody* [online]. c2006. [cit. 2010-10-14].

Dostupné z URL: <<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/Imunometody.pdf>>.

[78] Svod Analýza. *Incidence a mortalita ca. prsu*. [online]. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861. [cit.2010-10-14]. Dostupné z URL: <<http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>>.

[79] The Oliveberg Group, Protein Folding and Disease. *Model Proteins Studied by the Group Ribosomal Protein S6*. [online]. [cit. 2010-10-14].

Dostupné z URL: <<http://w3.dbb.su.se/~oliveberg/gallery.html>>.

[80] Wikipedia. *Soubor:Buněčný cyklus CDK.svg*. [online]. Datum poslední revize textu 28.10. 2008. [cit. 2010-11-25]. Dostupné z URL:

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%BD_cyklus_CDK.svg>.